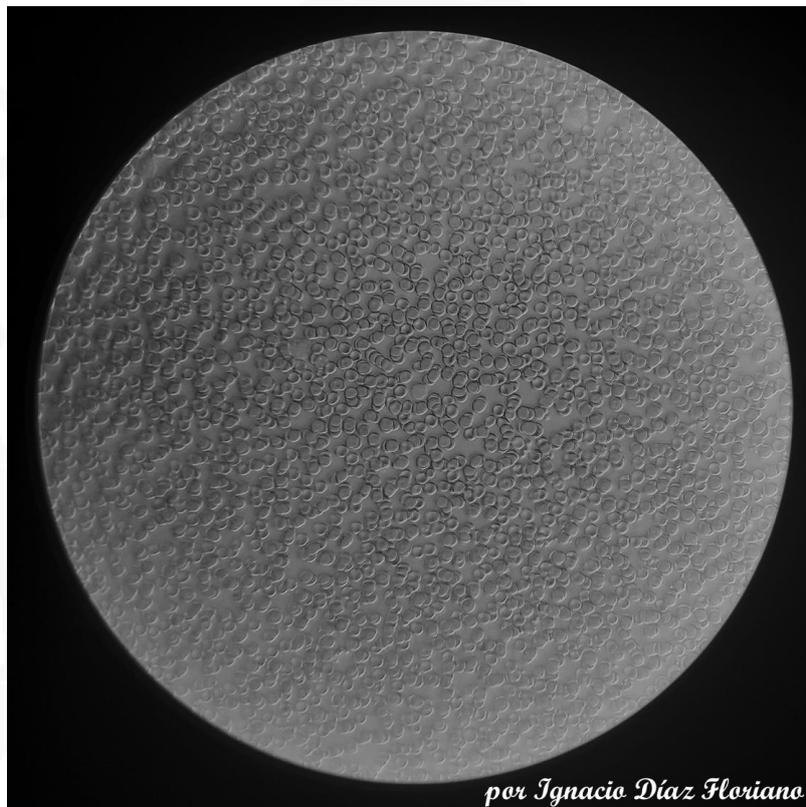


# TRABAJO FIN DE GRADO

## BIOLOGÍA

### Búsqueda de Biomarcadores en COVID persistente



**Autor**

**Ignacio Díaz Floriano**

Departamento  
*Morfología y biología celular*

Julio de 2024



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO**  
**FACULTAD DE BIOLOGÍA**





*Este TFG está dedicado a mi familia y amigos. También a la Dra. Ana Coto Montes, por ofrecerme un tema tan interesante, y ahora tan cercano para mí, así como la colaboración con la Dra. María González Nosti. Además de agradecer la colaboración de las enfermeras Raquel Corral López y Yolanda García Mesa, durante la extracción de las muestras sanguíneas de todos los pacientes y voluntarios que han participado en el estudio.*

## **Resumen**

La pandemia surgida en 2020 tuvo muchas repercusiones a nivel mundial, entre ellas la COVID persistente, una patología cuyas afecciones, tanto físicas como psicológicas, aparecen a los 3 meses de haber contraído el virus y sin una explicación médica clara. Esta patología, que ha superado ya los 65 millones de casos a nivel mundial, no está bien descrita por su reciente aparición, falta de medios y, en parte, por la falta de consenso entre la comunidad científica. Muchos autores han comentado la posibilidad de que su origen fuera por un trastorno autoinmune, alteraciones inmunológicas, fallos neuronales, formación de coágulos, alteraciones endoteliales, disbiosis intestinal, reservorios de COVID... aunque de todas ellas, la que más peso está teniendo es la autoinmunidad. Por ello, en este TFG se han analizado posibles biomarcadores asociados con el estrés oxidativo a nivel plasmático y eritrocitario, de forma que se pueda generar una base lo suficientemente robusta para realizar futuras investigaciones. Además, se ha elaborado un perfil energético en eritrocitos, plasma y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Los resultados obtenidos en el presente estudio han permitido construir un perfil molecular que diferencia a los pacientes con COVID persistente de los sanos, siendo los primeros los que presentan un mayor daño oxidativo, así como un perfil energético bajo en lo que respecta a los eritrocitos y una tendencia a la baja en CMSP, mientras que a nivel plasmático se vio una tendencia al alza. También han demostrado que los biomarcadores eritrocitarios han sido clave a la hora de elaborar una de las tantas clasificaciones basadas en agrupamientos jerárquicos.

## **Abstract**

The pandemic that emerged in 2020 had many repercussions worldwide, among them persistent COVID, a pathology whose afflictions, both physical and psychological, appear 3 months after contracting the virus and without a clear medical explanation. This pathology, which has already exceeded 65 million cases worldwide, is not well described due to its recent appearance, lack of resources and, in part, the lack of consensus among the scientific community. Many authors have commented on the possibility of its origin being due to an autoimmune disorder, immunological alterations, neuronal failures, clot formation, endothelial alterations, intestinal dysbiosis, COVID reservoirs... although of all these, autoimmunity is the most important. Therefore, in this TFG we have analysed possible biomarkers associated with oxidative stress at plasma and erythrocyte level, so that a sufficiently robust basis for future research can be generated. In addition, an energy profile has been developed in erythrocytes, plasma and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). The results obtained in the present study have allowed the construction of a molecular profile that differentiates patients with persistent COVID from healthy ones, with the former showing greater oxidative damage, as well as a low energy profile in terms of erythrocytes and a downward trend in CMSP, while an upward trend was seen at the plasma level. They have also shown that erythrocyte biomarkers have been key in developing one of the many classifications based on hierarchical clustering.

### **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DEL TRABAJO FIN DE GRADO**

De acuerdo con lo establecido en el artículo 8.3 del Acuerdo de 5 de marzo de 2020, del Consejo de Gobierno de la Universidad de Oviedo, por el que se aprueba el Reglamento sobre la asignatura Trabajo Fin de Grado de la Universidad de Oviedo.

D./D.a Ignacio Diaz Floriano,

#### **DECLARO QUE:**

El Trabajo Fin de Grado titulado “***Búsqueda de biomarcadores celulares en COVID persistente***”, que presento para su exposición, defensa y publicación posterior, es original y he citado debidamente todas las fuentes de información utilizadas, tanto en el cuerpo del texto como en la bibliografía. Además, la figura de la portada fue tomada y editada por mi empleando un microscopio de campo claro de la marca *Euromex* (serie *MicroBlue*) con un aumento de 40.

En Oviedo, a 28 de junio de 2024

Firmado: Ignacio Diaz Floriano.

## Índice

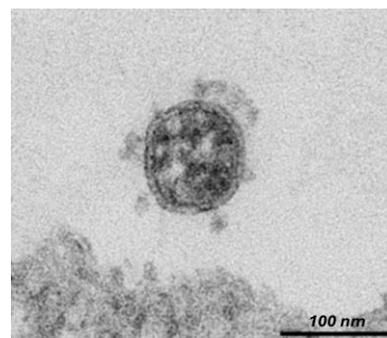
<b>Introducción</b> .....	2
Sars-CoV2 – Biología, filogenia y ciclo vital .....	2
Claves de la COVID persistente y su origen.....	4
Biomarcadores del estrés oxidativo e infecciones virales .....	5
Justificación del proyecto .....	7
<b>Pacientes y métodos</b> .....	7
Pacientes.....	7
Reactivos.....	8
Cálculo de Proteínas .....	8
Actividad antioxidante total .....	9
Lipoperoxidación.....	9
Concentración de ATP .....	10
Actividad enzimática de la catalasa .....	11
Actividad enzimática de la superóxido dismutasa.....	11
Análisis estadístico .....	12
<b>Resultados</b> .....	13
Plasma .....	13
Eritrocitos .....	14
Células Mononucleares de Sangre periférica (CMSP).....	15
Perfil molecular y <i>Heatmap</i> .....	16
Clasificación mediante agrupamiento jerárquico.....	17
<b>Discusión</b> .....	19
Perfil oxidativo y antioxidativo en pacientes con COVID persistente.....	19
Perfil energético en pacientes con COVID persistente.....	20
Perfil molecular y clasificación de los pacientes .....	22
<b>Limitaciones</b> .....	23
<b>Conclusión</b> .....	24
<b>Bibliografía</b> .....	24

## Introducción

En 2019, se desencadenó una crisis sanitaria a nivel mundial a raíz de la pandemia del Sars-CoV2. Tras 5 años del inicio de este evento, se han empezado a registrar ya las primeras secuelas, muchas de ellas englobadas en una nueva patología conocida comúnmente como COVID persistente (CP) o *Long COVID*, en inglés. El número de casos confirmados, a nivel mundial, ha superado los 65 millones, lo que equivale, aproximadamente, al 1% de la población mundial (Davis et al., 2023b). Además, según un informe del GTM (Grupo de Trabajo multidisciplinar, asesores del Ministerio de Sanidad), afirman que el 6,8% de las personas que han sufrido una infección por Sars-CoV2 y el 15,2 % de los que han sufrido una infección sintomática podrían sufrir COVID persistente. En base a eso estimaron que en torno a 800.000 españoles podrían llegar a padecerlo (Ordovás et al., 2022). Estos casos de CP son presentados, mayoritariamente, por las mujeres de ascendencia caucásica que por los hombres caucásicos, siguiendo una proporción de 3:1, respectivamente (Bai et al., 2022; Davis et al., 2023b).

### Sars-CoV2 – Biología, filogenia y ciclo vital

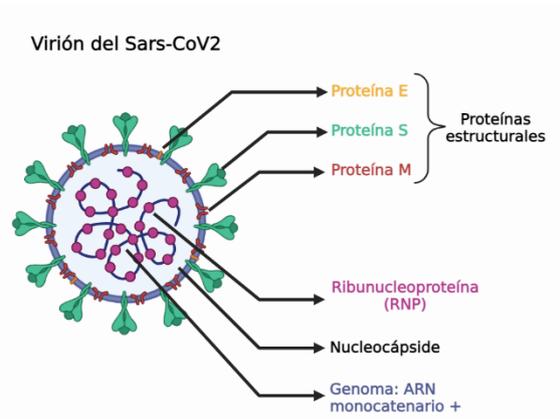
El agente causal de esta patología es el virus Sars-CoV2, como se explicó antes. Este virus guarda una estrecha relación con otros dos miembros de su familia, *Coronaviridae*, y son el Sars-CoV (79% de identidad genética) y MERS-CoV (50% de identidad genética). Estos tres coronavirus han surgido por zoonosis, es decir, primero han estado en una población animal y, posteriormente, han emigrado a una población humana. Esto implica que son virus más “agresivos”, por lo que la patología que van a inducir es más grave de lo habitual (Hu et al., 2020; *Zoonotic Diseases | One Health | CDC*, n.d.). Otros datos acerca de este virus, es que su hospedador intermediario, hasta la fecha, es el murciélago, ya que se compraron los coronavirus del pangolín, uno de los candidatos, y el del mamífero volador, obteniendo un 92% y 99% de similitudes, respectivamente, con respecto a nuestro Sars-CoV2. Aunque todavía no se sabe con exactitud cuál es el reservorio original de este *Coronaviridae* (Hu et al., 2020).



**Fig. 1** – Fotografía de microscopía electrónica de transmisión de un virión de SARS-CoV-2, infectando una célula Vero. Edición de color propia (original en el anexo) (Laue et al., 123 C.E.).

La estructura del virión, es decir, la partícula infectiva, presenta una morfología circular y con una envuelta membranosa, recubierta por una serie de espículas proteicas

(Figuras 1 y 2). La envuelta se compone de la proteína de membrana (M), “*envelope*” (E) y la famosa espícula S, estas tres proteínas presentan una finalidad estructural. Por ejemplo, la S será reconocida por determinados receptores de las células huésped y, una vez se produjo dicho reconocimiento, el virus es introducido en el interior de la célula donde tendrán lugar una serie de sucesos relacionados con la replicación y generación de nuevas partículas virales. Dentro, en la nucleocápside, se encuentra su material genético asociado a una serie de proteínas llamadas ribonucleoproteínas (RNP) (Hardenbrook & Zhang, 2022; Ravi et al., 2022)

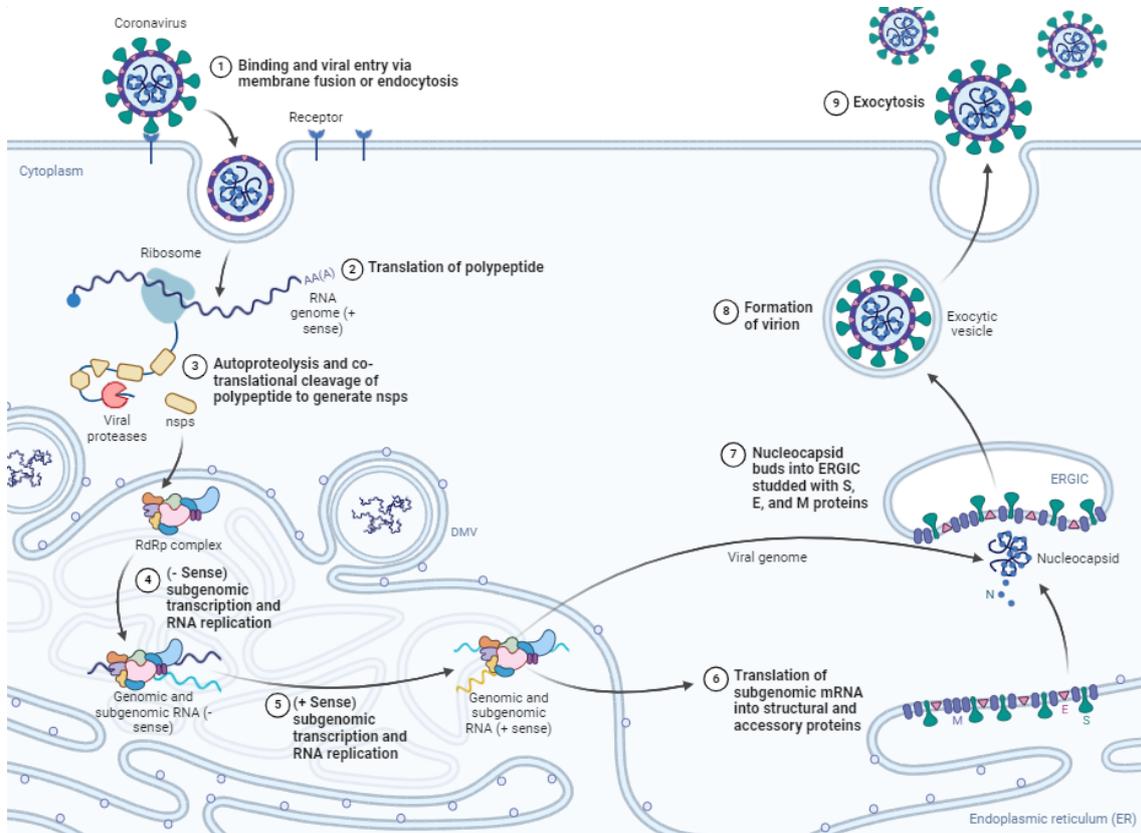


**Fig. 2** – Ilustración, realizada en BioRender, en la que se muestra la estructura básica del virión del Sars-CoV2.

En lo que respecta a su genoma, se trata de un virus tipo ARN monocatenario y de sentido positivo (+ssRNA) (Biswas & Majumder, 2020). Este tipo de virus modifica la estructura de las membranas biológicas y emplean los complejos que se localizan en ellas para poder replicar su genoma. Este tipo de genoma actúa como un ARNm, lo cual implica que, una vez en el interior de la célula, los ribosomas podrán traducirlo a proteínas directamente. Por otro lado, aparte de poder sintetizar proteínas virales, es capaz de generar nuevos ARN virales que servirán para la elaboración de más proteínas de este tipo (Payne, 2017a).

Una vez estudiado lo anterior, el ciclo reproductivo del Sars-CoV2 se puede resumir esencialmente en nueve etapas, desde su acoplamiento a la célula hasta la exocitosis de los viriones (Figura 3). La primera de ellas es el anclaje en la célula, para ello, empleará la proteína S que será reconocida por un receptor de membrana de la célula huésped, concretamente sobre el receptor de la enzima convertidora de angiotensina II (ACE II). Tras esto, el virus libera su contenido en el interior celular y el RNA es traducido a proteínas, para generar un complejo multimérico llamado RdRp. Además, de generar proteínas virales, también va a replicar su genoma, generando copias ARN + y - (2,3). Este complejo, se localiza en el lumen del retículo endoplasmático rugoso, que es donde se ensambla, y comienza a replicar el ARN monocatenario -, para luego generar copias RNA monocatenarias + (4,5). En las últimas etapas, las copias de ARN que sean monocatenarias + serán traducidas a proteínas, dando lugar a las estructurales (M, E y S) y a las de la

nucleocápside, las cuales se unirán al ARN y lo compactarán, formando la RNP. Una vez formadas, se anclarán en uno de los sacos membranosos del Aparato de Golgi, dando lugar al virión (6,7,8). Finalmente se producirá su exocitosis y el ciclo volvería a empezar (Hartenian et al., 2020; Payne, 2017b; Ravi et al., 2022).



**Fig. 3** – Ilustración, adaptada del artículo “*The molecular virology of coronaviruses*” y realizada en BioRender por Jessica M. Tucker, en la que se muestra el ciclo de vida del Sars-CoV2. Los números hacen referencia a cada una de las fases explicadas anteriormente.

### Claves de la COVID persistente y su origen

En cuanto a la categorización de los pacientes, es decir, su distribución por escalas es todavía difusa, aunque ya se pueden ir clasificando en 3 grupos o *clusters*: A, B y C. El *cluster A* correspondería a los pacientes con síntomas más leves, como por ejemplo la fatiga, mientras que en el C se incluyen los pacientes con síntomas más severos, tales como: insomnio, disnea, taquicardias... (Mateu et al., 2023) No obstante, la complejidad que supone la categorización de estos pacientes es todavía muy alta, ya que los límites entre los *clusters* se basan en una gradación de síntomas y no mediante análisis moleculares.

Esta enfermedad se caracteriza por el mantenimiento y/o aparición de nuevos síntomas a los tres meses de haber sufrido una infección por Sars-CoV2, sin un motivo clínico aparente, es decir, no se pueden asociar con otras patologías (World Health

Organization et al., 2022). Su semiología es un tanto incierta, aun así cuenta con cerca de 200 síntomas y/o signos, algunos de ellos son (Davis et al., 2023b):

- Dolores de pecho y palpitaciones.
- Disfonía.
- Dolor abdominal y náuseas.
- Alteraciones cognitivas graves (pérdida de memoria, dificultades en el habla...)
- Insomnio.
- Fatiga.
- Problemas menstruales.

Debido a esto, se la puede considerar también como una patología multiorgánica, debido a que afecta a diversos órganos tales como el corazón, cerebro, pulmones, sistema circulatorio, genitales... Todo esto, enlazado con que apenas se disponen de medios para su diagnóstico, ni tratamientos... hace que sea perentorio incidir en el estudio de su semiología, patocronía y nosología, para poder llegar a un tratamiento efectivo.

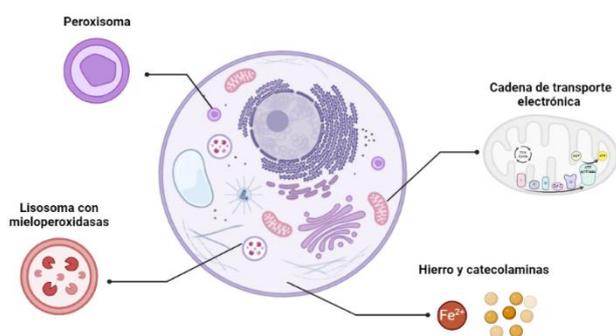
Actualmente existen varias hipótesis sobre su patogenia entre las que destacarían la disbiosis intestinal, reservorios de Sars-CoV2 que no ha terminado de eliminarse, alteraciones inmunológicas, autoinmunidad, formación de coágulos y anomalías endoteliales y, por último, un fallo en la señalización neuronal (Davis et al., 2023b; Ledford, 2022; Morrow et al., n.d.). De todas ellas, las que más peso están adquiriendo son las referentes al sistema inmunitario, ya que se ha observado que ciertos elementos inmunitarios, como las moléculas del complemento, asociadas a procesos inflamatorios e infecciones microbianas (Willrich, 2020), podrían tener una implicación en este síndrome.

### **Biomarcadores del estrés oxidativo e infecciones virales**

El actual estudio se basa en la búsqueda de biomarcadores celulares relacionados con el estrés oxidativo, es decir, la alteración en la producción y/o eliminación de las especies reactivas de oxígeno (ROS) (radicales libres (RL)) debido a un descontrol de las rutas de señalización y regulación de éstas. Esta desregulación puede llegar a desequilibrar el balance oxidante/antioxidante dando lugar a una serie de daños, tanto a nivel celular como tisular. Cuando se encuentran en exceso, pueden afectar al DNA, los lípidos y a las proteínas, conllevando la producción de peróxidos de lípidos, por ejemplo. No obstante, la célula es capaz de regular los niveles de ROS a través del uso de sistemas antioxidativos, es decir, moléculas orgánicas (vitaminas C y E, carotenoides...) y enzimas (catalasa, superóxido dismutasa...) especializados en la eliminación de este tipo de RLs, de forma

que la célula pueda mantener un balance oxidativo/antioxidativo correcto (Camini et al., 2016).

El estrés oxidativo puede tener lugar en determinadas situaciones, normalmente patológicas, tales como: infecciones virales, procesos asociados a senescencia, inflamación, exceso de iones metálicos, efectos medioambientales, cáncer, afecciones neurológicas, cardiovasculares... (Giustarini et al., 2009; Schwarz, 1996). Además de situaciones patológicas, existen procesos por los cuales es posible generar los ROS como, por ejemplo, el metabolismo aerobio, en el que la cadena de transporte de electrones es capaz de generar iones superóxido; en los peroxisomas, durante la degradación de los ácidos grasos; las mieloperoxidasas, un tipo de enzima lisosomal localizadas en neutrófilos; metales, como el  $Fe^{2+}$ , y algunas hormonas como las catecolaminas... (Alberts et al., 2020; Giustarini et al., 2009; *Myeloperoxidase - an Overview | ScienceDirect Topics*, n.d.)



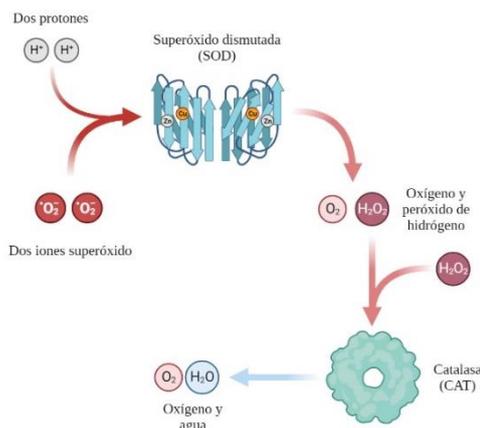
**Fig. 4** – Ilustración, realizada con BioRender, con algunos ejemplos de orgánulos, estructuras celulares y moléculas capaces de contribuir a la generación de ROS.

En lo que respecta a una infección viral, la primera observación de que el aumento de RLs se puede asociar a este tipo de infecciones, fue en 1979 con el experimento del *Dr. Peterhans* en el que se emplearon esplenocitos de ratón infectados con un *Paramyxoviridae*. Una vez infectados, se observaron altos niveles de bioluminiscencia, en comparación con los controles, lo cual implica que los RLs fueron capaces de oxidar el luminol, al emitir luz y, como los niveles de ésta eran elevados, se deduce que la concentración de RLs fueron igual de elevados (Camini et al., 2016; Peterhans, 1979). Además, estudios posteriores han demostrado que los virus pueden llegar a inducir ese desbalance, ya que lo pueden emplear para fomentar su replicación en la célula huésped, al favorecer la replicación del RNA viral, y para la selección de mutantes más resistentes, puesto que el propio organismo utiliza a los RL como mecanismo de defensa (Gullberg et al., 2015; Schwarz, 1996).

Dentro de esta situación, se ha observado que los radicales que se suelen producir son el ión superóxido ( $O_2^-$ ), grupos hidroxilos ( $OH^-$ ) y el subproducto  $H_2O_2$ , entre otros. Estas

especies reactivas de oxígeno suelen ser inhibidas o minimizadas por la acción de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD) o la catalasa (CAT), enzimas claves para este estudio (Camini et al., 2016; Y. Zhang et al., 2014).

Centrándonos en los virus de tipo RNA, destacan algunos miembros de la familia *Flavoviridae*: el virus de la hepatitis C, el virus de la encefalitis japonesa y el virus del dengue. Estos 3 virus presentan la capacidad de aumentar el estrés oxidativo de las células, alterar la actividad de las enzimas antioxidantes y la liberación de ATP mitocondrial en el caso del segundo virus (Camini et al., 2016).



**Fig. 5** – ilustración, realizada en BioRender, en el que se muestran las reacciones catalizadas por la SOD y la CAT.

### Justificación del proyecto

Teniendo en cuenta este precedente y las hipótesis anteriormente expuestas sobre el origen de esta patología, el análisis de biomarcadores relacionados con estrés oxidativo podría ser una buena forma de llegar a conocer las bases que originan la enfermedad, y su detección. Así como para la clasificación de los pacientes con CP en función del *cluster* que les corresponda. Es por ello, que en el actual estudio se analizaron las actividades enzimáticas de la SOD y CAT, la actividad antioxidante total, la lipoperoxidación, en plasma y eritrocitos, así como un análisis de los niveles de ATP a nivel plasmático, eritrocitario y en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) con el fin de conocer su potencial papel como biomarcadores.

## Pacientes y métodos

### Pacientes

Para llevar a cabo este estudio, aprobado por el comité de ética del Principado de Asturias, con **referencia 2022/505**, en el que se analizan los posibles biomarcadores relacionados con el CP, se empleó una cohorte de un total de 11 individuos, todas ellas mujeres de mediana edad (35-65 años). De estos 11 pacientes, 5 eran controles (CTR) y 6 presentaban COVID persistente (COV). A todos se les extrajeron 2 muestras de sangre periférica, las cuales fueron fraccionadas para obtener los siguientes elementos:

- Eritrocitos.
- Plasma.
- Linfocitos.

Una vez obtenidos y alicuotados estos 3 componentes se depositaron en neveras (-20 °C), a excepción de los linfocitos que se introdujeron en un congelador a -80 °C, para su conservación. Gracias a estos elementos, se pudieron realizar las pruebas que se expondrán a continuación:

- Cálculo de proteínas.
- Actividad Antioxidante Total (AAT).
- Determinación de la lipoperoxidación (LPO).
- Determinación de la concentración del ATP.
- Determinación de la actividad enzimática de la catalasa (CAT).
- Determinación enzimática de la superóxido dismutasa (SOD).

En cada una de ellas, se realizaron tres réplicas, es decir, 3 pocillos por individuo y punto de la recta patrón, en el caso de que fuera necesaria.

## Reactivos

Se emplearon una gran diversidad de reactivos:

- Para el **cálculo de proteínas**: Reactivo de Bradford.
- Para la **AAT**: ácido 2,2'-azino-bis (3-etil-benzotiazolin-6-sulfónico) (ABTS), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, HRP (peroxidasa) y tampón fosfato de sodio 50 mM pH 7,5.
- Para la **LPO**: 1-metil-2-fenilindol en acetonitrilo (R1), ácido metansulfónico (R2) y malonildialdehído+4-hidroxinonenal (MDA+4-HNE).
- Para el **ATP**: ATP Assay Mix, ATP Assay Mix Dilution Buffer y ATP Standard.
- Para la **CAT**: tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7 y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mM.
- Para la **SOD**: hematoxilina, una solución Etanol-Cloroformo (65%-35%), tampón fosfato 50 mM pH 7,5+EDTA 0,1 mM y tampón dihidrógeno fosfato de potasio 50 mM.

## Cálculo de Proteínas

Se empleó en plasma y linfocitos, mediante el protocolo del *Dr. Marion Bradford*, en el que se emplea la albúmina, a partir de la cual se realiza una dilución seriada obteniéndose una recta patrón, y el reactivo de Bradford, que nos permitirá conocer la concentración de proteínas, tanto de la recta patrón como de la muestra, puesto que cambia el color de los pocillos de transparente a azul pálido o marrón, en función de la concentración de proteína. Posteriormente se mide la placa con un espectrofotómetro a 595 nm. De esta forma podremos saber cuál es la concentración de proteína, expresada en mg/ml de proteína, existente en nuestra muestra problema (plasma o linfocitos),

facilitándonos, a su vez, la cuantificación de la actividad antioxidante total, la lipoperoxidación y la concentración de ATP (Bradford, 1976).



**Fig. 6** – Figura, realizada en BioRender, en la que se muestra el aspecto de una placa de 96 pocillos tras la adición del reactivo de Bradford. Nótese la gradación de color que se observa en la recta patrón, siendo los pocillos de color más azulado los que presentan una mayor concentración de proteína.

### Actividad antioxidante total

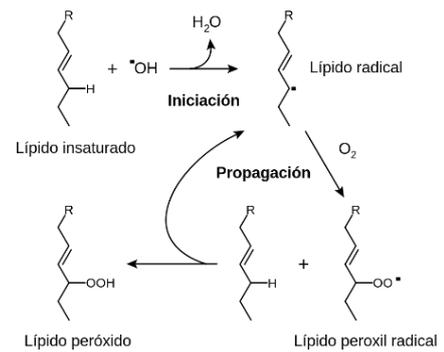
El protocolo empleado se trata de una adaptación de la técnica de Arnao et al. (2001) para extractos vegetales. En este experimento, se elaboró el radical ABTS, para ello, se hizo reaccionar el  $H_2O_2$  con el ABTS, formándose nuestro radical gracias a la presencia de la enzima HRP (peroxidasa de rábano). La ventaja de este radical es su elevada estabilidad y que presenta máximos de absorbancia a 414 y 730 nm.

Para medir la AAT, se realizan estimaciones del descenso de absorbancia a 730 nm, provocada por la adición de las muestras de plasma de los pacientes. Por tanto, para cuantificar la ATT se emplea la variación de absorbancia entre el valor inicial y final a 730 nm, siendo el tiempo de diferencia entre estos dos momentos de 15 minutos en oscuridad. Tras la obtención de los resultados, se transformarán en los equivalentes de Trolox (mg Trolox/ mg proteína), que producen el mismo efecto antioxidante que nuestras muestras problema, ya que se sabe que 1 mol de Trolox reacciona con 2 moles de ABTS (Arnao et al., 2001).

### Lipoperoxidación

La determinación de la lipoperoxidación se basa en que la peroxidación de los lípidos da lugar a lipoperóxidos y otros derivados, como el malonaldehído (MDA) y el 4-hidroxinonenal (4-HNE), los cuales permiten obtener un índice sobre la lipoperoxidación. Para su cuantificación se emplea un cromógeno, el 1-metil-2-fenilindol, que reacciona con el MDA y el 4-HNE a 45°C, generándose un cromóforo estable con un máximo de absorbancia a 586 nm.

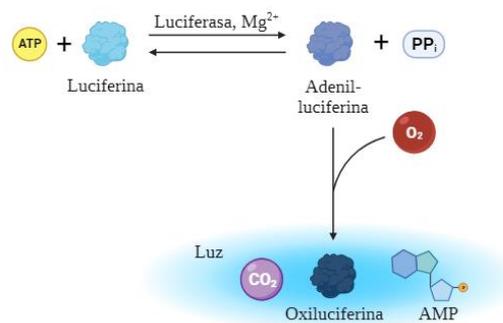
Para la elaboración de la prueba, se tendrá que hacer un radical (R1), que será el cromóforo, una solución de MDA+4-HNE y por último se empleará otro radical (R2), que será el ácido metansulfónico (comercial). Una vez preparado esto, se procede a elaborar una recta patrón que empleará agua destilada (eritrocitos) o suero fisiológico (plasma) en función de la muestra que se vaya a emplear. Tras esto, se incubaron los tubos, con la recta patrón y las muestras, a 45°C durante 40 minutos y 15 minutos en hielo, para detener la reacción. Finalmente se mide dicho contenido a 586 nm, obteniéndose resultados expresados en nmoles de MDA+4-HNE/g de proteína (Esterbauer & Cheeseman, 1990).



**Fig. 7** – Esquema en el que se muestra el proceso de lipoperoxidación. De Tim Vickers, vectorized by Fvasconcelos, translation by Matdrones - Image:Lipid peroxidation.svg, Dominio público, <https://commons.wikimedia.org/w/index.php?curid=3094440>

### Concentración de ATP

Esta prueba se basa en la bioluminiscencia que emite el ATP, existente en la muestra, gracias a la acción de un complejo enzimático constituido por la luciferina y la luciferasa. La cantidad de luz emitida durante la reacción será cuantificada por un luminómetro y nos servirá para medir la cantidad de ATP de la muestra. Previamente a la medición se elaborará una recta patrón mediante el uso del ATP Standard, el cual se irá diluyendo con cada punto de la recta. Posteriormente, se añadirán las muestras, se mezclará el ATP Assay Mix y el ATP Assay Mix Dilution Buffer y, finalmente, se añadirá esa mezcla tanto a la recta patrón como a los pocillos con la muestra. Los resultados obtenidos durante esta prueba se expresan en nmoles de ATP/g de proteína.



**Fig. 8** – Esquema, realizado en BioRender, en el que se muestra la conversión del ATP en energía lumínica gracias al complejo formado por la luciferina y luciferasa.

### Actividad enzimática de la catalasa

Para cuantificar la actividad enzimática de la catalasa se empleó el protocolo desarrollado por Lubinsky y Bewley (1979). A lo largo del experimento se necesitará tampón fosfato de sodio 50 mM a pH 7 y  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 mM, se mezclarán ambos compuestos justo antes de comenzar el ensayo para evitar la degradación del  $\text{H}_2\text{O}_2$ , siendo este compuesto fotosensible, por lo que la mezcla se mantendrá en oscuridad y en frío.

En este experimento no se necesita recta patrón, por lo que solo se necesitará el blanco ( $\text{dH}_2\text{O}$ ) y las muestras. Tras la adición de la mezcla, se mide la desaparición del  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 4 minutos, tomando medidas cada minuto, a 25 °C. Los resultados obtenidos de esta prueba se expresarán en  $\mu\text{moles de H}_2\text{O}_2/\text{minuto} * \mu\text{L de muestra}$ , ya que en este ensayo se mide la actividad de la catalasa referida a los moles de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumidos por miligramo de proteína del tejido, en este caso eritrocitos.

### Actividad enzimática de la superóxido dismutasa

Esta enzima presenta la capacidad para catalizar la dismutación de dos moléculas de oxígeno en  $\text{H}_2\text{O}_2$  y oxígeno molecular. Para poder cuantificar su actividad, se lleva a cabo un ensayo de autooxidación basado en la transformación de la hematoxilina en hemateína, un producto fruto de la oxidación de la hematoxilina por dos electrones. Este último presenta un grupo cromóforo rojo brillante con un máximo de absorbancia bien definido. Esa autooxidación, que sufre la hematoxilina, es inhibida por la SOD a un pH de entre 6,8-7,8. Para la realización de este experimento, es necesario extraer la enzima de las muestras de eritrocitos lisados y emplear una mezcla de etanol puro y cloroformo (65%-35% respectivamente). Tras esto se extrae el sobrenadante y se congela a -20 °C.

En cuanto a la determinación de su actividad se realiza a partir del protocolo desarrollado por Martin y Cols (1987) en el que se empleará tampón fosfato 50 mM a pH 7,5 + EDTA 0,1 mM, el cual ha de ser oxigenado durante 30 minutos a 4 °C y otros 30 a 25 °C antes de comenzar el ensayo. Durante la oxigenación es recomendable elaborar la disolución de hematoxilina 5 mM mediante la mezcla de la hematoxilina y tampón  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  50 mM, la cual ha de mantenerse en oscuridad puesto que la hematoxilina es fotosensible. Tras la última oxigenación se procede a la adición del blanco y las muestras, en una placa de 96 pocillos estándar, seguido de la mezcla de hematoxilina. La medida de la aparición de color se realiza a una longitud de onda de 560 nm durante 10 minutos, tomando medidas cada minuto, y a una temperatura de 25 °C.

Con este ensayo se mide la actividad asociada a las unidades de SOD presentes en la muestra, sabiendo que una unidad de SOD equivale a 0,039 unidades de absorbancia, según los resultados obtenidos en el laboratorio de la *Dra. Ana Coto Montes*. Por tanto, los resultados obtenidos se expresan como U de SOD/minuto \*  $\mu$ L de muestra y, como en los pocillos del control (blanco) carecen de SOD se producirá la autooxidación espontánea de la hematoxilina, por lo que a cada punto de la muestra habrá que restarle el valor del control correspondiente a dicho punto.

### Análisis estadístico

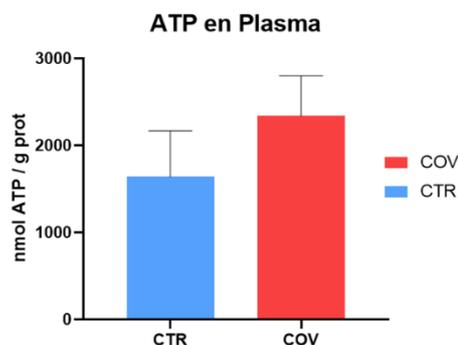
Los datos obtenidos de los experimentos anteriormente expuestos han sido comparados en función de si el paciente sufría CP (COV) o no (CTR). Para ello, se elaboró una prueba de Shapiro-Wilk, de forma que podemos evaluar su distribución normal, y también una prueba t-Student para muestras independientes y con la corrección Welch, ambas con un nivel de significación o confianza ( $\alpha$ ) de 0,05. Para la elaboración de los cálculos estadísticos y las gráficas de barras se empleó el programa Graphpad prism v8.0.2

A parte, se realizó un análisis biocomputacional a través de *Jupyter Notebook* y las librerías *NumPy*, *Matplotlib* y *Seaborn*. Se estandarizaron previamente los datos brutos del estudio (primer tipo) y, posteriormente, se calculó la media de los valores estandarizados, de cada biomarcador, para cada grupo (segundo tipo). Con el primer tipo de estandarización, se pudo elaborar un agrupamiento jerárquico, empleando el método “*Ward*” y la distancia euclidiana, y un “*Heatmap*”. El “*Heatmap*” permite aglutinar los ocho biomarcadores juntos, así como ver si los valores entre los grupos COV y CTR son altos o bajos con respecto a la media global del experimento. Esa correlación se refleja en el color que presenta cada paciente en cada uno de los marcadores biológicos. Cuanto más verde sea el color del paciente, más positiva será, y cuanto más roja, más negativa. Por tanto, presentar una correlación más positiva o negativa, en este caso, supondrá que dicho paciente presenta un nivel alto o bajo en un biomarcador determinado. Con el segundo tipo de estandarización, se elaboró un gráfico de tipo radar. El cálculo de las medias de los valores estandarizados se debió a que se pretendía una mejor visualización del gráfico y una representación global de las ocho variables. En el caso de emplear los valores estandarizados brutos, se tendrían que solapar los perfiles moleculares de cada paciente, añadiendo una mayor complejidad al gráfico y una peor visualización de ésta (Géron, 2019; *Matplotlib Documentation — Matplotlib 3.9.0 Documentation*, n.d.; *PYTHON CHARTS | Visualización de Datos Con Python*, n.d.).

## Resultados

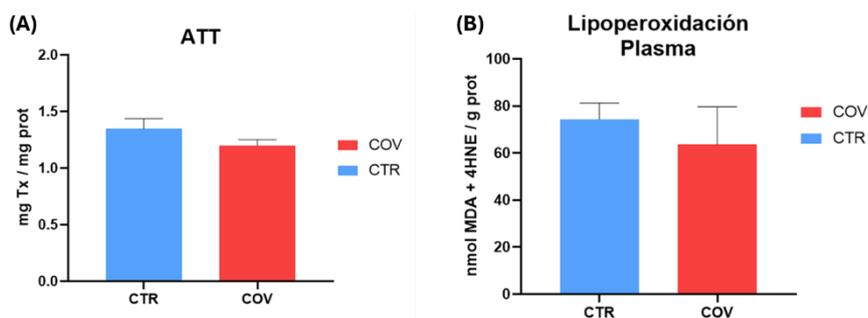
### Plasma

Los resultados obtenidos muestran que, en lo que respecta al perfil energético, los pacientes con COVID persistente presentan un mayor nivel de ATP (figura 9) que el grupo control, a pesar de que las diferencias no sean estadísticamente significativas, por lo que se trata de una tendencia que podría confirmarse ampliando el tamaño de la muestra. La media, con su desviación, del grupo COV fue de  $2339 \pm 462.5$  nmol ATP/g proteína, mientras que el del grupo CTR fue de  $1640 \pm 527.8$  nmol ATP/g proteína. En cuanto al análisis estadístico se obtuvo un p-valor de  $0.3433 > \alpha = 0.05$ .



**Fig. 9-** Gráfica en la que se muestran los niveles de ATP del grupo control (CTR) y grupo COVID persistente (COV). Nótese que los niveles del primer grupo son más bajos que los del segundo. Las barras de error se representan como SEM (Error Estándar de la Media). Los asteriscos hacen referencia al nivel de significación: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

En cuanto a los biomarcadores asociados a estrés oxidativo, que serían la actividad antioxidante total (figura 10.A) y la lipoperoxidación (figura 10.B). En ambos casos, no se observan diferencias significativas. Aun así, han mostrado tendencias que podrían apuntar hacia nuevas hipótesis distintas a las establecidas previamente, puesto que en el caso de la AAT ( $p$ -valor =  $0.1725 > \alpha = 0.05$ ), el grupo CTR presenta valores más elevados que el COV, siendo las medias, respectivamente, de  $1.347 \pm 0.089$  y  $1.199 \pm 0.053$  mg Trolox/mg proteína. En el caso de la lipoperoxidación ( $p$ -valor =  $0.5826 > \alpha = 0.05$ ), por el contrario, se observa un valor más elevado en el grupo COV ( $63.61 \pm 16.05$  nmol MDA+4-HNE/g proteína) que en el CTR ( $74.33 \pm 6.899$  nmol MDA+4-HNE/g proteína).

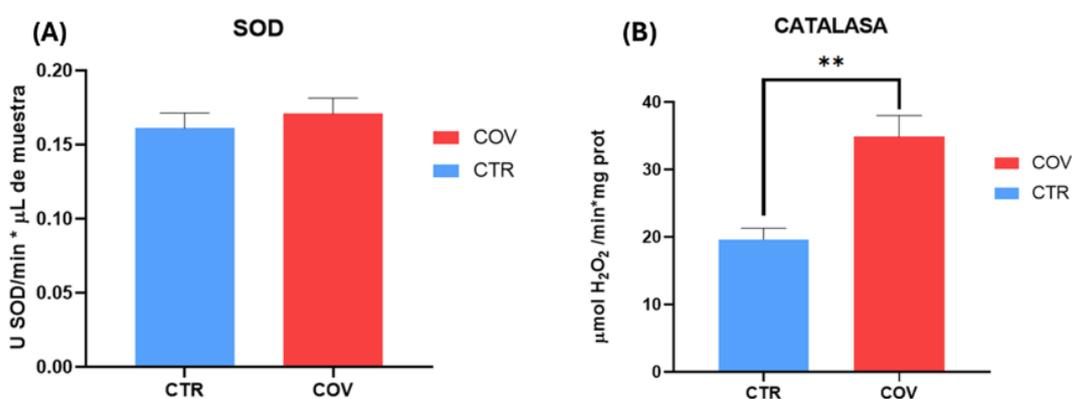


**Fig. 10-** Imagen izquierda (A), actividad antioxidante total (AAT) entre los grupos control (CTR) y pacientes COVID persistente (COV). Véase una ligera tendencia al alza en el caso del grupo CTR y a la baja en el grupo COV. Imagen derecha (B), niveles de lipoperoxidación del grupo CTR y COV, siendo éstos ligeramente más elevados en el grupo CTR, que en el COV. Las barras de error se representan como SEM (Error Estándar de la Media). Los asteriscos hacen referencia al nivel de significación: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

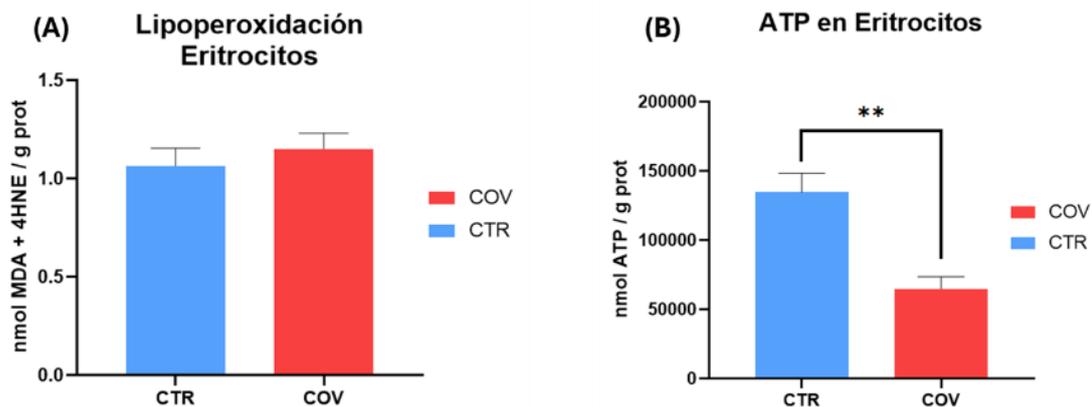
## Eritrocitos

Los eritrocitos han sido también estudiados desde el punto de vista oxidativo y metabólico. En lo que respecta a la parte relacionada con el perfil oxidativo. Los resultados asociados con la actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD), no presentaron diferencias significativas ( $p\text{-valor} = 0.5306 > \alpha = 0.05$ ) con el grupo control, tal y como se observa en la figura 11.A. Sin embargo, la actividad enzimática de la enzima catalasa (figura 11.B) muestra un incremento en sus valores en el grupo COVID persistente (COV), con respecto al grupo control (CTR). Los valores obtenidos, con sus desviaciones, en este experimento han sido de  $19.65 \pm 1.664$  y  $34.85 \pm 3.146$   $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \mu\text{L}$  muestra, para el grupo CTR y COV, respectivamente, dando lugar a diferencias estadísticamente significativas ( $p\text{-valor} = 0.0031 < \alpha = 0.05$ ). Por otra parte, se analizó la lipoperoxidación en los eritrocitos (figura 12.A). Los resultados mostraron que el desajuste enzimático observado previamente a nivel oxidativo en los eritrocitos no había inducido ningún daño lipídico subsecuente, ya que no se observaron diferencias estadísticas significativas ( $p\text{-valor} = 0.4872 > \alpha = 0.05$ ) entre ambos grupos.

En lo que hace referencia al perfil energético (figura 12.B) fruto del limitado metabolismo eritrocitario, los resultados muestran que el grupo COV presenta una clara pérdida de capacidad energética en comparación con el control, al verse reducida prácticamente a la mitad, con pronunciadas diferencias significativas ( $p\text{-valor} = 0.0017 < \alpha = 0.05$ ).



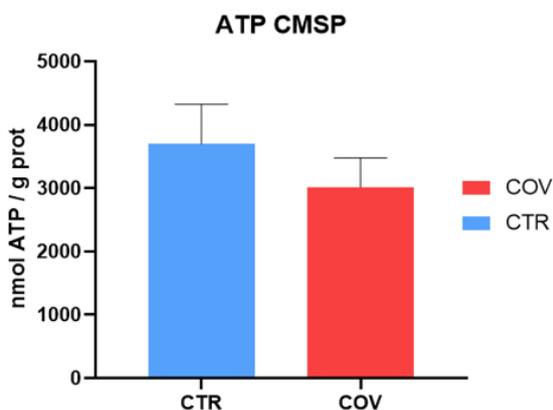
**Fig. 11-** Gráfica izquierda (A), actividad enzimática de la superóxido dismutasa (SOD) observada en los grupos CTR y COV sin diferencias significativas. Gráfica derecha (B), actividad enzimática de la catalasa presente en los grupos CTR y pacientes COV. Se observa una mayor actividad en el grupo COV que en el CTR. Las barras de error se representan como SEM (Error Estándar de la Media). Los asteriscos hacen referencia al nivel de significación: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .



**Fig. 12-** Gráfica izquierda (A), niveles de lipoperoxidación del grupo CTR y COV, sin diferencias significativas. Gráfica izquierda (B), niveles de ATP del grupo CTR y COV, siendo éstos mucho más elevados en el grupo CTR, que en el COV. Las barras de error se representan como SEM (Error Estándar de la Media). Los asteriscos hacen referencia al nivel de significación: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

### Células Mononucleares de Sangre periférica (CMSP)

Para poder valorar comparativamente la pérdida de capacidad energética, se estudiaron también los niveles de ATP en CMSP. En este caso, sin embargo, solo se observa una tendencia a la reducción en la producción de ATP en el grupo de COVID persistente (Figura 13) con un valor de  $p$ -valor =  $0.3958 < \alpha = 0.05$ . La gran dispersión de datos influye de forma significativa en la falta de diferencias estadísticas. Los valores de las medias, junto con sus desviaciones típicas, se localizan en la tabla 1.



**Fig. 13-** Niveles de ATP del grupo CTR y COV, siendo éstos algo inferiores en el grupo COV, que en el CTR. Las barras de error se representan como SEM (Error Estándar de la Media). Los asteriscos hacen referencia al nivel de significación: \*  $p \leq 0.05$ , \*\*  $p \leq 0.01$  y \*\*\*  $p \leq 0.001$ .

**Tab. 1-** Tabla resumen con los resultados de todos los biomarcadores estudiados, presentados como *media* ± *SEM* (desviación estándar de la media), y de los p-valores (*p*\*). Los *p*\* marcados en verde son aquellos que presentan valores inferiores a 0.01.

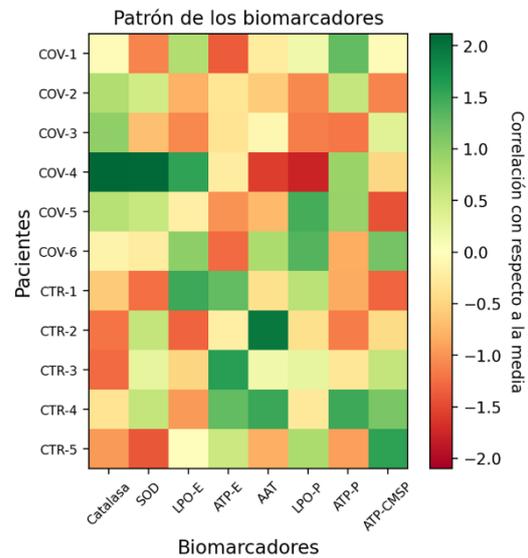
	Pacientes Control	Pacientes COV	<i>p</i> *
	Media (SEM)	Media (SEM)	
Actividad de la catalasa ( $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2/\text{min} \cdot \mu\text{L muestra}$ )	19.65 ± 1.664	34.85 ± 3.146	0.0031
Actividad de la SOD (U SOD/min $\cdot\mu\text{L muestra}$ )	0.161 ± 0.010	0.171 ± 0.016	0.5306
Lipoperoxidación (nmol MDA+4-HNE/g proteína)			
<i>Plasma</i>	74.33 ± 6.899	63.61 ± 16.05	0.5826
<i>Eritrocitos</i>	1.064 ± 0.091	1.151 ± 0.080	0.4872
Actividad Antioxidante Total (mg Trolox/mg proteína)	1.347 ± 0.089	1.199 ± 0.053	0.1725
Concentración de ATP (nmol ATP/g proteína)			
<i>Plasma</i>	1640 ± 527.8	2339 ± 462.5	0.3433
<i>Eritrocitos</i>	134575 ± 13749	64837 ± 8797	0.0017
<i>Células mononucleares de sangre periférica</i>	3699 ± 628.2	3016 ± 466.9	0.3958

\*El nivel de significación ( $\alpha$ ) de la diferencia entre las medias es 0.05

### Perfil molecular y *Heatmap* o matriz cromática

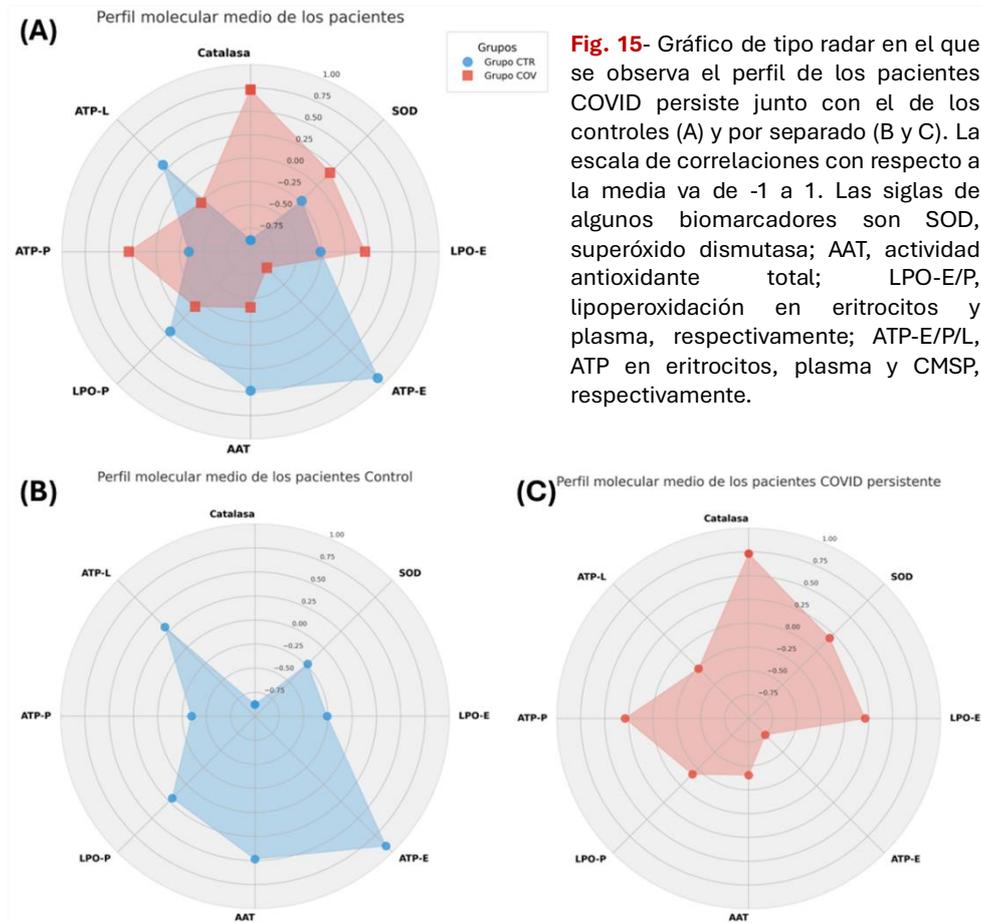
Uno de los puntos clave del estudio ha sido la construcción del perfil molecular, es decir, qué es lo que hace diferentes a los pacientes con COVID persistente (COV) de los pacientes sanos (CTR). Por ejemplo, los pacientes COVID persistente presentan unos niveles de ATP por debajo de la media (tonalidades rojizas), mientras que los pacientes control alta (tonalidades verdes), tal y como se observa en la figura 14.

Para presentar el perfil molecular de forma más visual e inteligible, se elaboraron gráficos de tipo radar (figura 15.A-C). Con este tipo de presentación de datos se pudo atisbar qué biomarcadores presentan altos o bajos niveles en ambos grupos. Los valores de la escala van de 1 a -1, queriendo expresar el primero mayor nivel o actividad y el segundo lo contrario, sin importar si dicha diferencia es o no significativa. Se pudo evidenciar que ambos perfiles son opuestos, presentando mayores niveles de ATP plasmático y actividades de SOD y Catalasa, al igual que un mayor



**Fig.14-** Heatmap en el que se relacionan los valores estandarizados de los pacientes COVID persistente (COV) y control (CTR) en cada uno de los biomarcadores. La escala de correlaciones con respecto a la media va de 2 a -2, habiendo un gradiente de color de verde (positivo) a rojo (negativo). Los pacientes se localizan en el eje Y y los biomarcadores en el X, siendo SOD, superóxido dismutasa; AAT, actividad antioxidante total; LPO-E/P, lipoperoxidación en eritrocitos y plasma, respectivamente; y ATP-E/P/CMSP, ATP en eritrocitos, plasma y células mononucleares de sangre periférica.

daño a nivel de membrana en los eritrocitos por lipoperoxidación, en el caso de los pacientes COVID persistente. Para el resto de los biomarcadores presentarían bajos niveles. Por otro lado, los pacientes control, presentan altos niveles de ATP en CMSP, actividad antioxidante total, ATP eritrocitario y lipoperoxidación plasmática. En los marcadores biológicos que faltan, presentarían bajos niveles.



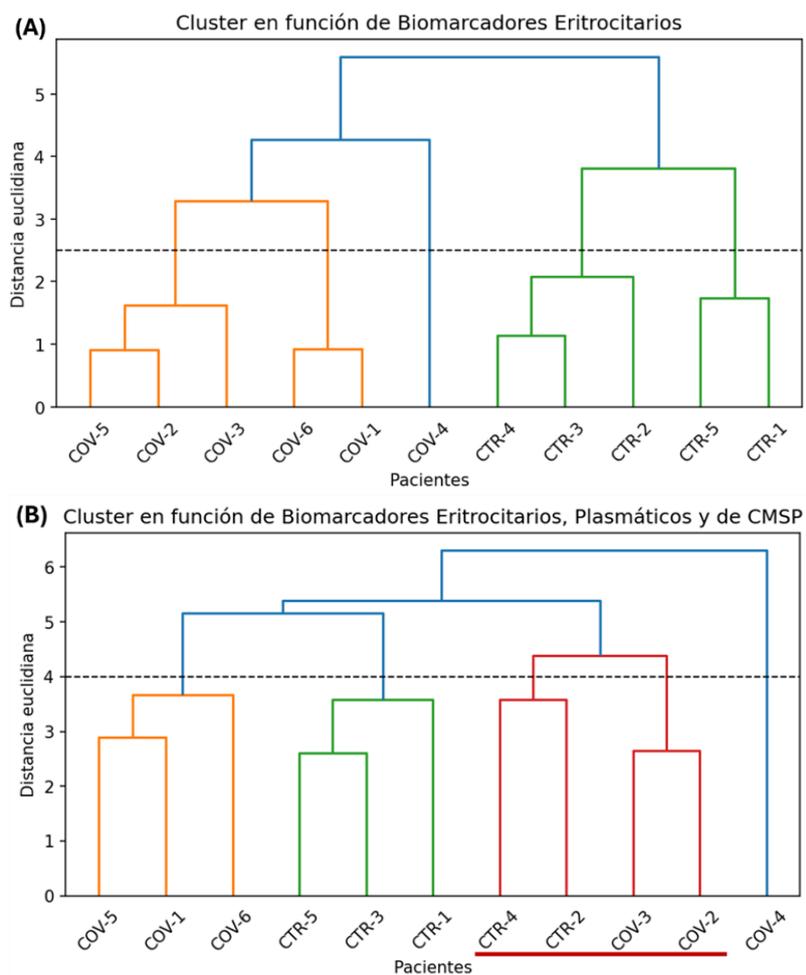
### Clasificación mediante agrupamiento jerárquico

El último punto importante de este estudio ha sido el agrupamiento jerárquico. Para organizar a los diferentes pacientes de los dos grupos citados, se empleó una clasificación de tipo no supervisada, esto significa que el algoritmo clasifica a los pacientes sólo con los datos que le damos, sin información previa. Este procedimiento, se basó en el método de *Ward*, para crear los *clusters*, y se calcularon las distancias entre ellos a través de la distancia euclidiana. La ventaja de esto es que nos permite predecir posibles agrupaciones que podrán ser corroboradas, o no, en futuros estudios. Por tanto, el objetivo de este punto es calibrar y predecir métodos de clasificación.

De los agrupamientos realizados solo destacó uno por su mayor precisión, el que empleó los biomarcadores eritrocitarios (figura 16.A). Esto no implica que los demás sean

erróneos, sino que son menos eficaces. Dicha eficacia sería realmente útil con una muestra poblacional mucho más elevada, mostrando actualmente esta representación solo como modelo de utilización. Por ejemplo, en la figura 16.A podemos ver que los pacientes COVID persistente (COV) se agrupan en un único bloque, dividido en 3 subgrupos, si hacemos un corte en 2,5 en la distancia euclidiana. Mientras que el grupo de los controles (CTR), también se organiza en un único bloque que se subdivide en 2 subgrupos. La presencia de subgrupos dentro del bloque COVID persisten, podría implicar la aparición de diferentes escalas de la enfermedad, pudiendo ser leve, moderado y grave.

Otro modelo, se muestra en la figura 16.B. En esta última se observan ciertos errores de clasificación, perdiéndose la homogeneidad que presenta la figura 16.A. Otro aspecto que destacar de es que se emplearon todos los marcadores biológico a la vez, por lo que, a pesar de tener ciertos errores (marcados a posteriori con una línea roja), no es una mala clasificación.



**Fig. 16-** Agrupamientos jerárquicos de los pacientes COVID persistente (COV) y control (CTR). El gráfico superior (A) corresponde a una agrupación basada en biomarcadores eritrocitarios, en los que se observan 2 bloques definidos y varios subgrupos (3 COV y 2 CTR). El gráfico inferior (B) muestra la clasificación en la que se tuvieron en cuenta todos los biomarcadores. Nótese ciertos fallos de clasificación en esta última gráfica (línea roja).

## Discusión

### Perfil oxidativo y antioxidativo en pacientes con COVID persistente

Los resultados obtenidos en plasma, a pesar de no revelar diferencias significativas, mostraron tendencias que indican que los pacientes con COVID persistente (COV) presentan una menor actividad antioxidante total AAT, lo cual es lógico ya que tal y como indican diversos investigadores, la COVID persistente podría derivarse de una respuesta autoinmune (Davis et al., 2023b; Ehrenfeld et al., 2020; Kozłowski et al., 2024; Phetsouphanh et al., 2022). En situaciones normales, la inflamación forma parte de los mecanismos defensivos del organismo para combatir determinados patógenos. Pero, cuando el sistema inmunitario se ve alterado, es posible que la inflamación se cronifique en el tiempo ocasionando graves daños, como sucede en los procesos autoinmunes (Duan et al., 2019; Xiang et al., 2023). El ecosistema inflamatorio es pro-oxidativo, ya que ciertas células del sistema inmunitario liberan radicales libres de oxígeno (ROS), entre otras moléculas, favoreciendo el estrés oxidativo y causando daños a nivel celular y tisular (Chatterjee, 2016; Ramos-González et al., 2024). Por ello, se consideraba esperable que estos pacientes presentasen una menor AAT, ya que, como se comentó anteriormente, la AAT es un constructo que engloba tanto a los antioxidantes adquiridos en la dieta como a los enzimáticos, siendo éstas la primera línea de defensa frente los ROS (Pham-Huy et al., 2008). Los resultados obtenidos en LPO no muestran diferencias significativas entre ambos grupos de estudio, causado, probablemente, por el reducido tamaño muestral, ya que en algún estudio consultado se han observado niveles de LPO más elevados en los pacientes COV que en los controles (Stufano et al., 2023), lo que encajaría tanto con los resultados obtenidos en nuestro trabajo para AAT como con la hipótesis planteada.

Los datos relativos al perfil oxidativo en eritrocitos han seguido el patrón indicado previamente, al mostrar para LPO, niveles ligeramente superiores en los pacientes COV, aun sin alcanzar diferencias significativas que coincide y ratifica resultados obtenidos en investigaciones previas (Chatzinikolaou et al., 2024; Laforge et al., 2020; Lechuga et al., 2023; Massaccesi et al., 2020). Los daños a nivel de membrana dan lugar a graves consecuencias: aumento en la permeabilidad y posible alteración de receptores membranales, aumento de la rigidez, cambios morfológicos, inhibición de determinadas enzimas metabólicas como se da en la glucólisis, pero sobre todo posible alteración de la capacidad de transporte del oxígeno, sin duda alguna la función más esencial del eritrocito en el organismo y con muy perjudiciales consecuencias a nivel sistémico. Además, según Laforge y colaboradores (Laforge et al., 2020), la LPO eritrocitaria puede conducir a un

bucle de retroalimentación positiva. Este bucle tiene lugar en el lumen de los vasos sanguíneos haciendo que los neutrófilos, procedentes de tejidos extravasculares o del lumen de los vasos, se reactiven continuamente. En el caso de los primeros, pasarían de los tejidos extravasculares al interior de los vasos. Gracias a las modificaciones membranales, inducidas por la LPO en los eritrocitos, contribuyen a la perpetuación del ambiente pro-oxidativo y dañando cada vez más a este tipo celular. De esta forma obtenemos eritrocitos disfuncionales, incapaces de cumplir con sus funciones de forma adecuada.

Además de la LPO, también se midieron las actividades enzimáticas de las enzimas responsable de la primera línea de defensa antioxidante: la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (CAT). Ambas enzimas reflejan niveles más elevados en pacientes COVID persistente (COV) que los sanos. Esto era esperable al hilo de los resultados obtenidos y de la hipótesis planteada, ya que son enzimas que se disparan ante incremento de radicales libres y en situaciones proinflamatorias (Pham-Huy et al., 2008; Rodríguez et al., 2020). La SOD lo que hará es transformar el anión superóxido en  $H_2O_2$  molécula que será convertido en agua y oxígeno por la catalasa, analizada en este estudio. Esta última, de forma análoga a SOD, mostró unos niveles de actividad significativamente más elevados en los pacientes COV que en los CTR. Hemos de destacar la significación estadística obtenida en un tamaño muestral tan reducido, ya que es indicativo, sin duda, de resultados mantenidos y elevados. Esto se debe a que la SOD y la CAT presentan una estrecha relación, siendo la última otro componente esencial frente al estrés oxidativo (Ighodaro & Akinloye, 2018). Aun cuando en nuestros datos se hace evidente la existencia de una conservada defensa enzimática antioxidante en estos pacientes, otros artículos parecen mostrar que incluso con estos incrementos, los niveles de  $H_2O_2$  en los pacientes COV (Stufano et al., 2023) siguen incrementándose. En ese caso, esta sería una problemática vía prooxidante abierta en dichos pacientes y que daría lugar a uno de los más dañinos radicales libres, el radical hidroxilo  $OH\cdot$  capaz de dañar cualquier biomolécula localizada en las proximidades.

### **Perfil energético en pacientes con COVID persistente**

A tenor de los resultados de ATP obtenidos en plasma, su elevada cantidad podría deberse a fenómenos de necrosis y apoptosis, lo cual puede ser indicativo de procesos inflamatorios (Trautmann, 2009), ya que a diferencia del ATP obtenido dentro de la célula, el presente en el plasma es resultado de la rotura de las células que liberan su contenido a sangre. Como se comentó previamente, una de las hipótesis planteadas acerca de la etiología de la COVID persistente es la autoinmunidad (Davis et al., 2023b; Ledford, 2022;

Morrow et al., n.d.). En la bibliografía consultada (Ehrenfeld et al., 2020; Kozłowski et al., 2024), se ha visto que el SARS-CoV-2 es capaz de activar determinadas vías proinflamatorias, dando lugar a una reacción inflamatoria más elevada de lo normal. Esto conlleva daños tisulares que pueden finalizar en procesos de necrosis y apoptosis, lo que implica la exposición de nuevos antígenos propios y favoreciendo, con ello, a la autoinmunidad. Además, algunas proteínas del virión comparten cierta analogía con proteínas humanas, lo cual podría inducir procesos autoinmunes. Como se mencionó en repetidas ocasiones, el estrés oxidativo puede ser el causante final del daño celular que, una vez muerta, liberarse el ATP, el cual actuaría como una molécula de señalización extracelular que indicaría al sistema inmunitario que se está produciendo un daño en una región específica del organismo (Dosch et al., 2018; Tanaka et al., 2014).

Existen sin embargo, estudios contrarios a los resultados que nosotros presentamos, que indican niveles de ATP, en este tipo de pacientes, inferiores a los pacientes sanos (Dosch et al., 2018). Por tanto, sería conveniente revisar esta variable en futuros estudios con un tamaño poblacional más amplio y con una mejor estratificación (sexo, edad, patologías previas...) aun cuando este tipo de mediciones pueden, en ocasiones, ser contaminadas por resultados propios exclusivamente del interior celular por lo que hay que ser especialmente cuidadosos en su medición y valoración. Creemos que esta puede ser una plausible explicación de los resultados obtenidos por dichos autores ya que, en nuestro caso, los niveles de esta molécula en eritrocitos han sido, significativamente inferiores en el caso de los pacientes COVID persistente en comparación con el grupo control, lo que podría explicar los datos presentados por Dosch y colaboradores (2018) y que parece más razonable a la vista de los resultados obtenidos. Hasta el momento parecen apoyar un daño evidente a nivel eritrocitario que podría inducir una reducción en los niveles eritrocitarios en el caso de los pacientes con COVID persistente, o bien una reducción en la producción de ATP en los eritrocitos. Ambas situaciones podrían explicarse a través del estrés oxidativo, tal y como se corrobora en la literatura consultada (Gov & Safran, 2005; Lechuga et al., 2023; Massaccesi et al., 2020; Orrico et al., 2023). El estrés oxidativo, en los eritrocitos, puede tener implicaciones graves, pudiendo llegar a inducir apoptosis o, en su defecto, necrosis. Esta sería una explicación que justificase dicha bajada, ya que los radicales libres de oxígeno (ROS) podrían interferir en diversas enzimas metabólicas. En el caso de la glucólisis, los ROS pueden inhibir enzimas importantes de esta ruta metabólica como la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa, piruvato quinasa y la fosfofructo quinasa 1. Esto va a provocar que el

eritrocito se quede sin la energía necesaria para llevar a cabo sus tareas eficazmente (Mullarky & Cantley, 2015).

A pesar de esto, en un artículo se analizaron los niveles de ATP/ADP eritrocitarios de pacientes con COVID persistente y sanos. La conclusión obtenida, fue que presentan niveles muy similares, algo inferiores en el caso de los primeros. Pese a esto, dichas diferencias no fueron significativas y estaríamos hablando, nuevamente, de ligeras tendencias (Romanowska-Kocajko et al., 2024) probablemente también dependientes del tamaño muestral. En lo que respecta a nuestro estudio, seguimos recalcando la limitación que implica tener un tamaño poblacional de 11 pacientes. En el estudio comentado, emplearon 39 pacientes, de los cuales 19 presentaban COVID persistente y 20 eran individuos sanos, que a nivel epidemiológicos sigue siendo claramente insuficiente.

Finalmente, hablaríamos sobre los niveles de ATP en células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Este conjunto de células inmunitarias se compone de diferentes tipos celulares (linfocitos T, B, *Natural killer*, monocitos y células dendríticas) que presentan un núcleo redondeado (Maecker et al., 2012). A estas células, se les hizo un ensayo para medir sus concentraciones de ATP. Los resultados indicaron que el grupo COVID persistente presentaba bajos niveles de ATP. Dichos resultados podrían indicar que existe una disfunción mitocondrial, lo cual hace que los niveles de ATP en estos tipos celulares disminuyan (Castro-Sepulveda et al., 2022; Guarnieri et al., 2023; Silva et al., 2023). Además, los bajos niveles de ATP también podrían venir del hecho de que el sistema inmunitario está agotado y por una serie de disfunciones, así como la producción de autoanticuerpos (Guarnieri et al., 2023; Phetsouphanh et al., 2022; Ruf, 2024; Silva et al., 2023). Esto respaldaría la hipótesis de que la COVID persistente se trata de una enfermedad autoinmune (Davis et al., 2023<sup>a</sup>) y apoyaría a los resultados obtenidos previamente a nivel eritrocitario. Por tanto, los datos obtenidos en este estudio sobre los niveles de ATP en CMSP podrían suponer la base de futuros estudios acerca de la regulación inmunitaria en este tipo de pacientes.

## Perfil molecular y clasificación de los pacientes

Mediante el uso de técnicas biocomputacionales, se consiguió realizar una serie de clasificaciones, unas más exitosas que otras. La que mejor rendimiento presentó fue la basada en caracteres eritrocitarios, obteniendo 3 grupos de pacientes COV. Varios investigadores consiguieron llegar a ese mismo número de grupos (Fischer et al., 2022; Mateu et al., 2023), pero basándose en los síntomas que padecían. No obstante,

recientemente un grupo de investigadores consiguió clasificar a los pacientes en 4 grupos en función de la localización de los síntomas, es decir, si el paciente presentaba alteraciones en el bombeo del corazón, dolor de pecho... se clasificaban como síntomas del aparato circulatorio (H. Zhang et al., 2022). Aun así, el hecho de haber llegado a la misma conclusión que otros investigadores, que contaban con un tamaño poblacional muy superior al analizado en este estudio, es indicativo de que los biomarcadores asociados al estrés oxidativo presentan un gran potencial a la hora de determinar la gravedad de estos pacientes. Aun así, este análisis presenta un inconveniente, y es que no se puede establecer la escala de gravedad de los pacientes, debido a que se necesitaría un tamaño poblacional más amplio y en el que se tuvieran en cuenta más factores (sexo, raza, edad...). Para concluir este estudio, falta destacar el papel del perfil molecular. No es más que un constructo que permite una mejor comprensión de lo que les sucede a los pacientes con COVID persistente. De esta forma, se podría decir, en términos generales, que la COVID persistente presenta un perfil más pro-oxidativo y menos energético, comparándolo con el perfil de una persona sana.

Se puede evidenciar que en 4 de los 5 biomarcadores asociados al estrés oxidativo (SOD, CAT, LPO en eritrocitos y en plasma ATP) son más elevados que en el grupo CTR, de acuerdo con lo observado en el gráfico. El único que faltaría sería la LPO de plasma. Mientras que en los biomarcadores energéticos muestran una menor cantidad de ATP en CMSP y eritrocitos en el grupo COV que en el CTR.

## **Limitaciones**

Este estudio adolece de varias limitaciones fácilmente soslayables en estudios posteriores y que ya han sido comentados con anterioridad. El primero de ellos sería el tamaño poblacional de la muestra. 11 individuos no aportan suficiente robustez estadística. Por tanto, los resultados obtenidos no podrían extrapolarse a la población con COVID persistente general. De ahí la necesidad de ampliarlo. Por otra parte, los datos ofrecidos por los pacientes son escasos, tan solo disponemos de la edad y el sexo, por lo que sería preciso obtener más datos clínicos y psicológicos, por si presentan algún tipo de patología que pudiera distorsionar los resultados. También destacar la falta individuos masculinos y la estratificación de las edades, ya que en este estudio sólo participaron mujeres de mediana edad.

## Conclusión

Los pacientes COVID persistente presentan alteraciones celulares sistémicas referidas a daño en la producción de energía y muerte celular compatibles con una desregulación de su balance oxidativo .

Catalasa se presenta como un potencial biomarcador de COVID PERSISTENTE que debería ser validado.

## Bibliografía

Alberts, B., Hopkin, K., Johnson, A., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2020).

*Introducción a la Biología Celular* (5ª edición, p. 832). Editorial Médica Panamericana.

Arnao, M. B., Cano, A., & Acosta, M. (2001). The hydrophilic and lipophilic contribution to total antioxidant activity. *Food Chemistry*, 73(2), 239–244.

[https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(00\)00324-1](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(00)00324-1)

Bai, F., Tomasoni, D., Falcinella, C., Barbanotti, D., Castoldi, R., Mulè, G., Augello, M., Mondatore, D., Allegrini, M., Cona, A., Tesoro, D., Tagliaferri, G., Viganò, O., Suardi, E., Tincati, C., Beringheli, T., Varisco, B., Battistini, C. L., Piscopo, K., ... Monforte, A. d. A. (2022). Female gender is associated with long COVID syndrome: a prospective cohort study. *Clinical Microbiology and Infection*, 28(4), 611.e9.

<https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.11.002>

Biswas, N., & Majumder, P. (2020). Analysis of RNA sequences of 3636 SARS-CoV-2 collected from 55 countries reveals selective sweep of one virus type. *The Indian Journal of Medical Research*, 151(5), 450.

[https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR\\_1125\\_20](https://doi.org/10.4103/IJMR.IJMR_1125_20)

Bradford, M. M. (1976). A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *ANALYTICAL BIOCHEMISTRY*, 72, 248–254.

Camini, F. C., da Silva Caetano, C. C., Almeida, L. T., & de Brito Magalhães, C. L. (2016). Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. *Archives of Virology* 2016 162:4, 162(4), 907–917. <https://doi.org/10.1007/S00705-016-3187-Y>

Castro-Sepulveda, M., Tapia, G., Tuñón-Suárez, M., Diaz, A., Marambio, H., Valero-Breton, M., Fernández-Verdejo, R., & Zbinden-Foncea, H. (2022). Severe COVID-19 correlates

with lower mitochondrial cristae density in PBMCs and greater sitting time in humans. *Physiological Reports*, 10(14), e15369.

<https://doi.org/10.14814/PHY2.15369>

Chatterjee, S. (2016). Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. *Oxidative Stress and Biomaterials*, 35–58. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803269-5.00002-4>

Chatzinikolaou, P. N., Margaritelis, N. V., Paschalis, V., Theodorou, A. A., Vrabas, I. S., Kyparos, A., D'Alessandro, A., & Nikolaidis, M. G. (2024). Erythrocyte metabolism. *Acta Physiologica (Oxford, England)*, 240(3). <https://doi.org/10.1111/APHA.14081>

Davis, H. E., McCorkell, L., Vogel, J. M., & Topol, E. J. (2023b). Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. *Nature Reviews Microbiology* 2023 21:3, 21(3), 133–146. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00846-2>

Dosch, M., Gerber, J., Jebbawi, F., & Beldi, G. (2018). Mechanisms of ATP Release by Inflammatory Cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(4). <https://doi.org/10.3390/IJMS19041222>

Duan, L., Rao, X., & Sigdel, K. R. (2019). Regulation of Inflammation in Autoimmune Disease. *Journal of Immunology Research*, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/7403796>

Ehrenfeld, M., Tincani, A., Andreoli, L., Cattalini, M., Greenbaum, A., Kanduc, D., Alijotas-Reig, J., Zinserling, V., Semenova, N., Amital, H., & Shoenfeld, Y. (2020). Covid-19 and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, 19(8), 102597. <https://doi.org/10.1016/J.AUTREV.2020.102597>

Esterbauer, H., & Cheeseman, K. H. (1990). [42] Determination of aldehydic lipid peroxidation products: Malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, 186(C), 407–421. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86134-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86134-H)

Fischer, A., Badier, N., Zhang, L., Elbéji, A., Wilmes, P., Oustric, P., Benoy, C., Ollert, M., & Fagherazzi, G. (2022). Long COVID Classification: Findings from a Clustering Analysis in the Predi-COVID Cohort Study. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 19(23). <https://doi.org/10.3390/IJERPH192316018/S1>

Géron, A. (2019). Hands-on Machine Learning with Scikit-Learn, Keras, and TensorFlow: Unsupervised learning techniques. *Hands-On Machine Learning with R*, 510.

- Giustarini, D., Dalle-Donne, I., Tsikas, D., & Rossi, R. (2009). Oxidative stress and human diseases: Origin, link, measurement, mechanisms, and biomarkers. *Http://Dx.Doi.Org/10.3109/10408360903142326*, 46(5–6), 241–281. <https://doi.org/10.3109/10408360903142326>
- Gov, N. S., & Safran, S. A. (2005). Red blood cell membrane fluctuations and shape controlled by ATP-induced cytoskeletal defects. *Biophysical Journal*, 88(3), 1859–1874. <https://doi.org/10.1529/BIOPHYSJ.104.045328>
- Guarnieri, J. W., Dybas, J. M., Fazelinia, H., Kim, M. S., Frere, J., Zhang, Y., Albrecht, Y. S., Murdock, D. G., Angelin, A., Singh, L. N., Weiss, S. L., Best, S. M., Lott, M. T., Zhang, S., Cope, H., Zaksas, V., Saravia-Butler, A., Meydan, C., Foox, J., ... Wallace, D. C. (2023). Core mitochondrial genes are down-regulated during SARS-CoV-2 infection of rodent and human hosts. *Science Translational Medicine*, 15(708). [https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABQ1533/SUPPL\\_FILE/SCITRANSLMED.ABQ1533\\_MDAR\\_REPRODUCIBILITY\\_CHECKLIST.PDF](https://doi.org/10.1126/SCITRANSLMED.ABQ1533/SUPPL_FILE/SCITRANSLMED.ABQ1533_MDAR_REPRODUCIBILITY_CHECKLIST.PDF)
- Gullberg, R. C., Jordan Steel, J., Moon, S. L., Soltani, E., & Geiss, B. J. (2015). Oxidative stress influences positive strand RNA virus genome synthesis and capping. *Virology*, 475, 219. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2014.10.037>
- Hardenbrook, N. J., & Zhang, P. (2022). A structural view of the SARS-CoV-2 virus and its assembly. *Current Opinion in Virology*, 52, 123–134. <https://doi.org/10.1016/J.COVIRO.2021.11.011>
- Hartenian, E., Nandakumar, D., Lari, A., Ly, M., Tucker, J. M., & Glaunsinger, B. A. (2020). The molecular virology of coronaviruses. *The Journal of Biological Chemistry*, 295(37), 12910–12934. <https://doi.org/10.1074/JBC.REV120.013930>
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z. L. (2020). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology* 2020 19:3, 19(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Ighodaro, O. M., & Akinloye, O. A. (2018). First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, 54(4), 287–293. <https://doi.org/10.1016/J.AJME.2017.09.001>

- Kozłowski, P., Leszczyńska, A., & Ciepiela, O. (2024). Long COVID Definition, Symptoms, Risk Factors, Epidemiology and Autoimmunity: A Narrative Review. *American Journal of Medicine Open*, 11, 100068. <https://doi.org/10.1016/J.AJMO.2024.100068>
- Laforge, M., Elbim, C., Frère, C., Hémadi, M., Massaad, C., Nuss, P., Benoliel, J. J., & Becker, C. (2020). Tissue damage from neutrophil-induced oxidative stress in COVID-19. *Nature Reviews Immunology* 20:9, 20(9), 515–516. <https://doi.org/10.1038/s41577-020-0407-1>
- Laue, M., Kauter, A., Hoffmann, T., Möller, L., Michel, J., & Nitsche, A. (123 C.E.). Morphometry of SARS-CoV and SARS-CoV-2 particles in ultrathin plastic sections of infected Vero cell cultures. *Scientific Reports* |, 11, 3515. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82852-7>
- Lechuga, G. C., Morel, C. M., & De-Simone, S. G. (2023). Hematological alterations associated with long COVID-19. *Frontiers in Physiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/FPHYS.2023.1203472>
- Ledford, H. (2022). How common is long COVID? Why studies give different answers. *Nature*, 606(7916), 852–853. <https://doi.org/10.1038/D41586-022-01702-2>
- Maecker, H. T., McCoy, J. P., & Nussenblatt, R. (2012). Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nature Reviews. Immunology*, 12(3), 191–200. <https://doi.org/10.1038/NRI3158>
- Massaccesi, L., Galliera, E., & Corsi Romanelli, M. M. (2020). Erythrocytes as markers of oxidative stress related pathologies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 191, 111333. <https://doi.org/10.1016/J.MAD.2020.111333>
- Mateu, L., Tebe, C., Loste, C., Santos, J. R., Lladós, G., López, C., España-Cueto, S., Toledo, R., Font, M., Chamorro, A., Muñoz-López, F., Nevot, M., Vallejo, N., Teis, A., Puig, J., Fumaz, C. R., Muñoz-Moreno, J. A., Prats, A., Estany-Quera, C., ... Massanella, M. (2023). Determinants of the Onset and Prognosis of the Post-COVID-19 Condition: A 2-Year Prospective Cohort Study. *SSRN*. <https://doi.org/10.2139/SSRN.4505315>
- Matplotlib documentation — Matplotlib 3.9.0 documentation*. (n.d.). Retrieved May 30, 2024, from <https://matplotlib.org/stable/>

- Morrow, D., Bermejo, L., van Gool, A., Langermans, J., Ruiz-Ruigomez, M., Aranzabal, L., Prado, J., Massanella, M., Cox, R., Langeland, N., de Gonzalo, D., Vilma, L., & Oldoni, E. (n.d.). EATRIS workshop “Identifying early clinical-relevant predictive biomarkers in patients at risk of Long Covid-19.” *28 de Junio de 2023*.
- Mullarky, E., & Cantley, L. C. (2015). Diverting Glycolysis to Combat Oxidative Stress. *Innovative Medicine*, 3–23. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-55651-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-4-431-55651-0_1)
- Myeloperoxidase - an overview | ScienceDirect Topics*. (n.d.). Retrieved August 22, 2023, from <https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/myeloperoxidase>
- Ordovás, J. M., Sánchez-Madrid, F., Ancochea, J., Guerrero, S., Mateu, L., Paredes, R., Rodríguez Ledo, P., & B. Soriano, J. (2022). *Informe del GTM sobre COVID persistente*.
- Orrico, F., Laurance, S., Lopez, A. C., Lefevre, S. D., Thomson, L., Möller, M. N., & Ostuni, M. A. (2023). Oxidative Stress in Healthy and Pathological Red Blood Cells. *Biomolecules 2023, Vol. 13, Page 1262, 13(8), 1262*. <https://doi.org/10.3390/BIOM13081262>
- Payne, S. (2017a). Introduction to RNA Viruses. *Viruses*, 97. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803109-4.00010-6>
- Peterhans, E. (1979). Sendai virus stimulates chemiluminescence in mouse spleen cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 91(1), 383–392. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(79\)90630-2](https://doi.org/10.1016/0006-291X(79)90630-2)
- Pham-Huy, L. A., He, H., & Pham-Huy, C. (2008). Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. *International Journal of Biomedical Science : IJBS*, 4(2), 89. <https://doi.org/10.59566/ijbs.2008.4089>
- Phetsouphanh, C., Darley, D. R., Wilson, D. B., Howe, A., Munier, C. M. L., Patel, S. K., Juno, J. A., Burrell, L. M., Kent, S. J., Dore, G. J., Kelleher, A. D., & Matthews, G. V. (2022). Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nature Immunology 2022 23:2, 23(2), 210–216*. <https://doi.org/10.1038/s41590-021-01113-x>
- PYTHON CHARTS | Visualización de datos con Python*. (n.d.). Retrieved May 30, 2024, from <https://python-charts.com/es/>

- Ramos-González, E. J., Bitzer-Quintero, O. K., Ortiz, G., Hernández-Cruz, J. J., & Ramírez-Jirano, L. J. (2024). Relationship between inflammation and oxidative stress and its effect on multiple sclerosis. *Neurologia*, 39(3), 292–301.  
<https://doi.org/10.1016/J.NRL.2021.10.003>
- Ravi, V., Saxena, S., & Panda, P. S. (2022). Basic virology of SARS-CoV 2. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 40(2), 182. <https://doi.org/10.1016/J.IJMMB.2022.02.005>
- Rodríguez, Y., Novelli, L., Rojas, M., De Santis, M., Acosta-Ampudia, Y., Monsalve, D. M., Ramírez-Santana, C., Costanzo, A., Ridgway, W. M., Ansari, A. A., Gershwin, M. E., Selmi, C., & Anaya, J. M. (2020). Autoinflammatory and autoimmune conditions at the crossroad of COVID-19. *Journal of Autoimmunity*, 114, 102506.  
<https://doi.org/10.1016/J.JAUT.2020.102506>
- Romanowska-Kocejko, M., Jędrzejewska, A., Braczko, A., Stawarska, K., Król, O., Frańczak, M., Harasim, G., Smoleński, R. T., Hellmann, M., & Kutryb-Zajac, B. (2024). Red Blood Cell Adenylate Energetics Is Related to Endothelial and Microvascular Function in Long COVID. *Biomedicines*, 12(3), 554.  
<https://doi.org/10.3390/BIOMEDICINES12030554/S1>
- Ruf, W. (2024). Immune damage in Long Covid. *Science*, 383(6680), 262–263.  
<https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ADN1077/ASSET/05E625E8-5EA8-401B-9EBE-14B7D4F30C68/ASSETS/GRAPHIC/SCIENCE.ADN1077-F1.SVG>
- Schwarz, K. B. (1996). Oxidative stress during viral infection: A review. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(5), 641–649. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(96\)00131-1](https://doi.org/10.1016/0891-5849(96)00131-1)
- Silva, B. S. de A., Pereira, T., Minuzzi, L. G., Padilha, C. S., Figueiredo, C., Olean-Oliveira, T., dos Santos, I. V. M., von Ah Morano, A. E., Marchioto Júnior, O., Ribeiro, J. P. J., Dos Santos, V. R., Seelaender, M., Teixeira, A. A., Dos Santos, R. V. T., Lemos, V. de A., Freire, A. P. C. F., Dorneles, G. P., Marmett, B., Olean-Oliveira, A., ... Lira, F. S. (2023). Mild to moderate post-COVID-19 alters markers of lymphocyte activation, exhaustion, and immunometabolic responses that can be partially associated by physical activity level— an observational sub-analysis fit- COVID study. *Frontiers in Immunology*, 14, 1212745. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1212745/FULL>
- Stufano, A., Isgrò, C., Palese, L. L., Caretta, P., De Maria, L., Lovreglio, P., & Sardanelli, A. M. (2023). Oxidative Damage and Post-COVID Syndrome: A Cross-Sectional Study in

- a Cohort of Italian Workers. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(8).  
<https://doi.org/10.3390/IJMS24087445>
- Tanaka, K., Choi, J., Cao, Y., & Stacey, G. (2014). Extracellular ATP acts as a damage-associated molecular pattern (DAMP) signal in plants. *Frontiers in Plant Science*, 5(SEP), 109682. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2014.00446/BIBTEX>
- Trautmann, A. (2009). Extracellular ATP in the immune system: more than just a “danger signal.” *Science Signaling*, 2(56). <https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.256PE6>
- Willrich, M. A. V. (2020). The complement system. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*, 391–412. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815499-1.00023-5>
- World Health Organization, Scoppettuolo, P., Borrelli, S., Naeije, G., Mizrahi, B., Sudry, T., Flaks-Manov, N., Yehezkelli, Y., Kalkstein, N., Akiva, P., Ekka-Zohar, A., Ben David, S. S., Lerner, U., Bivas-Benita, M., Greenfeld, S., Castanares-Zapatero, D., Chalou, P., Kohn, L., Dauvrin, M., ... Van den Heede, K. (2022). Post COVID-19 condition (Long COVID). *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 5(1), 100094.  
<https://www.who.int/europe/news-room/fact-sheets/item/post-covid-19-condition>
- Xiang, Y., Zhang, M., Jiang, D., Su, Q., & Shi, J. (2023). The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Frontiers in Immunology*, 14.  
<https://doi.org/10.3389/FIMMU.2023.1267091>
- Zhang, H., Zang, C., Xu, Z., Zhang, Y., Xu, J., Bian, J., Morozyuk, D., Khullar, D., Zhang, Y., Nordvig, A. S., Schenck, E. J., Shenkman, E. A., Rothman, R. L., Block, J. P., Lyman, K., Weiner, M. G., Carton, T. W., Wang, F., & Kaushal, R. (2022). Data-driven identification of post-acute SARS-CoV-2 infection subphenotypes. *Nature Medicine* 2022 29:1, 29(1), 226–235. <https://doi.org/10.1038/s41591-022-02116-3>
- Zhang, Y., Wang, Z., Chen, H., Chen, Z., & Tian, Y. (2014). Antioxidants: Potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. *International Journal of Infectious Diseases*, 24, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.02.011>
- Zoonotic Diseases | One Health | CDC. (n.d.). Retrieved February 29, 2024, from <https://www.cdc.gov/onehealth/basics/zoonotic-diseases.html>