

Could iron-chelation with EDTA and bloodletting/transfusion be a therapeutic option in COVID-19 worst scenario? Proposal for a protocol

S Mandolesi^{1,5}, A Cavezzi², A d'Alessandro^{3,5}, E Troiani⁴

¹Dept. of Clinical Internal, Anesthesiological and Cardiovascular Sciences, Sapienza University, Rome, Italy.

²Eurocenter Venalinfa, San Benedetto del Tronto, Italy

³Angiology Service, Teresa Masselli-Mascia Hospital, Local Health Authority of Foggia, Italy.

⁴Cardiology Unit, State Hospital, Social Security Institute, Cailungo, Republic of San Marino

⁵Scientific and Technological Park Technoscience, Latina, Italy

submitted: Jan 7, 2021, accepted: Mar 3, 2021, Epub Ahead of Print: Mar 20, 2021

Conflict of interest: None

DOI: [10.24019/jtavr.99](https://doi.org/10.24019/jtavr.99) - Corresponding author: Dr. Sandro Mandolesi, s.mandolesi@email.it

© 2020 Fondazione Vasculab impresa sociale ONLUS. All rights reserved.

Abstract COVID-19 is a complex, multi-organ disease where lungs are primarily affected, resulting in a form of ARDS in the later stages. In fact, a relevant role has been attributed to iron dysmetabolism and series of literature data highlight a clear-cut alteration in a few related parameters; significantly high figures of ferritin, hepcidin, red blood cell distribution width, lactate dehydrogenase and lactate, in combination with low levels of serum iron and transferrin, have been repeatedly reported in patients affected by Sars-Cov-2 infection at later stages. Overall, these alterations have a negative prognostic value, indicating a pattern of ferroptosis and of a possible dysfunctional hemoglobin, with pro-coagulant and pro-inflammatory repercussions. Different pathomechanisms have been proposed, from erythrocyte attack and an hepcidin-mimetic action of the viral spike proteins, to a more general iron and calcium deregulated intracellular accumulation.

Iron chelation has been advocated as one of the possible treatments of COVID-19 and CaNa₂ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) is known as a safe and effective mineral-chelator. In this review the authors propose an EDTA-based therapeutic protocol for those patients in most critical stages and admitted to intensive care unit, with the aim to reduce intracellular and blood ferritin overload. Bloodletting and blood transfusion have proved to be beneficial in patients with viral disease-associated iron accumulation. The inclusion of these two

procedures in the proposed protocol aims at improving oxygenation by new normo-functioning hemoglobin, while decreasing toxic hyperferritinemia and interleukins. Lastly, a few specific compounds are also taken into consideration to synergistically complement EDTA infusion. A series of technical details are provided for the possible use of the protocol in clinical practice.

Keywords COVID-19, Iron, Chelation Therapy, Bloodletting, Transfusion

1. Background

In the most advanced and critical stages, the new Coronavirus SARS-CoV-2 leads to acute respiratory distress syndrome (ARDS) and to the so-called multiple organ dysfunction syndrome (MODS). Invasive mechanical ventilation may fail to control these conditions adequately; an overall 41.6% mortality rate of COVID-19 patients who are admitted to intensive care unit (ICU) has been calculated¹, which is inducing to a possible reappraisal of the common ICU management of these patients.

2. Rationale

The conventional explanation of the pathophysiology of COVID-19 is based both on primary pulmonary degeneration, with consequent hypoxia, and on the virus-

induced deranged immunity and inflammatory pathways². The cascade of the pathogenic events may lead to the so-called “interleukin storm”, with an over-reaction of the two branches of immune system and the progressive deterioration of lung and of other organs. Coagulation alterations seem to contribute to MODS and ARDS in many cases, but an overall clear explanation for this series of viral multiple attacks sequences is still missing.

A series of complementary pathophysiological hypotheses have been proposed for COVID-19, based on clinical and instrumental findings, but also upon computational models and translational medicine³⁻⁵. Molecular docking and computational modelling have revealed that virus may induce a denaturation of hemoglobin⁶ and some laboratory data seem to confirm this hypothesis^{5 7}. Conversely, a few authors showed no dysfunctional hemoglobin in COVID-19 patients⁸, though hematological studies are being performed, so to have a more comprehensive view of this possible Sars-Cov-2 interaction with red blood cells (RBC).

The possible interaction between virus on one side, and erythrocytes and/or their precursors on the other side, is likely mediated by CD147 receptor. In fact, the latter is largely represented on RBC membrane (about 3000 receptors per single erythrocyte) and it was proven as one of the cell membrane entry-ports for the virus, together with ACE2 receptor and other minor ones³.

The dysfunctional quote of hemoglobin and the possible release of free heme in the blood stream may have a series of detrimental consequences, leading to hypoxemic hypoxia. The pulmonary pathologic component normally intervenes in the gas exchange impairment at later stages, when pneumolysis (lung cell deterioration) occurs⁹. Similarly, CO₂ blood levels remain stable in the early period, which testifies a probably normal lung parenchyma function in the first phase of the disease.

In the latest months, other possible pathomechanisms have been ascertained in COVID-19. In fact, literature data prove a Sars-Cov-2-induced iron dysmetabolism in the vast majority of the patients, especially in the most advanced cases^{3 5}.

Viral infections are usually characterized by an increase in storage of iron and oxygen deprivation¹⁰. In the case of COVID-19, iron tissue deposition has been attributed also to the increasingly higher levels of interleukins, namely interleukin 6, along the time. Pro-inflammatory pathways, interleukin rise in primis, are responsible for an increased synthesis and activity of hepcidin, an iron master-regulator hormone which intervenes to accumulate iron in the tissues, removing this

ion from blood, through an interaction with ferroportin on the cell membrane. An excess of hepcidin and/or an up-regulation of this physiologic mechanism leads to hyperferritinemia, hypoferrinemia and low serum transferrin, together with a series of multi-organ alterations caused by iron over-deposit inside the cells¹¹⁻¹³.

Of great interest, Ehsani found a molecular similarity between the distal portion of the spike protein of the virus and the aminoacidic constitution of hepcidin itself¹⁴. Through his research based on computational modelling, the author was able to highlight a hepcidin-like action by Sars-Cov-2, which thus involves a blockage of ferroportin on the cell membrane and ultimately a reduction in the release of iron from the tissues in the blood.

A series of concomitant mechanisms have been proposed to explain iron metabolism dysregulation in COVID-19¹⁵. In fact, hyperferritinemia and hypoferrinemia have been very frequently documented in the worst scenario patients (e.g. the ICU-admitted ones), or in the deceased subjects^{16 17}.

A possible combination of interleukin action on the hepcidin/ferroportin interaction, with the hepcidin-like activity of the virus spike proteins is probably at the root of tissue iron overdeposit.

Ferroptosis mechanism characterize cells when affected by an over-deposit of iron. This specific form of cell death/apoptosis strictly relates to the excess of iron-induced damage on mitochondria, with reduced glutathione activity, oxidative stress, lipoperoxidation and accelerated mitophagy^{11 12}.

An increasing body of evidence about the role of ferroptosis in COVID-19 is highlighted in literature^{3 18}. Iron accumulation in the tissues of various organs may typically occur in lung parenchyma¹⁹. This specific damage to the alveolar-capillary areas of the lungs can explain the secondary deterioration of gas exchange and interstitial pneumonia, specifically in those patients where the innate and adaptive immune system reaction has not been effective to reduce viral replication.

A further mechanism of systemic and pulmonary damage, with consequent hypoxia and tissue lesions, is likely represented by the formation of endovascular parafibrin (fibrinolysis-resistant), typical of iron dysmetabolism and ferroptosis^{20 21}.

In COVID-19, this thrombotic manifestation may usually involve distal vascular areas (acrosyndromes) in the first instance, which may be combined to the hypoxia-induced vasoconstriction; the resulting altered perfusion may induce chilblains, Raynaud phenomenon and more

relevant thromboembolic complications along the course of the disease^{3 22}.

In fact, several studies have reported the relevance of different forms of coagulopathy in COVID-19 prognosis²³, though the exact mechanisms involved in the arterial and/or venous thromboembolic events are still under scrutiny. A form of lung perfusion alteration has been agreed among researchers and clinicians²⁴, which can orientate COVID-19 therapy towards a more comprehensive approach.

Furthermore, anticoagulant or thrombolytic drugs have proven to be of some benefit, but inconclusive outcomes have been published so far^{25 26}. Lung and vessel micro/macro-thrombotic lesions are also linked to the excess of free radicals, which the overloaded native buffer antioxidant systems and the iron-intoxicated liver and macrophages are unable to cope with²⁷. Beyond the classical anti-viral therapies and the therapies based on corticoids, antibiotics and anticoagulants, a series of possible treatments have been hypothesized, exploiting a translational/integrative medicine approach³.

In this review, the specific ferroptosis issue is focused and a few related and targeted treatments are proposed, describing a detailed protocol for ICU-admitted patients.

Iron chelation in COVID-19 has been described by a few authors, using chelating agents such as deferoxamine or deferiprone, though no specific data have been released so far²⁸⁻³⁰. Other iron chelators, such as CaNa2ethylendiaminetetraacetic acid (EDTA), D-penicillamine, 2,3 dimercaptopropane-1-sulfonate and dimercaptosuccinic acid, could be taken into consideration as well³¹.

A few authors have hypothesized that by reducing ferritinemia and the consequent toxic action of iron in the tissues (primarily pulmonary), it is possible to reduce the negative inflammatory-immune evolution of this viral pathology^{3 28-30 32}.

More recently introduced iron chelators, such as deferoxamine and deferiprone, showed some efficacy in various iron accumulation pathologies like Hemochromatosis and β -Thalassemia³³.

The administration of EDTA, compared to deferoxamine and deferiprone, has some advantages. In fact, on one side EDTA is considered a safe chelating agent, provided a few general rules are respected (see below), on the other side it is an inexpensive compound, with a good profile of efficacy, especially in terms of neutralization of Fenton reaction and of free radical production^{34 35}.

It is known that deferiprone has some advantages over deferoxamine with regards to safety, but deferiprone may anyway induce a few adverse effects such as: agranulocytosis (0.6%), neutropenia (6%), musculoskeletal and joint pains (15%), gastrointestinal complains (6%) and zinc deficiency (1%)^{36 37}.

Next to the potential of iron chelation, EDTA can be associated to vitamin C, which is not possible with the other two chelators cited above. Lastly, EDTA may remove additional blood minerals such as calcium, aluminum, lead, mercury, cadmium³⁸.

It is important to remark that hypocalcemia, together with a probable and extremely detrimental over-concentration of intracellular calcium, characterize COVID-19 patients³⁹⁻⁴¹.

This feature specifically orientates the type of EDTA to use, as both NaEDTA and CaEDTA are potentially useful to chelate iron. Although both these chelators are heavy metal antagonists, they were originally approved for different uses and have different effects³⁸.

The use of NaEDTA may result in a substantial, and sometimes critical, decrease in serum calcium concentrations. As consequence, the use of CaEDTA was preferred in the present protocol, so to involve no specific risk for the already low calcemia in these patients.

Serum ferritin is adequately removed by CaEDTA, whereas a quote of serum iron undergoes a similar chelation, with 50% and 98% quota renal clearance after 6 and 24 hours respectively⁴². A further biochemical mechanism is consequently activated, as serum ferritin removal induces an osmotic gradient which ensures a further removal of iron from the tissues⁴³.

Another specific and extremely useful feature of EDTA, is its in vivo proven protective action on the endothelium^{44 45}; an endothelial damage has been repeatedly advocated as a core issue in COVID-19⁴⁶, hence we can speculate that EDTA beneficial action on the vascular endothelium would be an additional rationale for its use in these patients.

Lastly, EDTA has intrinsic in vitro anticoagulant chemical properties⁴⁷, which may render this compound suitable in COVID-19 patients, where a hypercoagulability state has been demonstrated.

Overall, CaEDTA may represent a multi-target and comprehensive chelating agent in these patients.

In combination with iron chelation, bloodletting and subsequent blood transfusion would have a complementary

role in selected cases, so to replace the removed ferritin-loaded blood, with some possible dysfunctional hemoglobin. Some literature data about bloodletting use in viral infections exists⁴⁸.

Little if no direct reference to bloodletting in COVID-19 has been published, though a few proponents claim the possible role of controlled phlebotomy in gas exchange alteration, which occurs in pneumonia of these patients⁴⁹. Conversely, some authors have reported preliminary experience with blood transfusion in COVID-19 patients⁵⁰. Regrettably, no conclusive recommendations may be extrapolated from the current limited clinical practice.

Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) has also been proposed as a treatment for very serious COVID-19 patients, but with controversial results^{51 52}. Moreover, ECMO may be complicated by hemorrhage and coagulopathy in COVID-19 patients^{53 54}.

Of interest, bloodletting through phlebotomy has also the additional advantage to remove the harmful metabolites, as it was shown in sickle cell disease⁵⁵.

3. Therapeutic Proposal

On the basis of the ascertained iron dysmetabolism in COVID-19, an original therapeutic approach to COVID-19 is proposed, including potential adjuvant interventions aimed at improving hemoglobin dysfunction and especially iron dysmetabolism, as well as aimed at reducing generalized hypoxic state.

The primary objective is to evaluate the effectiveness and safety of a therapy protocol as to above, for the patients admitted in ICU.

A series of specific interventions have been hypothesized, to target iron metabolism, hepcidin excess, the resulting ferroptosis, and the associated extreme oxidative stress in ICU patients.

Several compounds and drugs have proven their role in iron dysmetabolism and we hypothesize that they may be of interest in the advanced cases of COVID-19 as well.

Literature data show an hepcidin-antagonist effect of a few compounds such as heparin, spironolactone, curcumin, erythropoietin, lactoferrin; there are also potential drug candidates to antagonize hepcidin and/or enhance the activity of ferroportin⁵⁶. Similarly, a few compounds, such as vitamin C, glutathione, polyphenols, melatonin, vitamin D have a proven beneficial role in the dysregulated hemoglobin/iron/immune metabolic processes³.

Additionally, other specific injectable compounds and procedures with documented beneficial activities on iron metabolism and hemoglobin function are taken into consideration in this proposed protocol.

3.1 EDTA

Iron chelation represents the main therapeutic path proposed in this protocol. Scientific literature shows a clear effect of EDTA on the chelation of iron-ferritin, with a reduction in the production of free radicals; it follows a reduction of intracellular iron and ferritinemia, hence ferroptosis is fundamentally hindered.

Chelation by means of EDTA, a molecule with a polydentate, negatively charged pocket, leads to bonding with positively charged ions (e.g. iron, calcium), hence to their inactivation (as toxicants) and their excretion principally by renal mechanisms. EDTA has been used by medical community for chelation since 1940 and following to its approval by FDA for hypercalcemia, digitalis-induced arrhythmias or lead poisoning^{57 58}. In the past literature, EDTA employment in chronic degenerative diseases has been proposed as well³⁸, reporting interesting results in 2870 patients affected by chronic cardiac ischemia, autoimmune diseases, peripheral/cerebral vascular diseases⁵⁹. More recently EDTA has been employed for iron chelation, for example in patients with hyperferritin syndromes, such as hemochromatosis and thalassemia⁶⁰.

Overall, EDTA has been considered of value in hyperferritinemia and iron overload; moreover, its remarkable cost-benefit ratio has contributed to the diffusion of this therapy.

3.2 Other compounds

Due to the chelating action of EDTA on other minerals, such as magnesium, and on a few vitamins, some of these compounds are necessarily added in the final intravenously administered solution. The additional compounds included in the solution are Magnesium, B1 (thiamine) and B6 (pyridoxine) vitamins.

Vitamin B1 (thiamine) has shown a pro-immune and especially pro-erythrocyte action, in order to reduce free radicals and the consequent lactate, whose increase represents an indicator of poor prognosis in these patients^{61 62}.

Thiamine also plays a relevant decarboxylation action of pyruvate, before the latter may be transformed into lactic acid, which would impair ATP production.

A specific role for glutathione has been hypothesized in COVID-19, by virtue of its role on mitochondrial oxidative stress, which is typical of ferroptosis¹¹ (see the elevated figures of lactate and lactate dehydrogenase (LDH)). Glutathione has, among others, also beneficial effects on the hemoglobin molecule, reducing its glycation and protecting the heme component from oxidation³.

Vitamin C has been repeatedly advocated as a useful compound in COVID-19 patients, for its multiple actions on immunity, haemoglobin functionality and other beneficial anti-viral and anti-ARDS effects³; a few protocols concerning this form of treatment are being performed in COVID-19 patients^{3 63}.

3.3 Bloodletting and Transfusion

Bloodletting was used in the course of ARDS and especially in patients with systemic-blood infections. In the absence of clinical-experimental data on the potential of bloodletting in critical patients

affected by COVID-19, it is proposed here to use this method in a targeted manner and in conditions of ARDS. Removal of "infected" blood, overloaded with ferritin and oxygen-deprived blood, may induce an overall systemic improvement; in fact, a reduction of circulating heme/ferritin is expected with therapeutic phlebotomy, together with the induced production of new functioning precursors⁶⁴.

Blood transfusion immediately after bloodletting, represents a further possible option to introduce new normo-functioning haemoglobin, which may increase the oxygenation in hypoxic organs. This procedure has been already proposed for extremely critical patients infected by Sars-Cov-2, but as an isolated procedure, not in combination with bloodletting. Furthermore, blood transfusion has the purpose to equalise blood content after bloodletting, avoiding any decompensation in the basic blood components.

3.4 Design

Inclusion criteria for the admittance to the protocol are: COVID-19 patients admitted to ICU; exclusion criteria to be respected are the following: lack of patient's informed consent, renal insufficiency with creatinine level greater than 3 mg /dl.

Patients are prospectively enrolled and consequently submitted to the intravenous chelating therapy and bloodletting/transfusion regime, as to the details listed below.

In order to monitor the safety of the protocol, all the possible adverse events are to be recorded. Basically, the most common side effect of CaEDTA chelation is hypoglycaemia. In the case of bloodletting, hypotension, nausea, fever and urticaria have been reported in rare cases, which mostly regress rapidly and easily with usual therapies.

The statistical analysis includes the descriptive frequency and the level of significance of the group differences. The value of "p" "between" and "within" is to be calculated on the continuous and discontinuous variables. A p level <0.05 will be considered significant and 95% confidence intervals will be also calculated.

The protocol will be submitted to the respective Ethical Committee of the research facility and the patient's informed consent is required.

Table I summarizes the intravenously administrable multi-compound chelating treatment.

Literature data^{38 44 45} has proven the feasibility and safety of a pre-fixed dose of 2 g per day of CaEDTA in the vast majority of the possible applications.

When patients are affected by chronic renal insufficiency, with a creatinine level above 2 mg/dl, a specific attention is required to fix the proper daily dosage.

Specifically in these patients, it may be of importance to fix the CaEDTA maximal daily dose, as reported in previous literature^{57 58}. Overall, the maximal dose will never exceed 3 g per day in all cases.

3.6 Bloodletting/Transfusion Protocol

Table II summarizes the details of the proposed duration, calendar and practical features of the bloodletting/transfusion protocol.

Chelation may complement the conventional corticoid, immune, antiviral and anti-coagulant therapies which are performed in these patients. In fact, the reported experiences of chelation in COVID-19 have not detailed any similar issue, and a previous use of chelating agents in anticoagulated patients has been described as well^{57 58}.

3.7 Objectives of the protocol

The primary goal of the proposed protocol is to assess the efficacy on mortality rate.

To establish the efficacy of the proposed protocol, the primary parameters to be investigated concern: a) the time to achieve a clinical improvement, as to the modified early warning score changes⁶⁶; b) the changes in the ventilation regime and in the sequential organ failure assessment (SOFA)⁶⁷; c) the clinical course in the ICU or in the ward afterwards; d) the variations of most relevant blood/urine biomarkers and gas analysis variables.

Table III⁶⁸ describes the detailed items which are to be taken into consideration to assess the evolution of patient's condition under treatment.

4. Discussion

Intracellular iron in excess interacts with molecular oxygen, generating both ROS through Haber-Weiss and Fenton reactions, and reactive nitrogen species and sulfur species. Excess of intracellular iron leads also to ferroptosis, a process of apoptosis, which occurs due to a profound dysregulation of mitochondrial metabolism (primarily mitophagy) and an extremely marked lipoperoxidation.

Iron overload can also affect microbiota diversity (lungs and intestines) and blood coagulation as well. The vast majority of the publications consider high ferritin value a remarkable negative prognostic factor in COVID-19; similarly, elevated figures of lactate (sign of mitochondrial degeneration) and LDH (sign of hemolysis and of cellular necrosis), hypoferrinemia have been definitely associated with a worse prognosis. These biochemical imbalances express a degeneration of iron metabolism (and of hemoglobin dysfunction likely).

Table I
Multi-compound chelating therapy

CaEDTA up to 3 g (usually 2 g)
Ascorbic acid (sodium ascorbate) 10 g
Glutathione 1200 mg
Thiamine pyrophosphate 100 mg
Magnesium chloride 1 g
Pyridoxine 100 mg
Saline solution 500 ml

3.5 Dosages and Posology

The multi-compound chelating therapy is to be modulated according to a series of patient's clinical and instrumental parameters. In fact, some of these compounds are to be dosed in agreement to the renal function, serum glucose, arterial pressure and body weight⁶⁵.

Table II
Protocol calendar regarding chelation, bloodletting and blood transfusion

<p>Day 1 Morning: multicomponent chelating therapy, after 3 hours subsequent phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion Evening: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion</p>
<p>Day 2 Morning: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion Late afternoon: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion</p>
<p>Day 3 Morning: multicomponent chelating therapy, after 3 hours subsequent phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion Late afternoon: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion</p>
<p>Day 4 Morning: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion Late afternoon: phlebotomy and 400 ml bloodletting followed by 400 ml fresh whole blood transfusion</p>
<p>Following days The protocol repeats day by day the indications of day 1, 2, 3 and 4, until hypoxia symptoms improve or disappear</p>

Probably, the blood alterations cited above are also linked to the increasing inflammation and alteration of the immune process, which characterize COVID-19 course. Of interest, in these patients, the iron/hemoglobin-related deranged biomarkers reach levels which are not typical of the common inflammatory/infective diseases.

As a rule, viral infections typically induce iron overload in human organism. It is to be noted that in COVID-19 these extremely deranged values of ferritin, serum iron, lactate and other similar biomarkers, take place in a 10-15 days time-lapse. Furthermore, deceased or critical patients very often show this characteristic biochemical pattern.

As consequence, we may speculate that these hematologic and metabolic alterations may represent a primary expression of the pathomechanisms related to iron metabolism and, possibly, to hemoglobin functionality.

It is known that viral replication needs iron as a substrate for its enzymatic activities^{69 70}; hence any iron-depriving therapy could be of interest in these patients.

Most recent literature highlights the relevant prognostic value of iron homeostasis disorder and of high hepcidin values in COVID-19 patients⁷¹⁻⁷³. Similarly, ferroptosis is increasingly regarded as a core process in the evolution of the inflammatory and degenerating systemic processes, hence it is becoming a treatment target in these patients¹⁸. Since iron is present in RBC (60-70%), in the organs related to RBC metabolism, but also in respiratory enzymes (16%) and in muscle myoglobin (3-5%), it is understood how these tissues can be affected by the viral attack firstly.

Literature about chelation in COVID-19 is controversial⁷⁴. Overall, most authors have highlighted the two-fold higher ferritin level in non-survival patients over survivors; it has been advocated also that iron

chelators may benefit a series of iron overload-related detrimental reactions in blood, endothelium, lung and liver tissues. Bloodletting represents a rapid and simple method to deprive body of a quota of toxins and viral particles; moreover, therapeutic phlebotomy transiently reduces hemoglobin and ferritin.

In fact, artificial intelligence-based investigations have proven that initial higher hemoglobin level at hospital admittance, represents a negative prognostic factor in COVID-19 course⁷⁵.

Bloodletting represents an innovative option in these patients, as well as it was already employed in other liver or viral diseases in the past^{48 76 77}.

Transfusion is needed to avoid any imbalance in the main blood components after bloodletting; fresh blood may add functional hemoglobin, but inevitably the question arises about the supply of new iron and the hyperactivation of iron dysregulated homeostasis. Hence, a balanced dose-response protocol has been proposed above. In fact, the fresh iron load of the transfused blood components are under the influence of EDTA, which may hindrance a further iron dysmetabolism.

Table III
Monitored items to assess therapy efficacy

a) Modified Early Warning Score changes: 0-2 stable patient, 3-4 unstable, > 5 critical
b) Sequential Organ Failure Assessment: maximum SOFA score and mortality 0 to 6 < 10% ; 7 to 9 15 - 20%; 10 to 12 40 - 50%; 13 to 14 50 - 60%; 15 > 80%; 15 to 24 > 90%
c) Variations of most relevant blood/urine biomarkers and gas analysis variables such as: blood gas analysis, complete blood count (including red cell distribution width and reticulocytes), blood smear, homocysteine, C-reactive protein, serum iron, total iron binding capacity, ferritin, LDH, ALT, AST, Bilirubin, Creatinine, Troponin, IL6, TSH, lactate, calcemia

We acknowledge that bloodletting and transfusion may be complex procedures in ICU patients, but they are intended as short-living and life-rescue interventions in very critical patients, who usually undergo similar cumbersome therapies. Moreover, a limited necessity of fresh whole blood and in very selective cases are expected. However, our proposal is of preliminary nature, hence we expect that clinical practice will bring further refinements to subsequently complement our protocol.

5. Conclusion

In view of the probable virus interaction with iron metabolism and possibly with hemoglobin, a therapeutic strategy is proposed for critical ICU-admitted patients.

Two synergistic actions are hypothesized: a) the removal, through chelation therapy, of the overdeposit of iron, so to slow virus replication capacity and the intracellular damage, b) the replacement, by means of bloodletting followed by transfusion, of damaged cells (erythrocytes) and toxins (ferritin in excess etc.), with new functional blood cells/factors, so to help systemic oxygenation.

In critical patients admitted to ICU, under invasive or non-invasive ventilation, re-purposed or compassionate-use interventions may have a role. Our protocol is based on compounds and measures which have been validated for other, though similar, clinical conditions, not specifically for COVID-19 patients.

La chelazione del ferro con EDTA e la terapia mediante salasso / trasfusione potrebbe essere un'opzione nei pazienti critici affetti da COVID-19 ? Proposta di un protocollo

Abstract COVID-19 è una malattia complessa multiorgano in cui sono principalmente colpiti i polmoni, con una conseguente forma di insufficienza respiratoria acuta (IRA) nelle fasi successive. In effetti, un rilevante ruolo è stato attribuito al dismetabolismo del

ferro e numerosi lavori in letteratura evidenziano una netta alterazione di alcuni parametri correlati; valori significativamente elevati di ferritina, epcidina, ampiezza della distribuzione dei globuli rossi, lattato deidrogenasi e lattato, in combinazione con bassi livelli di ferro sierico

e transferrina, sono stati riportati ripetutamente in pazienti affetti da infezione da SARS-CoV-2 nelle fasi avanzate.

Nel complesso, queste alterazioni hanno un valore prognostico negativo, indicando una possibile presenza di ferroptosi e di emoglobina disfunzionale, con ripercussioni pro-coagulanti e pro-infiammatori. Diversi meccanismi patologici sono stati proposti, da un attacco agli eritrociti e un'azione epcidina-mimetica delle proteine spike virali, ad un più generale accumulo intracellulare di ferro e calcio.

La chelazione del ferro è stata proposta come uno dei possibili trattamenti del COVID-19 ed è noto come l'acido CaNa₂etilendiamminotetraacetico (EDTA) sia un chelante dei minerali sicuro ed efficace. In questo lavoro gli autori propongono un protocollo terapeutico basato sull'EDTA per quei pazienti nelle fasi più critiche e ricoverati in unità di terapia intensiva, con l'obiettivo di ridurre il sovraccarico di ferritina intracellulare e nel sangue. Salasso e trasfusioni di sangue si sono dimostrati utili nei pazienti con malattie virali associate all'accumulo di ferro. L'inclusione di queste due procedure nel protocollo proposto, mirano a migliorare l'ossigenazione con apporto di nuova emoglobina normofunzionante e diminuzione dell'iperferritinemia tossica e delle interleuchine. Da ultimo, vengono presi in considerazione anche alcuni composti specifici per completare sinergicamente l'infusione di EDTA. Sono forniti una serie di dettagli tecnici per l'eventuale utilizzo del protocollo nella pratica clinica.

1. Background

Nelle fasi più avanzate e critiche, il nuovo Coronavirus SARS-CoV-2 porta a una sindrome acuta da distress delle vie respiratorie (ARDS) e alla cosiddetta sindrome da disfunzione multipla d'organo (MODS). La ventilazione meccanica invasiva potrebbe non riuscire a controllare adeguatamente queste condizioni; è stato calcolato un tasso di mortalità complessivo del 41,6% dei pazienti COVID-19 ricoverati in unità di terapia intensiva (ICU)¹, il che sta inducendo a una possibile rivalutazione della gestione di questi pazienti in terapia intensiva.

2. Razionale

La spiegazione corrente della patogenesi del COVID-19 si basa sulla lesione primaria del polmone, con conseguente ipossia, e sullo squilibrio immunitario ed infiammatorio indotto dal virus². La cascata degli eventi patogeni può portare alla cosiddetta "tempesta interleuchinica", con una reazione eccessiva dei due rami del sistema immunitario e un progressivo deterioramento del polmone e di altri organi. Le alterazioni della coagulazione sembrano contribuire all'insorgenza di MODS e ARDS in molti casi, ma manca ancora una spiegazione complessivamente chiara per questa serie di sequenze di eventi patogeni scatenati dal virus.

Una serie di ipotesi patogenetiche sono state proposte per il COVID-19, basate sui risultati clinici e strumentali, ma anche su modelli computazionali e sulla medicina traslazionale³⁻⁵. Mediante le tecniche di molecular docking e la modellazione computazionale, si è evidenziato come il virus possa indurre una denaturazione della emoglobina⁶ e alcuni dati di laboratorio sembrano confermare questa ipotesi^{5,7}. Al contrario, alcuni autori non hanno mostrato l'esistenza di una emoglobina disfunzionale nei pazienti COVID-19⁸, tuttavia sono in corso studi ematologici, al fine di avere una visione più completa di questa possibile interazione della Sars-Cov-2 con i globuli rossi.

La possibile interazione tra virus da un lato, ed eritrociti e / o loro precursori dall'altro, è probabilmente mediata dal recettore CD147. In effetti, quest'ultimo è ampiamente rappresentato sulla membrana degli eritrociti (sono descritti circa 3000 recettori per singolo eritrocita) ed è stato dimostrato come lo stesso CD147 rappresenta una delle porte di ingresso sulla membrana cellulare per il virus, insieme al recettore ACE2 e ad altri minori³.

La eventuale alterazione disfunzionale dell'emoglobina, con il possibile rilascio di eme libero nel flusso ematico, può avere una serie di conseguenze dannose, che portano ad una sorta di ipossia ipossiémica. Di fatto, la componente patologica polmonare sembra normalmente intervenire nel deterioramento degli scambi gassosi in un secondo momento, quando si verifica la pneumolisi (deterioramento delle cellule polmonari)⁹. Allo stesso modo, i livelli di CO₂ nel sangue rimangono stabili nel periodo iniziale, il che testimonia come il parenchima polmonare probabilmente funzioni normalmente nella prima fase della malattia.

Negli ultimi mesi altri possibili patomeccanismi sono stati accertati nell'ambito del COVID-19. In effetti, i dati di letteratura dimostrano un dismetabolismo del ferro indotto dal Sars-CoV-2 nella maggior parte dei pazienti, soprattutto in quelli più critici^{3,5}.

Le infezioni virali sono generalmente caratterizzate da un aumento del deposito di ferro e deprivazione di ossigeno¹⁰. Nel caso di COVID-19, la deposizione di ferro nei tessuti è stata attribuita anche ai livelli sempre più elevati nel tempo di interleuchine, tra cui l'interleuchina 6. Multiple vie pro-infiammatorie, aumento delle interleuchine in primis, sono responsabili di una maggiore sintesi e attività di epcidina, un ormone regolatore del ferro che interviene per accumulare ferro nei tessuti, rimuovendolo dal sangue, attraverso un'interazione con la ferroportina sulla membrana cellulare. Un eccesso di epcidina e / o una sovra regolazione di questo meccanismo fisiologico porta ad iperferritinemia, iposideremia e bassa transferrina sierica, insieme a una serie di alterazioni

multiorgano causate da deposito eccessivo di ferro all'interno delle cellule¹¹⁻¹³. Con un articolo di grande interesse, Ehsani ha trovato una somiglianza molecolare tra la porzione distale della proteina spike del virus e la costituzione amminoacidica dell'epcidina stessa¹⁴. Attraverso la sua ricerca basata sulla modellazione computazionale, l'autore è stato in grado di evidenziare da parte del virus SARS-CoV-2 un'azione simile all'epcidina, il che comporta quindi un blocco della ferroportina sulla membrana cellulare ed, infine, una riduzione del rilascio di ferro dai tessuti nel sangue.

Una serie di meccanismi concomitanti sono stati proposti per spiegare la disregolazione del metabolismo del ferro nel COVID-19¹⁵. Infatti, iperferritinemia e iposideremia sono stati documentati molto spesso nello stato clinico avanzato di questi pazienti (es. quelli ricoverati in terapia intensiva) o nei soggetti deceduti^{16 17}.

Una possibile combinazione dell'azione dell'interleuchina sull'interazione epcidina / ferroportina, con l'epcidina che mima l'attività delle proteine spike del virus è probabilmente alla radice del sovradosaggio di ferro nei tessuti.

Il meccanismo di ferroptosi caratterizza le cellule quando risultano affette da un deposito eccessivo di ferro. Questa forma specifica di morte cellulare / apoptosi è strettamente correlata all'eccesso di ferro con danno dei mitocondri, ridotta attività del glutatione, stress ossidativo, lipoperossidazione e accelerazione della mitofagia^{11 12}.

La letteratura scientifica riporta un numero crescente di evidenze sul ruolo della ferroptosi nel COVID-19^{3 18}. L'accumulo di ferro nei tessuti può aversi in vari organi e tipicamente si verifica nel parenchima polmonare¹⁹. Questo danno specifico nelle aree alveolo-capillari dei polmoni può spiegare il deterioramento secondario degli scambi gassosi e la polmonite interstiziale, in particolare in quei pazienti in cui la reazione del sistema immunitario innato e adattativo non è stata sufficientemente efficace nel ridurre la replicazione virale.

Un ulteriore meccanismo di danno sistemico e polmonare, con conseguente ipossia e lesioni tessutali, è probabilmente rappresentato dalla formazione di parafibrina endovascolare (resistente alla fibrinolisi), tipica del dismetabolismo del ferro e della ferroptosi^{20 21}.

Nel COVID-19, questa manifestazione trombotica può di solito in prima istanza coinvolgere aree vascolari distali (acrosindromi), e può combinarsi con l'ipossia indotta dalla vasocostrizione; la risultante perfusione alterata può indurre geloni, fenomeno di Raynaud e altre rilevanti complicanze tromboemboliche nel corso della malattia^{3 22}.

In effetti, diversi studi hanno riportato la rilevanza di diverse forme di coagulopatia nella prognosi del COVID-19²³, sebbene gli esatti meccanismi coinvolti negli eventi tromboembolici arteriosi e / o venosi siano ancora sotto esame. Una forma di alterazione della perfusione polmonare è stata accettata da ricercatori e clinici²⁴, il che può orientare la terapia del COVID-19 verso un più completo approccio rispetto a quello incentrato sulla "polmonite".

Inoltre, farmaci anticoagulanti o trombolitici hanno dimostrato di essere di qualche beneficio, sebbene i risultati pubblicati sin qui siano ancora inconcludenti^{25 26}. Le lesioni micro / macro-trombotiche vascolari e polmonari sono comunque collegate all'eccesso di radicali liberi, cui i sistemi antiossidanti tampone sovraccaricati e quelli del fegato e dei macrofagi, intossicati dall'eccesso di ferritina non sono in grado di far fronte²⁷. Al di là delle terapie antivirali classiche e delle terapie a base di cortisonici, antibiotici e anticoagulanti, sono stati ipotizzati una serie di possibili trattamenti, sfruttando l'approccio della medicina traslazionale ed integrativa³.

In questa review viene focalizzato il problema specifico della ferroptosi e vengono proposti alcuni trattamenti correlati e mirati, descrivendo un protocollo dettagliato per i pazienti ricoverati in terapia intensiva.

Alcuni autori hanno già descritto le loro esperienze preliminari sulla chelazione del ferro nel COVID-19, utilizzando agenti chelanti come deferoxamina o deferiprone, sebbene non siano emersi sinora dati significativi²⁸⁻³⁰. Altri chelanti del ferro, come l'acido CaNa2ethylendiamminetetraacetico (EDTA), la D-penicillamina, il 2,3 dimercaptopropan-1-solfonato e l'acido dimercaptosuccinico potrebbero essere presi in considerazione³¹.

Alcuni autori hanno ipotizzato che riducendo la ferritinemia e la conseguente azione tossica del ferro nei tessuti (principalmente polmonari), sia possibile ridurre l'evoluzione immunitaria-infiammatoria negativa di questa patologia virale^{3 28-30 32}.

Chelanti del ferro introdotti più recentemente, come la deferoxamina e il deferiprone, hanno mostrato una certa efficacia in varie patologie da accumulo di ferro, quali l'Emocromatosi e la #-talassemia³³.

La somministrazione di EDTA, rispetto quella di deferoxamina e deferiprone, presenta alcuni vantaggi. Infatti, da un lato l'EDTA è considerato un agente chelante sicuro, a condizione che vengano rispettate alcune regole generali (vedi sotto), dall'altro è un composto poco costoso, con un buon profilo di efficacia, soprattutto in termini di

neutralizzazione della reazione di Fenton e della produzione di radicali liberi^{34 35}.

È noto che il deferiprone presenta alcuni vantaggi sulla deferoxamina per quanto riguarda la sicurezza, ma il deferiprone può comunque indurre alcuni effetti negativi come: agranulocitosi (0,6%), neutropenia (6%), dolori muscolo-scheletrici e articolari (15%), disturbi gastrointestinali (6%) e carenza di zinco (1%)^{36 37}.

Accanto all'effetto sulla chelazione del ferro, l'EDTA può inoltre essere anche associato alla vitamina C, cosa che non è possibile fare con gli altri due chelanti sopra citati. Infine, l'EDTA può rimuovere altri minerali del sangue e da tessuti, come calcio, alluminio, piombo, mercurio, cadmio³⁸.

È importante sottolineare che l'ipocalcemia, insieme ad una probabile ed estremamente dannosa iperconcentrazione di calcio intracellulare, caratterizzano i pazienti COVID-19³⁹⁻⁴¹.

Questa caratteristica orienta specificamente il tipo di EDTA da usare, poiché sia il NaEDTA che il CaEDTA sono potenzialmente utili per chelare il ferro. Sebbene entrambi questi chelanti siano considerati degli antagonisti dei metalli pesanti, essi sono stati originariamente approvati per usi diversi e hanno effetti fra loro diversi³⁸.

L'uso di NaEDTA può comportare una sostanziale, e talvolta critica, diminuzione della concentrazione del calcio sierico. Di conseguenza, l'uso di CaEDTA è stato preferito nel presente protocollo, al fine di evitare eventuali rischi a fronte della già bassa calcemia di questi pazienti.

La ferritina sierica viene adeguatamente rimossa dal CaEDTA, così come ugualmente il ferro sierico subisce una simile chelazione; il metabolismo di questi chelanti a base di EDTA si caratterizza peraltro con un 50% e 98% di clearance renale dopo rispettivamente 6 e 24 ore⁴². L'azione del CaEDTA sul ferro circolante attiva di conseguenza un ulteriore meccanismo biochimico, in quanto la rimozione della ferritina sierica induce un gradiente osmotico che assicura un'ulteriore rimozione del ferro dai tessuti⁴³.

Un'altra caratteristica specifica ed estremamente utile dell' EDTA, è la sua azione protettiva, già dimostrata in vivo, sull'endotelio^{44 45}. Un danno endoteliale è stato ripetutamente sostenuto e considerato di centrale importanza nel COVID-19⁴⁶, quindi possiamo ipotizzare che l'azione benefica dell'EDTA sull'endotelio vascolare possa rappresentare un motivo aggiuntivo per il suo utilizzo in questi pazienti.

Infine, l'EDTA ha una intrinseca azione anticoagulante in vitro, proprietà chimica che può rendere

questo composto interessante nei pazienti COVID-19⁴⁷, dove un'iper-coagulabilità è stata dimostrata.

Nel complesso, il CaEDTA può rappresentare un agente chelante multi-target e completo in questi pazienti.

In combinazione con la chelazione del ferro, il salasso e la successiva trasfusione di sangue avrebbero un ruolo complementare in casi selezionati, in modo da sostituire il sangue rimosso carico di ferritina e affetto da una possibile disfunzione emoglobinica. Esistono alcuni dati di letteratura sull'uso del salasso nelle infezioni virali⁴⁸.

La letteratura sulla salassoterapia è estremamente limitata, e senza alcun riferimento diretto al COVID-19. Tuttavia alcuni autori hanno rivendicato il possibile ruolo della flebotomia controllata sulle alterazioni dello scambio di gas, tipico della polmonite di questi pazienti⁴⁹. Al contrario, alcuni autori hanno riportato esperienze preliminari con trasfusioni di sangue nei pazienti COVID-19⁵⁰. Purtroppo, nessuna raccomandazione conclusiva può essere estrapolata dalla limitata pratica clinica.

L'ossigenazione extracorporea a membrana (ECMO) è stata proposta ugualmente come trattamento per pazienti molto gravi di COVID-19, ma con risultati controversi^{51 52}. Inoltre, si è visto come il trattamento mediante ECMO possa essere complicato da emorragia e coagulopatia in pazienti COVID-19^{53 54}.

È interessante sottolineare che anche il semplice salasso attraverso flebotomia ha l'immediato vantaggio di rimuovere i metaboliti nocivi, come è stato già dimostrato nei casi di anemia falciforme⁵⁵.

3. Proposta terapeutica

Sulla base dell'accertato dismetabolismo del ferro nel COVID-19, viene qui proposto un approccio terapeutico originale verso questa patologia infettiva, includendo anche potenziali interventi adiuvanti volti a migliorare la disfunzione dell'emoglobina e soprattutto dismetabolismo del ferro, oltre che mirati alla riduzione dello stato ipossico generalizzato.

L'obiettivo principale è valutare l'efficacia e la sicurezza di un protocollo di terapia come sopra, per i pazienti in terapia intensiva.

Sono stati ipotizzati una serie di interventi specifici, indirizzati al metabolismo del ferro, all'eccesso di epcidina, alla conseguente ferroptosi e verso l'estremo stress ossidativo presente nei pazienti in terapia intensiva.

Diversi composti e farmaci hanno dimostrato di avere un ruolo nel dismetabolismo del ferro e ipotizziamo che

possano risultare di interesse anche nei casi avanzati di COVID-19.

I dati di letteratura mostrano un effetto antagonista sull'epcidina da parte di alcuni composti come eparina, spironolattone, curcumina, eritropoietina, lattoferrina. Sono stati inoltre descritti anche farmaci specifici potenzialmente candidati ad antagonizzare l'epcidina e / o potenziare l'attività della ferroportina⁵⁶. Allo stesso modo, alcuni composti, come vitamina C, glutazione, polifenoli, la melatonina, la vitamina D hanno un comprovato ruolo benefico sulla disregolazione del sistema metabolico della emoglobina, del ferro e più in generale immunitario³.

Inoltre, in questo protocollo vengono presi in considerazione anche altri composti iniettabili specifici, nonché procedure con attività benefiche documentate sul metabolismo del ferro e sulla funzione dell'emoglobina.

3.1 EDTA

La chelazione del ferro rappresenta il principale percorso terapeutico proposto in questo protocollo. La letteratura scientifica mostra un chiaro effetto dell'EDTA sulla chelazione del ferro e della ferritina, con riduzione della produzione di radicali liberi. La conseguente riduzione del ferro intracellulare e della ferritinemia operata dall'EDTA risulta quindi benefica in termini di riduzione dei processi di ferroptosi.

La chelazione per mezzo dell'EDTA, una molecola con siti polidentati, caricati negativamente, porta al legame di ioni con carica positiva (es. ferro, calcio), quindi alla loro inattivazione (cosa che si verifica con altri metalli tossici) e infine alla loro escrezione principalmente mediante meccanismi renali. L'EDTA è stato utilizzato dalla comunità medica per la chelazione dei metalli sin dal 1940 e, in seguito alla sua approvazione da parte della FDA, per l'ipercalcemia, per le aritmie indotte dalla digitale, o per l'avvelenamento da piombo⁵⁷⁵⁸. In letteratura l'impiego dell'EDTA è stato proposto anche per malattie croniche degenerative³⁸, conseguendo ad esempio risultati interessanti in 2870 pazienti affetti da ischemia cardiaca cronica, malattie autoimmuni, malattie vascolari periferiche o cerebrali⁵⁹. Più recentemente l'EDTA è stato impiegato per la chelazione del ferro, ad esempio in pazienti con sindromi da ipersideremia, come emocromatosi e talassemia⁶⁰.

Nel complesso, l'EDTA è stato considerato indicato a livello clinico nella iperferritinemia e sovraccarico di ferro; inoltre, il suo notevole vantaggio in termini di costi benefici ha contribuito alla diffusione di questa terapia.

3.2 Altri composti

A causa dell'azione chelante dell'EDTA su altri minerali, come il magnesio, e su alcune vitamine, alcuni di questi composti sono necessariamente aggiunti nella soluzione finale somministrata per via endovenosa. Tra i composti aggiuntivi inclusi nella soluzione ricordiamo il magnesio, la vitamina B1 (tiamina) e B6 (piridossina).

La vitamina B1 (tiamina) si è dimostrata pro-immunitaria e soprattutto ad azione pro-eritrocitaria, per la sua azione riduttiva sui radicali liberi e il lattato, il cui aumento rappresenta peraltro un indicatore di prognosi negativa in questi pazienti infetti⁶¹⁶².

La tiamina svolge anche una rilevante azione di decarbossilazione del piruvato, prima che quest'ultimo possa essere

trasformato in acido lattico, il che comprometterebbe la produzione di ATP.

È stato ipotizzato un ruolo specifico per il glutatione nel COVID-19, in virtù del suo ruolo sullo stress ossidativo mitocondriale, tipico della ferroptosi¹¹ (vedi le concentrazioni elevate del lattato e lattato deidrogenasi (LDH) in questi pazienti). Il glutatione ha, tra gli altri, anche effetti benefici sulla molecola dell'emoglobina, riducendone la glicazione e proteggendo la componente eme dall'ossidazione³.

La vitamina C è stata ripetutamente sostenuta come un composto utile nei pazienti COVID-19, per le sue molteplici azioni sull'immunità, la funzionalità dell'emoglobina e per la sua documentata ulteriore azione antivirale e contro gli effetti dell'ARDS³. Sono stati pubblicati i primi studi documentanti un iniziale beneficio indotto da questa forma di trattamento in pazienti COVID-19³⁶³.

3.3 Salasso e trasfusione

Il salasso è stato utilizzato nel corso dell'ARDS ed in particolare in pazienti con infezioni sistemiche del sangue. In assenza di sperimentazioni cliniche sul potenziale effetto del salasso in pazienti critici affetti da COVID-19, si propone di utilizzare questo metodo in modo mirato e in condizioni di ARDS. La rimozione di sangue metabolicamente "infetto", sovraccarico di ferritina e privo di ossigeno, può indurre un miglioramento sistemico complessivo; infatti, mediante salassoterapia è legittimo attendersi una riduzione di eme / ferritina, unitamente alla produzione indotta di nuovi precursori midollari attivi⁶⁴.

La trasfusione di sangue subito dopo il salasso, rappresenta un'ulteriore possibile opzione per introdurre nuova emoglobina normofunzionante, che può aumentare l'ossigenazione negli organi ipossici. Questa procedura è già stata proposta per pazienti estremamente critici infettati da Sars-Cov-2, ma solo come procedura isolata, non in combinazione con il salasso. Inoltre, la trasfusione di sangue ha lo scopo di riequilibrare il contenuto di sangue dopo il salasso, evitando qualsiasi scompenso nei componenti di base del sangue.

3.4 Metodi

I criteri di inclusione per l'ammissione al protocollo sono: pazienti COVID-19 ricoverati in terapia intensiva; I criteri di esclusione sono i seguenti: mancanza del consenso informato del paziente, insufficienza renale con livello di creatinina superiore a 3 mg / dl.

I pazienti vengono arruolati prospetticamente e sottoposti alla terapia chelante endovenosa e al salasso / trasfusione, secondo i parametri di seguito elencati.

Al fine di monitorare la sicurezza del protocollo, tutti gli eventi avversi devono essere registrati. Il più comune effetto collaterale della chelazione con CaEDTA è l'ipoglicemia. Nel caso di salasso, l'ipotensione, la nausea, la febbre e l'orticaria sono stati segnalati in rari casi, che per lo più regrediscono rapidamente e facilmente con le terapie usuali.

L'analisi statistica include la frequenza descrittiva e il livello di significatività delle differenze di gruppo. Il valore di "p" "tra" i gruppi e all'interno del gruppo deve essere calcolato su variabili continue e discontinue. Un livello di $p < 0,05$ sarà considerato statisticamente significativo e verranno calcolati anche gli intervalli di confidenza al 95%.

Il protocollo sarà sottoposto al rispettivo Comitato Etico della struttura di ricerca; il consenso informato del paziente risulta obbligatorio.

Tabella I
Terapia chelante multicomponente

CaEDTA fino a 3 g (solitamente 2 g)
Acido ascorbico (ascorbato di sodio) 10 g
Glutazione 1200 mg
Tiamina pirofosfato 100 mg
Cloruro di magnesio 1 g
Piridossina 100 mg
Soluzione fisiologica 500 ml

3.5 Dosaggi e Posologia

La terapia chelante multi-composto deve essere modulata secondo una serie di parametri clinici e strumentali del paziente. Infatti, alcuni di questi composti devono essere dosati in accordo con la funzione renale, il glucosio sierico, la pressione arteriosa ed il peso corporeo⁶⁵.

La tabella I riassume la composizione del trattamento chelante multi-componente da somministrare per via endovenosa.

Dati di letteratura^{38 44 45} hanno dimostrato la efficacia e la sicurezza della dose prefissata di 2 g al giorno di CaEDTA nella stragrande maggioranza delle possibili applicazioni.

Quando i pazienti sono affetti da insufficienza renale cronica, con un livello di creatinina superiore a 2 mg / dl, è necessaria un'attenzione specifica per il corretto dosaggio giornaliero.

In particolare in questi pazienti, può essere importante adeguare la dose massima giornaliera di CaEDTA, come riportato nella letteratura precedente^{57 58}. Nel complesso, la dose massima non supererà mai i 3 g al giorno in tutti i casi.

3.6 Protocollo per salasso / trasfusione

La tabella II riassume i dettagli della proposta e le caratteristiche pratiche del protocollo di salasso / trasfusione.

La chelazione può integrare la terapia convenzionale con cortisonici, immunomodulatori, terapie antivirali e anticoagulanti, che vengono eseguite routinariamente in questi pazienti. In effetti, le esperienze di chelazione nel COVID-19 pubblicate negli ultimi mesi non hanno dettagliato alcun problema; l'uso di chelanti è stato descritto peraltro anche in pazienti in terapia con anticoagulanti^{57 58}.

3.7 Obiettivi del protocollo

L'obiettivo principale del protocollo proposto è di valutare la sua efficacia sul tasso di mortalità dei pazienti ricoverati per COVID-19 nei reparti di rianimazione.

Per stabilire l'efficacia del protocollo proposto, in primis i parametri da indagare riguardano: a) il tempo necessario per ottenere il miglioramento clinico, valutato con le variazioni del punteggio di allerta precoce modificato (MEWS)⁶⁶; b) il cambiamento del regime di ventilazione e della valutazione dell'insufficienza d'organo sequenziale (SOFA)⁶⁷; c) il tempo di decorso clinico in terapia intensiva o in

reparto; d) le variazioni dei biomarcatori di sangue ed urina più rilevanti e le variazioni dell'emogasanalisi.

La tabella III⁶⁸ descrive gli elementi dettagliati che devono essere presi in considerazione per valutare l'evoluzione delle condizioni del paziente sotto trattamento.

4. Discussione

Il ferro intracellulare in eccesso interagisce con le molecole di ossigeno, generando sia ROS attraverso le reazioni di Haber-Weiss e di Fenton, che specie reattive dell'azoto e dello zolfo. L'eccesso di ferro intracellulare porta anche alla ferroptosi, un processo di apoptosi, che avviene per una disregolazione profonda del metabolismo mitocondriale (in primo luogo mitofagia) e una lipoperossidazione estremamente marcata.

Il sovraccarico di ferro può anche influenzare la diversità del microbiota (polmoni e intestino) e la coagulazione ematica. La stragrande maggioranza delle pubblicazioni considera l'iperferritinemia un notevole fattore prognostico negativo nel COVID-19; allo stesso modo la presenza di elevate quantità di lattato (segno di degenerazione mitocondriale) e di LDH (segno di emolisi e di necrosi cellulare) e l'iposideremia sono stati associati a una prognosi peggiore. Questi squilibri biochimici esprimono una degenerazione del metabolismo del ferro (e probabilmente una disfunzione dell'emoglobina).

Probabilmente le alterazioni ematiche sopra citate sono in parte legate alla crescente infiammazione e alterazione del processo immunitario, tipiche del decorso del COVID-19. Da notare che, in questi pazienti, i valori alterati inerenti al metabolismo di ferro ed emoglobina raggiungono livelli che non sono tipici delle comuni malattie infiammatorie / infettive.

Di norma, le infezioni virali in genere inducono un sovraccarico di ferro nell'organismo umano. Va però sottolineato che nel COVID-19 questi valori estremamente alterati di ferritina, sideremia, lattato e altri biomarcatori simili intercorrono in un intervallo di tempo di soli 10-15 giorni. Inoltre, pazienti critici o deceduti molto spesso mostrano questi caratteristici profili biochimici.

Di conseguenza, possiamo ipotizzare che queste alterazioni ematologiche e metaboliche possano rappresentare l'espressione primaria dei meccanismi patologici legati al metabolismo del ferro e, probabilmente, alla funzionalità dell'emoglobina.

È noto che la replicazione virale necessita di ferro come substrato per le sue attività enzimatiche^{69 70}; da qui ne deriva che qualsiasi terapia che riduca la disponibilità di ferro potrebbe essere di interesse per questi pazienti.

Tabella II**Calendario del protocollo relativo a chelazione, salasso e trasfusione di sangue****Giorno 1**

Mattina: terapia chelante multicomponente; dopo 3 ore segue salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Sera: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml trasfusione di sangue intero fresco

Giorno 2

Mattina: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Nel tardo pomeriggio: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Giorno 3

Mattina: terapia chelante multicomponente, dopo 3 ore segue salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Sera: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml trasfusione di sangue intero fresco

Giorno 4

Mattina: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Nel tardo pomeriggio: Salasso di 400 ml seguito da 400 ml di trasfusione di sangue intero fresco

Giorni successivi

Il protocollo ripete giorno per giorno le indicazioni dei giorni 1, 2, 3 e 4, fino al miglioramento o alla scomparsa dei sintomi d'ipossia.

La letteratura più recente mette in luce una serie di dati circa il rilevante valore prognostico del disturbo dell'omeostasi del ferro e degli alti valori di epcidina nei pazienti COVID-19⁷¹⁻⁷³. Allo stesso modo, la ferroptosi è sempre più considerata un processo fondamentale nella evoluzione dei processi infiammatori e degenerativi sistemici, quindi essa stessa sta diventando un obiettivo del trattamento in questi pazienti¹⁸. Poiché il ferro è presente nei globuli rossi (60-70%), negli organi legati al metabolismo degli stessi eritrociti, ma anche negli enzimi respiratori (16%) e nella mioglobina muscolare (3-5%), si intuisce come questi tessuti possano essere influenzati dall'attacco virale sin dalle prime fasi.

La letteratura sulla chelazione nel COVID-19 è controversa⁷⁴. Nel complesso, la maggior parte degli autori ha evidenziato un livello di ferritina che risulta due volte più alto nei pazienti deceduti rispetto a quelli sopravvissuti; è stato anche sostenuto che i chelanti del ferro possono risultare benefici in una serie di reazioni dannose correlate al sovraccarico di ferro nel sangue, nell'endotelio e nei tessuti di polmoni e fegato. Il salasso rappresenta una procedura semplice e rapida per privare il

corpo di una quota di tossine e particelle virali; inoltre, la flebotomia terapeutica è in grado di ridurre transitoriamente l'emoglobina e la ferritina.

Di fatto, indagini basate sull'intelligenza artificiale hanno dimostrato che un livello iniziale di emoglobina più alto all'ammissione in ospedale, rappresenta un fattore prognostico negativo in corso di COVID-19⁷⁵.

Il salasso rappresenta un'opzione innovativa in questi pazienti, così come è stato già impiegato in passato per malattie epatiche o virali^{48 76 77}.

La trasfusione, come sottolineato, è necessaria per evitare qualsiasi squilibrio dei principali componenti del sangue dopo il salasso; il sangue intero aggiunge emoglobina funzionale, ma anche ferro e l'iperattivazione dell'omeostasi del ferro. Quindi, il protocollo proposto sopra risente della necessità del mantenimento di una serie di equilibri metabolici. In effetti, il carico di ferro e degli emocomponenti trasfusi sono sotto l'influenza dell'EDTA, che può quindi contribuire a mantenere in omeostasi il metabolismo del ferro.

Tabella III
Elementi monitorati per valutare l'efficacia della terapia

a) Variazioni del punteggio MEWS: 0-2 paziente stabile, 3-4 instabile, > 5 critico
b) Valutazione sequenziale dell'insufficienza d'organo: punteggio SOFA massimo e mortalità da 0 a 6 <10%; 7 a 9 15-20%; da 10 a 12 40-50%; da 13 a 14 50-60%; 15 > 80%; da 15 a 24 >90%
c) Variazioni dei biomarcatori sangue/urina più rilevanti e dei parametri correlati agli equilibri gassosi, come: emogasanalisi, emocromo completo (compresa l'ampiezza della distribuzione dei globuli rossi, RDW, e reticolociti), striscio ematico, omocisteina, proteina C-reattiva, ferro sierico, transferrina (TIBC), ferritina, LDH, ALT, AST, bilirubina, creatinina, troponina, IL6, TSH, lattato, calcemia

A fronte di questa proposta, si riconosce che il salasso e la trasfusione possono rappresentare procedure complesse nei pazienti in terapia intensiva, ma le stesse sono intese come interventi di breve durata e potenzialmente salvavita in pazienti molto critici, che di solito subiscono simili terapie complesse. Inoltre, si prevede una limitata necessità di sangue intero fresco, esclusivamente in casi molto selettivi. Tuttavia, la nostra proposta è di natura preliminare, quindi è lecito attendersi che la pratica clinica possa portare ulteriori perfezionamenti per completare successivamente il nostro protocollo.

5. Conclusione

In considerazione della probabile interazione del virus con il ferro e probabilmente con l'emoglobina, viene proposta una strategia terapeutica per i pazienti in fase critica ricoverati in terapia intensiva.

References

- 1) Armstrong RA, Kane AD, Cook TM. Outcomes from intensive care in patients with COVID-19: a systematic review and meta-analysis of observational studies. *Anaesthesia* 2020;75(10):1340-9.
- 2) Wiersinga WJ, Rhodes A, Cheng AC, Peacock SJ, Prescott HC. Pathophysiology, Transmission, Diagnosis, and Treatment of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): A Review. *JAMA* 2020;324(8):782-93.
- 3) Cavezzi A, Troiani E, Corrao S. COVID-19: hemoglobin, iron, and hypoxia beyond inflammation. A narrative review. *Clin Pract* 2020;10(2):1271.
- 4.) Edeas M, Saleh J, Peyssonnaux C. Iron: Innocent bystander or vicious culprit in COVID-19 pathogenesis? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2020;97:303-5.
- 5) Taneri PE, Gómez-Ochoa SA, Llanaj E, et al. Anemia and iron metabolism in COVID-19: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Epidemiol* 2020;35(8):763-73.
- 6) wenzhong liu, hualan L. COVID-19:Attacks the 1-Beta Chain of Hemoglobin and Captures the Porphyrin to Inhibit Human Heme Metabolism [Internet]. 2020 [cited 2021 Jan 1]. Available from: https://chemrxiv.org/articles/COVID-19_Disease_ORF8_and_Surface_Glycoprotein_Inhibit_Heme_Metabolism_by_Binding_to_Porphyrin/11938173/9
- 7) Lippi G, Mattiuzzi C. Hemoglobin value may be decreased in patients with severe coronavirus disease 2019. *Hematol Transfus Cell Ther* 2020;42(2):116-7.
- 8) DeMartino AW, Rose JJ, Amdahl MB, et al. No evidence of hemoglobin damage by SARS-CoV-2 infection. *Haematologica* 2020; Online ahead of print.
- 9) Gattinoni L, Chiumello D, Rossi S. COVID-19 pneumonia: ARDS or not? *Crit Care Lond Engl* 2020;24(1):154-154.
- 10) Yilmaz N, Eren E. Covid-19's passion for iron and fear of oxygen: Perhaps covid-19 craves the atmospheric environment in ancient times. 2020.

- 11) Cao JY, Dixon SJ. Mechanisms of ferroptosis. *Cell Mol Life Sci CMLS* 2016;73(11-12):2195-209.
- 12) Ganz T, Nemeth E. Heparin and iron homeostasis. *Biochim Biophys Acta* 2012;1823(9):1434-43.
- 13) Hirschhorn T, Stockwell BR. The development of the concept of ferroptosis. *Free Radic Biol Med* 2019;133:130-43.
- 14) Ehsani S. COVID-19 and iron dysregulation: distant sequence similarity between hepcidin and the novel coronavirus spike glycoprotein. *Biol Direct* 2020;15(1):19.
- 15) Yilmaz N, Eren E. Castleman disease and COVID-19 from hypothesis to evidence: anemia of inflammation and hepcidin. 2020 [cited 2021 Jan 1]; Available from: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.29468.10880>
- 16) Hippchen T, Altamura S, Muckenthaler MU, Merle U. Hypoferremia is Associated With Increased Hospitalization and Oxygen Demand in COVID-19 Patients. *HemaSphere* 2020;4(6):e492.
- 17) Henry BM, de Oliveira MHS, Benoit S, Plebani M, Lippi G. Hematologic, biochemical and immune biomarker abnormalities associated with severe illness and mortality in coronavirus disease 2019 (COVID-19): a meta-analysis. *Clin Chem Lab Med* 2020;58(7):1021-8.
- 18) Yang M, Lai CL. SARS-CoV-2 infection: can ferroptosis be a potential treatment target for multiple organ involvement? *Cell Death Discov* 2020;6(1):130.
- 19) Neves J, Haider T, Gassmann M, Muckenthaler MU. Iron Homeostasis in the Lungs—A Balance between Health and Disease. *Pharm Basel Switz* 2019;12(1):5.
- 20) Lipinski B, Pretorius E. Iron-induced fibrin in cardiovascular disease. *Curr Neurovasc Res* 2013;10(3):269-74.
- 21) Yilmaz N, Eren E. COVID-19: iron ferroptosis parafibrin. 2020 [cited 2021 Jan 1]; Available from: <http://rgdoi.net/10.13140/RG.2.2.16046.33607>
- 22) Tosti G, Barisani A, Queirolo P, et al. Skin signs resembling vascular acrosyndromes during the COVID-19 outbreak in Italy. *Clin Exp Dermatol* 2020;45(6):757-8.
- 23) Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, et al. Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med* 2020;134(4):1275-84.
- 24) Herrmann J, Mori V, Bates JHT, Suki B. Modeling lung perfusion abnormalities to explain early COVID-19 hypoxemia. *Nat Commun* 2020;11(1):4883.
- 25) Edler C, Schröder AS, Aepfelbacher M, et al. Correction to: Dying with SARS-CoV-2 infection—an autopsy study of the first consecutive 80 cases in Hamburg, Germany. *Int J Legal Med* 2020;134(5):1977.
- 26) Bikkdeli B, Madhavan MV, Jimenez D, et al. COVID-19 and Thrombotic or Thromboembolic Disease: Implications for Prevention, Antithrombotic Therapy, and Follow-Up. *J Am Coll Cardiol* 2020;75(23):2950-73.
- 27) Englisch CN, Tschernig T, Flockerzi F, Meier C, Bohle RM. Lesions in the lungs of fatal corona virus disease Covid-19. *Ann Anat - Anat Anz* 2021;234:151657.
- 28) Dalamaga M, Karampela I, Mantzoros CS. Commentary: Could iron chelators prove to be useful as an adjunct to COVID-19 Treatment Regimens? *Metabolism* 2020;108:154260.
- 29) Abobaker A. Can iron chelation as an adjunct treatment of COVID-19 improve the clinical outcome? *Eur J Clin Pharmacol* 2020;76(11):1619-20.
- 30) Perricone C, Bartoloni E, Bursi R, et al. COVID-19 as part of the hyperferritinemic syndromes: the role of iron depletion therapy. *Immunol Res* 2020;68(4):213-24.
- 31) Björklund G, Mutter J, Aaseth J. Metal chelators and neurotoxicity: lead, mercury, and arsenic. *Arch Toxicol* 2017;91(12):3787-97.
- 32) Liu W, Zhang S, Nekhai S, Liu S. Depriving Iron Supply to the Virus Represents a Promising Adjuvant Therapeutic Against Viral Survival. *Curr Clin Microbiol Rep* 2020;
- 33) Kuo KHM, Mrkobrada M. A systematic review and meta-analysis of deferoxamine monotherapy and in combination with deferoxamine for reduction of iron overload in chronically transfused patients with β -thalassemia. *Hemoglobin* 2014;38(6):409-21.
- 34) Born T, Kontoghiorghes CN, Spyrou A, Kolnagou A, Kontoghiorghes GJ. EDTA chelation reappraisal following new clinical trials and regular use in millions of patients: review of preliminary findings and risk/benefit assessment. *Toxicol Mech Methods* 2013;23(1):11-7.
- 35) Kontoghiorghes GJ. The proceedings of the 20th International Conference on Chelation held in the USA: advances on new and old chelation therapies. *Toxicol Mech Methods* 2013;23(1):1-4.
- 36) Kontoghiorghes GJ, Neocleous K, Kolnagou A. Benefits and risks of deferoxamine in iron overload in Thalassaemia and other conditions: comparison of epidemiological and therapeutic aspects with deferoxamine. *Drug Saf* 2003;26(8):553-84.
- 37) Kontoghiorghes GJ, Kontoghiorghes CN. Iron and Chelation in Biochemistry and Medicine: New Approaches to Controlling Iron Metabolism and Treating Related Diseases. *Cells* 2020;9(6).
- 38) Ferrero ME. Rationale for the Successful Management of EDTA Chelation Therapy in Human Burden by Toxic Metals. *BioMed Res Int* 2016;2016:1-13.
- 39) Di Filippo L, Formenti AM, Rovere-Querini P, et al. Hypocalcemia is highly prevalent and predicts hospitalization in patients with COVID-19. *Endocrine* 2020;68(3):475-8.
- 40) Dakal TC. SARS-CoV-2 attachment to host cells is possibly mediated via RGD-integrin interaction in a calcium-dependent manner and suggests pulmonary EDTA chelation therapy as a novel treatment for COVID 19. *Immunobiology* 2021;226(1):152021.
- 41) Cashman DP. Why the lower reported prevalence of asthma in patients diagnosed with COVID-19 validates repurposing EDTA solutions to prevent and manage treat COVID-19 disease. *Med Hypotheses* 2020;144:110027.
- 42) Johnson W, Heldreth B, Bergfeld WF, et al. Final Report of the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel on the Safety Assessment of Pelargonic Acid (Nonanoic Acid) and Nonanoate Esters. *Int J Toxicol* 2011;30(6_suppl):228S-269S.
- 43) Rudolph CJ, Mc Donagh EW, Barber RK. Effect of EDTA chelation on serum iron. *J Adv Med* 1991;4(1):40-4.
- 44) Fulgenzi A, Vietti D, Ferrero ME. EDTA Chelation Therapy in the Treatment of Neurodegenerative Diseases: An Update. *Biomedicines* 2020;8(8):269.

- 45) Foglieni C, Fulgenzi A, Ticozzi P, Pellegatta F, Sciorati C, Belloni D, Ferrero E, Ferrero ME. Protective effect of EDTA preadministration on renal ischemia. *BMC Nephrol*. 2006 Mar 15;7:5. doi: 10.1186/1471-2369-7-5. PMID: 16536881; PMCID: PMC1501003.
- 46) Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J*. 2020 Sep 1;41(32):3038-3044. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa623. PMID: 32882706; PMCID: PMC7470753.
- 47) Banfi G, Salvagno GL, Lippi G. The role of ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) as in vitro anticoagulant for diagnostic purposes. *Clin Chem Lab Med* 2007;45(5):565-76.
- 48) Tanaka N, Horiuchi A, Yamaura T, et al. Efficacy and safety of addition of minor bloodletting (petit phlebotomy) in hepatitis C virus-infected patients receiving regular glycyrrhizin injections. *J Gastroenterol* 2009;44(6):577-82.
- 49) Donnay AH. COVID-19 morbidity and mortality caused by endogenous carbon monoxide poisoning, with recommendations for testing and treatment [Internet]. *Open Science Framework*; 2020 [cited 2021 Jan 1]. Available from: <https://osf.io/uvj42>
- 50) Barriteau CM, Bochev P, Lindholm PF, Hartman K, Sumugod R, Ramsey G. Blood transfusion utilization in hospitalized COVID-19 patients. *Transfusion (Paris)* 2020;60(9):1919-23.
- 51) Savarimuthu S, BinSaeid J, Harky A. The role of ECMO in COVID-19: Can it provide rescue therapy in those who are critically ill? *J Card Surg* 2020;35(6):1298-301.
- 52) Hong X, Xiong J, Feng Z, Shi Y. Extracorporeal membrane oxygenation (ECMO): does it have a role in the treatment of severe COVID-19? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis* 2020;94:78-80.
- 53) Koeckerling D, Pan D, Mudalige NL, Oyefeso O, Barker J. Blood transfusion strategies and ECMO during the COVID-19 pandemic. *Lancet Respir Med* 2020;8(5):e40.
- 54) Zeng Y, Cai Z, Xianyu Y, Yang BX, Song T, Yan Q. Prognosis when using extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) for critically ill COVID-19 patients in China: a retrospective case series. *Crit Care Lond Engl* 2020;24(1):148.
- 55) Koehl B, Missud F, Holvoet L, et al. Continuous Manual Exchange Transfusion for Patients with Sickle Cell Disease: An Efficient Method to Avoid Iron Overload. *J Vis Exp* 2017;(121):55172.
- 56) Hawula ZJ, Wallace DF, Subramaniam VN, Rishi G. Therapeutic Advances in Regulating the Heparin/Ferroportin Axis. *Pharm Basel Switz* 2019;12(4):170.
- 57) Lamas GA, Ergui I. Chelation therapy to treat atherosclerosis, particularly in diabetes: is it time to reconsider? *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2016;14(8):927-38.
- 58) Lamas GA, Issa OM. Edetate Disodium-Based Treatment for Secondary Prevention in Post-Myocardial Infarction Patients. *Curr Cardiol Rep* 2016;18(2):20.
- 59) Olszewer E, Carter JP. EDTA chelation therapy in chronic degenerative disease. *Med Hypotheses* 1988;27(1):41-9.
- 60) Mobarra N, Shanaki M, Ehteram H, et al. A Review on Iron Chelators in Treatment of Iron Overload Syndromes. *Int J Hematol-Oncol Stem Cell Res* 2016;10(4):239-47.
- 61) Anwar A, Ahmed Azmi M, Siddiqui JA, Panhwar G, Shaikh F, Ariff M. Thiamine Level in Type I and Type II Diabetes Mellitus Patients: A Comparative Study Focusing on Hematological and Biochemical Evaluations. *Cureus [Internet]* 2020 [cited 2021 Jan 1]; doi: 10.7759/cureus.8027
- 62) Levy T, Richardson S, Coppa K, et al. Estimating Survival of Hospitalized COVID-19 Patients from Admission Information. 2020.
- 63) Liu F, Zhu Y, Zhang J, Li Y, Peng Z. Intravenous high-dose vitamin C for the treatment of severe COVID-19: study protocol for a multicentre randomised controlled trial. *BMJ Open* 2020;10(7):e039519.
- 64) Hughes GS, DeSmith VL, Locker PK, Francom SF. Phlebotomy of 500 or 750 milliliters of whole blood followed by isovolemic hemodilution or autologous transfusion yields similar hemodynamic, hematologic, and biochemical effects. *J Lab Clin Med* 1994;123(2):290-8.
- 65) Rozema TC. The Protocol for the Safe and Effective Administration of EDTA and Other Chelating Agents for Vascular Disease, Degenerative Disease, and Metal Toxicity. *J Adv Med* 1997;10(1):5-100.
- 66) Green M, Lander H, Snyder A, Hudson P, Churpek M, Edelson D. Comparison of the Between the Flags calling criteria to the MEWS, NEWS and the electronic Cardiac Arrest Risk Triage (eCART) score for the identification of deteriorating ward patients. *Resuscitation* 2018;123:86-91.
- 67) Lambden S, Laterre PF, Levy MM, Francois B. The SOFA score-development, utility and challenges of accurate assessment in clinical trials. *Crit Care Lond Engl* 2019;23(1):374.
- 68) Vincent JL, de Mendonça A, Cantraine F, et al. Use of the SOFA score to assess the incidence of organ dysfunction/failure in intensive care units: results of a multicenter, prospective study. Working group on "sepsis-related problems" of the European Society of Intensive Care Medicine. *Crit Care Med* 1998;26(11):1793-800.
- 69) Abobaker A. Reply: Iron chelation may harm patients with COVID-19. *Eur J Clin Pharmacol [Internet]* 2020 [cited 2021 Jan 1]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00228-020-02988-9>
- 70) Menshawey R, Menshawey E, Alserr AHK, Abdelmassih AF. Low iron mitigates viral survival: insights from evolution, genetics, and pandemics—a review of current hypothesis. *Egypt J Med Hum Genet* 2020;21(1):75.
- 71) Sonnweber T, Boehm A, Sahanic S, et al. Persisting alterations of iron homeostasis in COVID-19 are associated with non-resolving lung pathologies and poor patients' performance: a prospective observational cohort study. *Respir Res* 2020;21(1):276.
- 72) Zhou C, Chen Y, Ji Y, He X, Xue D. Increased Serum Levels of Heparin and Ferritin Are Associated with Severity of COVID-19. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res* 2020;26:e926178.
- 73) Lin Z, Long F, Yang Y, Chen X, Xu L, Yang M. Serum ferritin as an independent risk factor for severity in COVID-19 patients. *J Infect* 2020;81(4):647-79.
- 74) Garrick MD, Ghio AJ. Iron chelation may harm patients with COVID-19. *Eur J Clin Pharmacol* 2020;
- 75) Jiang X, Coffee M, Bari A, et al. Towards an Artificial Intelligence Framework for Data-Driven Prediction of Coronavirus Clinical Severity. *Comput Mater Contin* 2020;62:537-51.
- 76) Equitani F, Fernandez-Real JM, Menichella G, et al. Bloodletting Ameliorates Insulin Sensitivity and Secretion in Parallel

to Reducing Liver Iron in Carriers of HFE Gene Mutations. *Diabetes Care* 2008;31(1):3-8.

Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Hyperferritinemia: Evidence from a Case-Control Study. *Am J Gastroenterol* 2007;102(6):1251-8.

77) Valenti L, Fracanzani AL, Dongiovanni P, et al. Iron Depletion by Phlebotomy Improves Insulin Resistance in Patients With

