

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LAURA DE ARAUJO BORBA**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA  
INTESTINAL EM INDIVÍDUOS POSITIVADOS PARA COVID-  
19**

**CRICIÚMA  
2022**

**LAURA DE ARAUJO BORBA**

**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA  
INTESTINAL EM INDIVÍDUOS POSITIVADOS PARA COVID-  
19**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências da Saúde para obtenção do  
título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Gislaine Zilli  
Réus.

**CRICIÚMA  
2022**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

B726c Borba, Laura de Araujo.  
Caracterização da composição da  
microbiota intestinal em indivíduos  
positivados para COVID-19 / Laura de Araujo  
Borba. - 2022.

69 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do  
Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma,  
2022.

Orientação: Gislaíne Zilli Réus.

1. Covid-19 - Efeito fisiológico. 2.  
Microbioma gastrointestinal. 3. SARS-CoV-2.  
I. Título.

CDD 23. ed. 616.342

Bibliotecária Eliziane de Lucca Alosilla - CRB 14/1101  
Biblioteca Central Prof. Eurico Back - UNESC



**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE – UNESC  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO, INOVAÇÃO E  
EXTENSÃO DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
STRICTO SENSU**

**Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e  
Doutorado) Recomendado pela CAPES – Homologado pelo CNE – Portaria  
Nº 609 de 14.03.2019**

---

**ATA DE MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE – Nº 404**

Com início às 15h (quinze horas) do dia 4 (quatro) de outubro de 2022 (dois mil e vinte e dois), realizou-se, na Sala 308/Bloco R2 e via ferramenta digital *Google Meet*, o seminário formal de apresentação dos resultados da dissertação de Mestrado de **LAURA DE ARAUJO BORBA**, sob a orientação da **Profa. Dra. Gislaïne Zilli Réus**, intitulada “**CARACTERIZAÇÃO DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL EM INDIVÍDUOS POSITIVADOS PARA COVID-19**”.

A dissertação foi examinada por uma banca constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. Alexandra Ioppi Zugno (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, Prof. Dr. Emilio Luiz Streck (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada, e Profa. Dra. Cristiane Damiani Tomasi (Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC) – Conceito final: Aprovada. Com o resultado final: **APROVADA**, a aluna finalizou seus estudos em nível de Mestrado, fazendo jus ao grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Os trabalhos foram concluídos às 17h (dezesete horas), dos quais eu, Samiris Albano Pereira, Assistente Administrativo do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC lavrei a presente ata, que assino juntamente com o Prof. Dr. Emilio Luiz Streck, Coordenador do Programa. Criciúma, 04 (quatro) de outubro de 2022 (dois mil e vinte e dois).

**Prof. Dr. Emilio Luiz Streck**  
Coordenador do PPGCS

**Samiris Albano Pereira**  
Assistente Administrativo

## **FOLHA INFORMATIVA**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver com adaptações descritas na Resolução n. 7/2015 do Colegiado e será apresentada no formato tradicional.

Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Psiquiatria Translacional, pertencentes ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e em laboratório de apoio pertencente ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre/RS.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha orientadora Gislaïne Zilli Réus por todos ao ensinamento, oportunidades, incentivo e principalmente pela amizade construída ao longo desses anos trabalhando juntas.

A Camila Orlandi Arent Fernandes pela parceria e amizade criada ao longo da convivência no laboratório.

A toda equipe do Laboratório de Psiquiatria Translacional principalmente a Unidade de Pesquisa em Depressão, que de alguma forma contribuiu com o trabalho e compartilhou seus conhecimentos e experiências, em especial: Taiane Cardoso, Tatiana Barichello, Vijayasree Vayalanellore Giridharan e todos os colegas de iniciação científica.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, pela aprendizagem proporcionada em nosso convívio.

Aos meus colegas, em especial: Beatriz da Costa Chede, Eduarda Behenck Medeiros e Maiara de Aguiar da Costa que estiveram do meu lado apoiando, incentivando e fazendo esta jornada mais leve e feliz.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos para a realização do mestrado.

Finalmente, agradeço a minha família, meus pais, Valéria de Araujo e Régis Jurê Borba, e namorado, Guilherme Lodetti, pelo carinho, apoio e amor que me dedicam todos os dias durante essa caminhada e possibilitaram eu realizar o mestrado da melhor forma possível.

## RESUMO

A covid-19, doença causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), foi declarada uma pandemia em março de 2020 e desde então vem afetando indivíduos no mundo todo. Apesar de o sistema pulmonar ser o principal sistema acometido, indivíduos com covid-19 também desenvolvem sintomas gastrointestinais. Além disso, receptores da enzima ECA2, local de ligação do vírus para infectar a célula, são encontrados em células do intestino, sugerindo que o SARS-CoV-2 seria capaz de afetar o sistema gastrointestinal e causar alterações na microbiota intestinal. Assim, o objetivo do presente estudo foi investigar alterações na microbiota intestinal em sujeitos positivos para covid-19. Foi um estudo transversal integrado a um estudo maior com o objetivo de investigar o impacto da covid-19 na saúde mental. Para análise da microbiota intestinal foram incluídos 45 indivíduos controles (sem covid-19) e 18 indivíduos com covid-19 (casos). Foram coletadas informações sociodemográficas. Além disso, foi realizada extração do DNA da amostra fecal e analisada a região V4 do gene *16S*. Os resultados demonstraram que não houve diferença entre casos e controles quando analisada a diversidade- $\alpha$  (relativo à riqueza de espécies). Porém, na diversidade- $\beta$  (relativo à composição das espécies entre os grupos) ocorreu uma diferença entre casos e controles tanto na análise ponderada quanto não ponderada. Na análise taxônomica houve uma redução da classe Verrucomicrobiae e do gênero *Akkermansia*, e um aumento dos gêneros *Lachnospira*, *Muribaculaceae* e *Mitsuokella* na microbiota de indivíduos casos. Os resultados indicam que a covid-19 realmente é capaz de influenciar na composição da microbiota intestinal, tanto em sua riqueza e abundância quanto na sua diversidade.

**Palavras-chave:** Covid-19; Microbiota intestinal; SARS-CoV-2.

## ABSTRACT

Covid-19, a disease caused by the Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2), was declared a pandemic in March 2020, and has ever since, affecting individuals worldwide. Although the pulmonary system is the main target of this disease, it may also cause gastrointestinal symptoms. In addition, ACE2 receptor enzymes, which are the binding site of the virus to infect the cell, are also found in gut cells, suggesting that SARS-CoV-2 would be able to affect the gastrointestinal system and modify the gut microbiota. Thus, the aim of the present study was to investigate changes in gut microbiota in covid-19 positive subjects (cases). Therefore, a cross-sectional study was conducted, integrated into a larger study aimed to evaluate the impact of covid-19 on mental health. For the gut microbiota analysis, 45 control subjects (without covid-19) and 18 subjects with covid-19 were included. Sociodemographic information of all participants was collected. Furthermore, fecal sample DNA extraction was made and the V4 region of the 16S gene was analyzed. The results showed that there was no difference between cases and controls when  $\alpha$ -diversity (related to the richness of the species) was analyzed. However, in  $\beta$ -diversity (related to the composition of the species between the groups) there was a difference between cases and controls in both weighted and unweighted analysis. In the taxonomic analysis, there was a reduction in Verrucomicrobiae class and the genus *Akkermansia*, and an increase in the genus *Lachnospira*, *Muribaculaceae* and *Mitsuokella* in the microbiota of case individuals. Our results indicate that covid-19 is strongly capable of influencing the gut microbiota composition, both in its richness and abundance and in its diversity.

**Keywords:** Covid-19; Gut microbiota; SARS-CoV-2.



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>9</b>
1.1	COVID-19 .....	9
1.2	MICROBIOTA INTESTINAL.....	11
1.3	COVID-19 E MICROBIOTA INTESTINAL .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>19</b>
3.1	DELINEAMENTO .....	19
3.2	POPULAÇÃO .....	19
3.3	PARTICIPANTES.....	19
3.4	PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS.....	20
3.5	COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO.....	20
3.6	TESTE RÁPIDO COM PESQUISA DE ANTICORPOS PARA SARS-COV-2.....	20
3.7	PROCESSAMENTO DAS FEZES E EXTRAÇÃO DO DNA	20
3.8	ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL .....	22
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1	PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO DA AMOSTRA.....	24
4.2	ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA INTESTINAL DE SUJEITOS COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO PARA COVID-19 (CASOS) COMPARANDO COM CONTROLES .....	25
4.3	DIFERENÇA NA ABUNDÂNCIA RELATIVA NOS TÁXONS DA MICROBIOTA DE SUJEITOS COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO PARA COVID-19 (CASOS) COMPARANDO COM CONTROLES .	27
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>38</b>
	<b>ANEXO A - CEP .....</b>	<b>54</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 COVID-19

Em março de 2020 a doença do Coronavírus 2019 (covid-19), causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2 (SARS-CoV-2), foi declarada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia. O primeiro surto de pneumonia foi relatado em dezembro de 2019 em Wuhan na China, porém logo se espalhou por todo território global, com casos confirmados na maioria dos países (WHO, 2020). Até o momento (setembro de 2022), foram registrados 34,7 milhões de casos no Brasil (Secretarias Estaduais de Saúde, 2022), com 686 mil óbitos e 1,88 milhões de casos em Santa Catarina, com 22.395 óbitos (Governo de Santa Catarina, 2022).

Os coronavírus são comumente encontrados entre humanos, outros mamíferos e aves. Em algumas espécies, o vírus pode causar doenças no trato respiratório, trato intestinal, fígado e distúrbios neurológicos (Weiss & Leibowitz, 2011). Outros surtos epidemiológicos causados por vírus da família dos coronavírus já haviam sido registrados e incluem a síndrome respiratória aguda grave (SARS), de 2002 a 2004, e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2012 (Dawood et al., 2020).

Os coronavírus são vírus da família Coronaviridae, de RNA fita simples de sentido positivo e envelopados. Todos os coronavírus altamente patogênicos, incluindo o SARS-CoV-2, pertencem ao gênero *Betacoronavirus*, grupo 2 (Gorbalenya et al., 2020). A sequência do genoma do SARS-CoV-2 compartilha aproximadamente 80% de identidade com a sequência do SARS-CoV e aproximadamente 50% com o MERS-CoV (Lu et al., 2020; Zhou et al., 2020).

O SARS-CoV-2 possui quatro proteínas estruturais: *spike* (S), envelope (E), membrana (M) e nucleocapsídeo (N), das quais a proteína S é a principal mediadora da entrada do vírus nas células hospedeiras (Lu et al., 2020). A proteína S, que é uma proteína de fusão transmembrana encontrada no envelope do vírus, tem um domínio de ligação ao receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e medeia o contato direto com a superfície celular e com um sítio de clivagem polibásico S1/S2 que é clivado proteoliticamente pela catepsina L celular e pela protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) (Hoffmann et al., 2020; Wu et al., 2020; Zhou et al., 2020). A TMPRSS2 facilita a entrada viral na superfície da membrana plasmática, enquanto a catepsina L ativa a proteína S em endossomos e pode compensar a entrada em células que não possuem a TMPRSS2 (Hoffmann et al., 2020).

A transmissão ocorre de pessoa para pessoa principalmente por meio de gotículas respiratórias, que são liberadas quando a pessoa infectada tosse ou espirra e por contato direto (Guan et al., 2020). Os sintomas da covid-19 variam de infecções assintomáticas ou leves (aproximadamente 80%) a sintomas graves que podem levar à hospitalização e morte (Eckerle & Meyer, 2020). O sistema mais afetado pela covid-19 é o pulmonar, com manifestações clínicas mais frequentes incluindo tosse, febre, dispneia e dor de garganta e podendo evoluir para a forma mais grave da doença com pneumonia, insuficiência respiratória e morte (Johnson et al., 2020).

Ao entrar na célula hospedeira, o RNA viral pode desencadear uma resposta imune via padrões moleculares associado ao patógeno (PAMPs) (Huang et al., 2020). O SARS-CoV-2 é um vírus citopático que pode causar piroptose (uma forma altamente inflamatória de morte celular programada) nas células hospedeiras. O vírus também causa a liberação de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) pró-inflamatórios como ATP e ácidos nucleicos, além de induzir resposta imune local com liberação de citocinas, como a interleucina-6 (IL-6). Os DAMPs desencadeiam a migração de outras células imunes como macrófagos, monócitos e células T, que posteriormente aumentam a inflamação por liberar citocinas pró-inflamatórias (Tay et al., 2020). Além disso, células T e B possuem função importante na severidade da doença e na defesa do organismo (Forchette et al., 2021).

O envolvimento da resposta inflamatória é determinante na patogênese da covid-19 e a morte e gravidade da doença têm sido associadas com uma resposta imune excessiva ao SARS-CoV-2, com liberação de grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias, um evento chamado de “tempestade de citocinas” (Hussman, 2020; Ragab et al., 2020; Sinha et al., 2020). Estudos mostram que indivíduos com covid-19 grave exibem níveis mais altos de várias citocinas pró-inflamatórias, como IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), entre outras, quando comparado com indivíduos com as formas leve e moderada da doença (Chen et al., 2020; J. Huang et al., 2020; Liu et al., 2020). Além disso, algumas meta-análises confirmaram a influência da elevação de citocinas, principalmente da IL-6, com a covid-19 grave (Henry et al., 2020; Leisman et al., 2020).

Sabe-se também que, órgãos e sistemas extrapulmonares são afetados pela covid-19, com sintomas que incluem manifestações hematológicas, cardiovasculares, renais, hepatobiliares, endocrinológicas, dermatológicas, oftalmológicas, gastrointestinais, neurológicas e neuropsiquiátricas (Gupta et al., 2020; Johnson et al., 2020), tais como

ansiedade, depressão e declínio cognitivo (Krishnamoorthy et al., 2020; Torales et al., 2020; del Brutto et al., 2021).

É importante notar que o receptor da ECA2 também é expresso em regiões do cérebro humano, neurônios, microglia, astrócitos e oligodendrócitos (Xia & Lazartigues, 2008; Zubair et al., 2020). De fato, estudos já encontraram o SARS-CoV-2 em células cerebrais de ratos e humanos, tanto em estudos com organoides 3D do cérebro humano quanto em estudos *postmortem* de indivíduos com covid-19, comprovando a capacidade neuroinvasiva do SARS-CoV-2 (Ramani et al., 2020; Song et al., 2021). Uma meta-análise mostrou que a prevalência geral de depressão, ansiedade e distúrbios do sono entre indivíduos com covid-19 foi de 45%, 47% e 34%, respectivamente (Deng et al., 2021). Além disso, a correlação temporal entre sintomas neurológicos e gastrointestinais em pacientes com covid-19 sugere que o eixo intestino-microbiota-cérebro também pode estar envolvido na patogênese da doença (Bostanciklioglu, 2020; Chaves Andrade et al., 2020).

## 1.2 MICROBIOTA INTESTINAL

O ser humano é colonizado por um grande número de microrganismos, destes, a maioria vive no trato gastrointestinal, onde coletivamente formam uma comunidade microbiana complexa conhecida como microbiota intestinal (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014). Esses microrganismos vivem no intestino humano de forma simbiótica e, quando em equilíbrio, além de contribuir para a digestão desempenham importantes funções que incluem: produção de vitaminas, regulação do sistema imunológico, comunicação com as células intestinais e modulação do comportamento do hospedeiro (Bäckhed et al., 2005; Cryan & Dinan, 2012; Rajilić-Stojanović, 2013).

O trato gastrointestinal humano é habitado por cerca de  $1 \times 10^{13}$  a  $1 \times 10^{14}$  microrganismos, mais de 10 vezes o número de células no corpo e contém 150 vezes mais genes que o genoma humano (Gill et al., 2006; Qin et al., 2010). Apesar de variar muito, com base na análise de RNA ribossômico 16S, a microbiota intestinal humana consiste em pelo menos 1.800 gêneros, cerca de 15.000 a 36.000 espécies de bactérias e mais de 7.000 cepas (Frank & Pace, 2008; Ley et al., 2006; Qin et al., 2010). Dentre os filos presentes na microbiota intestinal, Firmicutes e Bacteroidetes são os dois filotipos bacterianos predominantes, representando 90% da composição da microbiota intestinal (Arumugam et al., 2011).

O filo Firmicutes é composto por mais de 200 gêneros diferentes, como *Lactobacillus*, *Bacillus*, *Ruminococcus*, *Enterococcus* e *Clostridium* (95% do filo Firmicutes), inclui principalmente bactérias Gram-positivas em forma de bastonete ou circulares que influenciam o metabolismo da glicose e lipídios (Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014; Bibbò et al., 2017; Magne et al., 2020). O filo Bacteroidetes consiste principalmente das classes: Bacteroides, Flavobactérias e Esfingobactérias predominantemente dos gêneros Bacteroides e Prevotella, com aproximadamente 7.000 espécies, produzindo ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Arumugam et al., 2011; Rajilić-Stojanović & de Vos, 2014; Louis & Flint, 2017). Os filios Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteria e Verrucomicrobia também são encontrados na microbiota intestinal, porém em uma abundância relativamente baixa (Eckburg et al., 2005).

Produtos que não são degradados no intestino superior por enzimas digestivas como fibras solúveis, proteínas e peptídeos são metabolizados pela microbiota intestinal no ceco e no cólon tendo como principais produtos os AGCC, incluindo acetato, propionato e butirato (Koh et al., 2016). Também são metabólitos da microbiota produtos derivados do triptofano, que incluem ácido indol-3-acético, ácido indol-3-propiónico, indol-3-acetaldeído, indol ácido acrílico e indol-3 aldeído (Krishnan et al., 2018).

O butirato é a principal fonte de energia para colonócitos e protege contra o câncer colorretal e a inflamação por inibir as histonas desacetilases (Flint et al., 2012). O acetato e o propionato são ligantes endógenos de dois receptores acoplados à proteína G (GPR41 e GPR43) e estão envolvidos com modulação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, também aumentam a produção de peptídeo-1 semelhante ao glucagon e peptídeo tirosina-tirosina, que afetam a saciedade e o trânsito intestinal (Samuel et al., 2008). Os AGCC também estão envolvidos com a homeostase microglial e a regulação da permeabilidade da barreira intestinal e barreira hematoencefálica (BHE) (Erny et al., 2015; Mörkl et al., 2018).

O conjunto microbiano intestinal atinge na vida adulta um status de clímax representado pelo estabelecimento de uma homeostase entre todos os seus membros (Tamboli et al., 2004). Ao longo do desenvolvimento ocorrem flutuações na composição da microbiota, desde o recém-nascido até a primeira infância, da juventude ao envelhecimento e durante a gravidez, podendo ser afetada por diversos fatores ambientais, como pH, níveis de oxigênio/estado redox, disponibilidade de nutrientes, temperatura e atividade de água, permitindo que diversas populações

bacterianas prosperem e exerçam diferentes atividades enquanto interagem com seu ambiente (Ursell et al., 2012). Sabe-se também que o tipo de parto, amamentação e eventos adversos na infância podem alterar a microbiota intestinal ao longa da vida (Cox et al., 2014).

Sendo assim, uma ampla gama de fatores pode causar alterações no equilíbrio da microbiota intestinal, como dieta, uso de antibióticos, estresse e infecções (Bercik et al., 2011; Cryan & O'Mahony, 2011; Foster & McVey Neufeld, 2013; Singh et al., 2017), interrompendo a homeostase microbiana e causando o processo chamado de disbiose. Apesar de não haver uma descrição precisa de como é uma microbiota normal ou saudável, a disbiose é considerada um desequilíbrio entre bactérias benéficas e patogênicas, geralmente está associada com efeitos nocivos e pode ter consequências a longo prazo (Spor et al., 2011; Suez et al., 2014; Kim, 2015; Bibbò et al., 2017; Mancabelli et al., 2017;).

Uma assinatura de disbiose da microbiota intestinal é o aumento da razão Firmicutes/Bacteroidetes (F/B), o aumento dessa proporção já tem sido associado a várias condições patológicas (Magne et al., 2020). Quando ocorre um estado de disbiose, a permeabilidade da barreira intestinal é alterada, permitindo a passagem de bactérias e antígenos bacterianos para fora do intestino, podendo levar a uma ativação da resposta imune, liberação de citocinas pró-inflamatórias e ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Maes et al., 2013).

Uma microbiota saudável é capaz de proteger contra doenças, tais como, doença inflamatória intestinal, distúrbio metabólico, neoplasias gastrointestinais, obesidade, diabetes mellitus, entre outras (D'Aversa et al., 2013; Zhu et al., 2013; Suez et al., 2014; Chassaing et al., 2015; Bibbò et al., 2017). Além disso, evidências sugerem que a microbiota intestinal tem envolvimento com inflamação, desenvolvimento cerebral e tem sido associada com alguns transtornos neuropsiquiátricos (Evrensel & Ceylan, 2015; Manosso et al., 2021). A produção excessiva de citocinas inflamatórias na periferia causada pela disbiose, como IL-1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, podem alterar a permeabilidade da BHE e atingir células residentes do cérebro, modificando suas funções e morfologia (Carlessi et al., 2021).

É evidente a influência da microbiota intestinal na regulação do sistema imunológico, tornando-se um campo de investigação também na área de doenças infecciosas (Negi et al., 2019). Tendo isso em vista, é lógico pensar que a microbiota intestinal pode estar relacionada com a resposta imunológica de doenças como pneumonia ou em uma doença viral como a covid-19.

### 1.3 COVID-19 E MICROBIOTA INTESTINAL

Como mencionado anteriormente, indivíduos infectados pelo SARS-CoV-2 tem, não somente o sistema pulmonar acometido, mas também o sistema gastrointestinal, incluindo sintomas como diarreia, náusea, vômito e dor abdominal (Galanopoulos et al., 2020; Guan et al., 2020; Jin et al., 2020), sugerindo que a infecção pelo vírus é capaz de afetar também a microbiota intestinal (Zuo et al., 2020). Um estudo mostrou que alguns pacientes com covid-19 tiveram disbiose intestinal, com diminuição de probióticos como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Xu et al., 2020). Além disso, indivíduos com covid-19 e sintomas gastrointestinais tiveram um tempo maior para recuperação e normalmente os sintomas gastrointestinais ficavam mais evidentes com a progressão da doença (Pan et al., 2020). Também, alterações na microbiota intestinal durante a infecção pelo SARS-CoV-2 foram associadas com suscetibilidade a forma grave da doença e predisposição para complicações a longo prazo (Zuo et al., 2020).

Altos níveis do receptor da ECA2 são encontrados em enterócitos no intestino delgado, tornando essas células suscetíveis à invasão pelo SARS-CoV-2, indicando o trato gastrointestinal como um possível local de invasão e replicação viral (Hamming et al., 2004; To & Lo, 2004). Realmente, uma revisão sistemática e meta-análise feita de uma coorte em Hong Kong mostrou que indivíduos com diarreia apresentaram maior carga viral e positividade de RNA nas fezes do que aqueles sem diarreia. Na meta-análise, a prevalência combinada de amostras fecais positivas para RNA viral foi de 48,1%, dessas amostras, 70,3% daquelas coletadas após a negatividade do vírus em amostras respiratórias ainda apresentaram resultado positivo nas fezes (Cheung et al., 2020).

Um estudo mostrou que a composição da microbiota intestinal de indivíduos com covid-19 durante a hospitalização está correlacionada com concentrações plasmáticas de várias citocinas e quimiocinas, como o TNF- $\alpha$  e o ligante de quimiocina de motivo C-X-C 10 (CXCL10), e marcadores sanguíneos, incluindo proteína C reativa (PCR), lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e gama-glutamil transferase. O estudo também mostrou que a microbiota intestinal de pacientes recuperados (em amostras coletadas até 30 dias após a resolução da doença) permaneceu significativamente alterada, sugerindo que a microbiota intestinal pode desempenhar um papel na modulação da resposta imune do hospedeiro e potencialmente influenciar na gravidade da doença. Este mesmo estudo demonstrou que em relação ao filo, indivíduos com covid-19 tinham maior abundância de Bacteroidetes em

comparação com indivíduos sem covid-19, estes tinham maior abundância de Actinobactéria. No nível das espécies e sem o controle de uso de antibióticos, indivíduos com covid-19 tinham um enriquecimento de *Ruminococcus gnavus*, *Ruminococcus torques*, e *Bacteroides dorei* e uma depleção de *Bifidobacterium adolescentis*, *Faecalibacterium prausnitzii*, e *Eubacterium rectale*. Quando o uso de antibióticos foi levado em consideração, as mudanças foram principalmente ligadas ao enriquecimento de *Parabacteroides*, *Sutterella wadsworthensis*, e *Bacteroides caccae* e depleção de *Adlercreutzia equolifaciens*, *Dorea formicigenerans* e *Clostridium leptum* em indivíduos com covid-19 (Yeoh et al., 2021).

Zuo et al. (2020) mostrou que independentemente do uso de antibióticos, indivíduos com covid-19 que tiveram disbiose permaneceram em estado de disbiose mesmo após a eliminação do SARS-CoV-2 e resolução dos sintomas respiratórios. O mesmo estudo também mostrou que ao longo da hospitalização, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis* e *Bacteroides ovatus* (espécies associadas à regulação negativa da expressão de ECA2 no cólon murino (Geva-Zatorsky et al., 2017) foram inversamente correlacionados com a carga de SARS-CoV-2 em amostras fecais. Por outro lado, a bactéria *Erysipelotrichaceae 2\_2\_44A* (bactéria associada com inflamação intestinal (Kaakoush, 2015)) foi positivamente correlacionada com a carga fecal de SARS-CoV-2 (Zuo et al., 2020).

Outro estudo demonstrou que a microbiota intestinal de indivíduos com covid-19 era dominada por *Streptococcus*, *Rothia* (conhecida por causar diversas infecções, incluindo pneumonia, principalmente em indivíduos imunossuprimidos (Ramanan et al., 2014), *Veillonella*, *Erysipelatoclostridium* e *Actinomyces* enquanto a microbiota de controles saudáveis era dominada pelos gêneros *Romboutsia*, *Faecalibacterium*, *Fusicatenibacter* e grupo *Eubacterium hallii*. Outro dado interessante do mesmo estudo foi que os gêneros *Agathobacter*, *Fusicatenibacter*, *Roseburia*, e *Ruminococcaceae UCG-013* estavam diminuídos em indivíduos com covid-19 comparado com controles saudáveis e estavam correlacionados negativamente com níveis de PCR, procalcitonina (peptídeo precursor da calcitonina, hormônio envolvido na homeostase do cálcio) e dímero D (produto da degradação de fibrina) (Gu et al., 2020).

Falando de AGCC, estudos mostraram que na microbiota intestinal de indivíduos com covid-19, a abundância relativa de bactérias produtoras de butirato, como diversos gêneros das famílias *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae*, estava diminuída, embora as concentrações reportadas



de AGCC em indivíduos recuperados da covid-19 sejam normais (Follmer, 2020; Zuo et al., 2020; Newsome et al., 2021a). Amostras analisadas por sequenciamento metagenômico mostraram que o microbioma intestinal de indivíduos com covid-19 apresentou capacidade prejudicada para biossíntese de AGCC e L-isoleucina que persistiu mesmo após a resolução da doença. Essas funções microbianas correlacionaram-se com a gravidade da doença e a resposta imune do hospedeiro, com aumento de concentrações plasmáticas de CXCL10, peptídeo natriurético do tipo NT-proB e PCR (Zhang et al., 2022).

A ECA2 no intestino é necessária para expressão de superfície do transportador de aminoácidos neutro BOAT1, o triptofano dietético é absorvido principalmente pela via de transporte BOAT1/ECA2 nas células epiteliais do intestino delgado e isso resulta na regulação da expressão de peptídeos antimicrobianos pela ativação da via alvo da rapamicina em mamíferos (mTOR). Esse seria um mecanismo que justificaria as mudanças na microbiota intestinal relacionadas com a ECA2, já que esses peptídeos antimicrobianos podem afetar a composição intestinal da microbiota (Hashimoto et al., 2012; Perlot & Penninger, 2013). Quando o SARS-CoV-2 se liga ao receptor de ECA2 o bloqueando, ele também bloqueia o BOAT1, assim o triptofano não é capaz de ser absorvido de forma eficiente, levando a uma secreção aberrante de peptídeos antimicrobianos e consequentemente a uma microbiota intestinal alterada. Essas mudanças também aumentam a suscetibilidade à inflamação do intestino grosso (Hashimoto et al., 2012; Mönkemüller et al., 2020).

Sabe-se que probióticos tem propriedades anti-inflamatórias e seu uso é efetivo na redução de sintomas gastrointestinais (Akour, 2020; Mahooti et al., 2020; Mak et al., 2020; Sundararaman et al., 2020). Estudos já mostraram que tratamentos com probióticos previnem infecções do trato respiratório em crianças e adultos (West et al., 2014; Hao et al., 2015; Wang et al., 2016), reforçando um possível papel da microbiota intestinal na patogênese e recuperação da covid-19. Por conta disso, pesquisas têm sugerido o uso de probióticos como coadjuvantes no tratamento para covid-19, inclusive, a orientação (versão 5) estabelecida pela Comissão Nacional de Saúde da China e pela Administração Nacional de Medicina Tradicional Chinesa recomenda o uso de probióticos em indivíduos com covid-19 grave para preservar a microbiota intestinal e prevenir infecções bacterianas secundárias (Gao et al., 2020).

Apesar das evidências relatadas, a literatura sobre a microbiota e a covid-19 ainda é complexa e não totalmente elucidada. Sendo assim, se faz necessário mais estudos, principalmente clínicos, que evidenciem as

influências da infecção por SARS-CoV-2 na composição da microbiota intestinal.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações na microbiota intestinal em sujeitos positivos para covid-19, comparando com controles.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a abundância da diversidade- $\alpha$  e - $\beta$  da microbiota intestinal de sujeitos positivados para covid-19, comparando com controles;
- Comparar a abundância das famílias bacterianas da microbiota intestinal de sujeitos positivados para covid-19, comparando com controles;
- Comparar a abundância de gêneros bacterianos da microbiota intestinal de sujeitos positivados para covid-19, comparando com controles;
- Identificar se há diferença entre Firmicutes e Bacteroidetes na microbiota intestinal de sujeitos positivados para covid-19, comparando com controles.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO

Este é um estudo transversal integrado a um estudo de coorte com o objetivo de investigar o impacto da covid-19 na saúde mental.

#### 3.2 POPULAÇÃO

Foram utilizados dados do estudo maior de indivíduos recrutados entre o período de setembro de 2020 a julho de 2021 na região de Criciúma/SC. Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética em humanos sob protocolo número 5.606.964 (Anexo A).

#### 3.3 PARTICIPANTES

Para o estudo maior, a amostra foi selecionada por conveniência. Os casos (indivíduos com diagnóstico prévio de covid-19) foram previamente contatados e convidados a participar da pesquisa a partir de bancos de dados disponibilizados pela prefeitura de Criciúma/SC ou através de divulgação em mídias sociais. Os controles incluídos na pesquisa foram indivíduos sem diagnóstico de covid-19, vizinhos dos casos. Essa estratégia foi adotada com o objetivo de recrutar controles o mais semelhantes possível aos casos em termos de características sociodemográficas. Nos indivíduos controles foi realizado teste rápido com pesquisa de anticorpos para SARS-CoV-2, para confirmar que não tinham covid-19 ou tido contato com o vírus.

Para o grupo de casos, os critérios de inclusão foram (1) ter idade entre 18 e 90 anos, (2) ter o diagnóstico de covid-19 confirmado quatro a seis semanas antes da inclusão no estudo e (3) residir na região Sul do Brasil. Os critérios de exclusão foram: (1) ter o diagnóstico de transtorno bipolar e (2) apresentar condição física ou cognitiva que impossibilitasse o indivíduo de participar do estudo (ou seja, os indivíduos que não entendessem os questionários).

Os critérios de inclusão dos controles foram: (1) ter idade entre 18 e 90 anos, (2) ter resultado negativo no teste rápido de pesquisa de anticorpos para SARS-CoV-2 e (3) residir na região Sul do Brasil. Os critérios de exclusão foram: (1) ter o diagnóstico de transtorno bipolar e (2) apresentar condição física ou cognitiva que impossibilitasse o indivíduo de participar do estudo.

### 3.4 PROCEDIMENTOS E INSTRUMENTOS

Todos os participantes responderam um questionário sociodemográfico, que incluía informações sobre sexo, idade e anos de educação. Além disso, indivíduos com covid-19 responderam questões sobre a severidade dos sintomas da covid-19 e sobre o uso de medicações para o tratamento dos sintomas. A entrevista foi realizada por pesquisadores treinados após agendamento prévio na residência dos participantes, nas dependências da Unesc ou de forma online usando a ferramenta google meet.

### 3.5 COLETA DE MATERIAL BIOLÓGICO

A coleta de sangue foi realizada por um profissional habilitado e ocorreu com agendamento prévio na residência dos indivíduos ou nas dependências da Unesc no mesmo dia da aplicação do questionário. Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido dos participantes foi coletado 6 mL de sangue venoso periférico em tubo seco (sem anticoagulante) para obtenção do soro. Para coleta de fezes o participante recebeu um kit para coleta de fezes que foi posteriormente entregue ao pesquisador. Tanto o sangue quanto as fezes foram processados no laboratório de Psiquiatria Translacional da Unesc de acordo com cada protocolo a ser realizado.

### 3.6 TESTE RÁPIDO COM PESQUISA DE ANTICORPOS PARA SARS-COV-2

O sangue coletado no tubo seco foi imediatamente centrifugado a 3.000 rpm por 10 min e usado imediatamente para o teste rápido com pesquisa de anticorpos para SARS-CoV-2 (colloidal gold immunochromatography) seguindo as instruções do fabricante (Leccurate, Lepu Technology).

### 3.7 PROCESSAMENTO DAS FEZES E EXTRAÇÃO DO DNA

Após a entrega da amostra para o pesquisador, as fezes foram imediatamente fracionadas em 5 microtubos do tipo eppendorf e armazenadas em freezer -80 oC.

Para extração de DNA foi utilizado o kit QIAamp Fast DNA Stool Mini (QIAGEN®) de acordo com as recomendações do fabricante. O processo de extração e purificação do DNA está resumido na figura 1.



Figura 1: **Purificação do DNA em colunas de rotação QIAamp Mini**

Legenda: Resumo do processamento que foi utilizado para extração e purificação do DNA das fezes de voluntários do estudo para posterior análise genômica da composição da microbiota intestinal. Fonte: Adaptado de *QIAamp® Fast DNA Stool Mini Handbook*, 2020.

### 3.8 ANÁLISE DA COMPOSIÇÃO DA MICROBIOTA INTESTINAL

Para o perfil da comunidade bacteriana, o DNA das fezes já extraído foi enviado para o Centro de Pesquisa Experimental, Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP) do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, onde foi realizado a análise da região V4 do gene 16S por sequenciamento de nova geração utilizando a plataforma Ion S5 System da Thermo Fisher Scientific. Após o sequenciamento foi aplicado um pipeline já relatado anteriormente (Callahan et al., 2016). Resumidamente, foi inspecionado o perfil de qualidade das leituras e filtrado e aparado com base no relatório de qualidade. Em seguida, foram estimadas as taxas de erro usando um modelo de erro paramétrico (algoritmo de aprendizado de máquina) e aplicado o algoritmo de inferência de amostra central aos dados de sequência filtrados e aparados. A biblioteca de sequências resultante foi usada para construir uma tabela de variantes de sequência de amplicon (ASV) e as quimeras serão removidas.

Para atribuição taxonômica, foi usado os dados de treinamento taxonômico do SSU formatados para DADA2 (McLaren & Callahan, 2021). Os dados gerados através do DADA2 foram importados para o phyloseq (McMurdie & Holmes, 2013), mesclados com os metadados e exportados usando vmikk/metagMisc (Mikryukov, 2017).

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

A comparação das variáveis categóricas entre os grupos foi testada através do teste qui-quadrado. As variáveis numéricas não apresentaram distribuição normal de acordo com o teste Shapiro–Wilk. Desta forma, a comparação das variáveis numéricas entre os grupos foi testada através do teste não-paramétrico Mann-Whitney, e os dados foram apresentados por mediana e intervalo interquartil.

A diversidade- $\alpha$  (diversidade dentro de uma comunidade) foi estimada usando o pacote R Vegan para Shannon Index. As matrizes de diversidade- $\beta$  (diversidade entre comunidades) foram usadas para calcular as distâncias de dissimilaridade entre as amostras (não ponderada e ponderada de Manhattan). O cálculo e a ordenação da distância da análise de coordenadas principais (PCoA) foram realizados em phyloseq. O teste t Student foi utilizado para comparar a diversidade- $\alpha$  entre os grupos. O pacote ALDEx2 também foi usado para calcular a abundância diferencial de contagens de táxons transformados por razão logarítmica, representados como tamanho do efeito. O sequenciamento do RNAr 16S

foi analisado pelo teste de Kruskal-Wallis com correção posthoc de Benjamini-Hochberg.



## 4 RESULTADOS

### 4.1 PERFIL SOCIODEMOGRÁFICO DA AMOSTRA

A tabela 1 apresenta as características da amostra. Este estudo incluiu 63 indivíduos (45 controles sem covid-19 e 18 casos com covid-19). A maioria da amostra foi composta por mulheres (74,6%), de raça branca (88,9%) e de estado civil solteiro (54%). A mediana da idade na amostra total foi de 35 anos, a mediana de anos de estudo foi de 17, e a mediana do IMC foi 25,19. Não houve diferença entre casos e controles em relação as características previamente mencionadas. Os indivíduos com covid-19 apresentaram maior proporção de ter usado medicação para tratar ou prevenir a covid-19 (94,4%) quando comparados aos indivíduos sem covid-19 (20,0%,  $p < 0,001$ ). Em relação à severidade dos sintomas da covid-19, a maioria da nossa amostra era assintomática ou apresentou sintomas leves (88,9%).

Tabela 1: Características da amostra entre os grupos.

Características	Amostra total n= 63	Controles n= 45	Casos n= 18	p-valor
<b>Sexo*</b>				0,120
Feminino	47	36	11	
Masculino	(74,6%)	(80,0%)	(61,1%)	
	16	9 (20,0%)	7 (38,9%)	
	(25,4%)			
<b>Idade#</b>	35,00	35,00	33,00	0,964
	(25,00 –	(24,00 –	(25,00 –	
	50,00)	49,00)	52,25)	
<b>Raça*</b>				1,000
Branca	56	40	16	
Não branca	(88,9%)	(88,9%)	(88,9%)	
(amarela, parda, preta)	7 (11,1%)	5 (11,1%)	2 (11,1%)	
<b>Anos de estudo#</b>	17,00	17,00	16,50	0,483
	(14,00 –	(14,00 –	(13,75 –	
	19,00)	19,00)	21,00)	

Legenda: IMC: índice de massa corporal; \*comparação entre os grupos foi testada através do teste qui-quadrado; #comparação entre os grupos foi testada através do teste Mann-Whitney e dados apresentados por mediana e intervalo interquartil;

<b>Estado Civil*</b>				0,212
Solteiro	34	26	8 (44,4%)	
Casado	(54,0%)	(57,8%)	7 (38,9%)	
Separado/divorciado	20	13	-	
União estável	(31,7%)	(28,9%)	2 (11,1%)	
Viúvo	4 (6,3%)	4 (8,9%)	1 (5,6%)	
	4 (6,3%)	2 (4,4%)		
	1 (1,6%)	-		
<b>IMC<sup>#,**</sup></b>	25,19	25,08	25,26	0,828
	(22,45 –	(22,18 –	(22,83 –	
	29,03)	30,14)	27,78)	
<b>Uso de medicação para tratar ou prevenir a covid-19*</b>				<0,001
Não	37	36	1 (5,6%)	
Sim	(58,7%)	(80,0%)	17	
	26	9 (20,0%)	(94,4%)	
	(41,3%)			
<b>Severidade da covid-19</b>				
Assintomático/sinto mas leves	---	---	16 (88,9%)	---
Sintomas moderados/graves			2 (11,1%)	

\*\*variável contém 1 dado faltante no grupo dos controles. Tabela elaborada pela autora.

#### 4.2 ALTERAÇÕES NA MICROBIOTA INTESTINAL DE SUJEITOS COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO PARA COVID-19 (CASOS) COMPARANDO COM CONTROLES

A diversidade microbiana fecal foi mensurada através da diversidade- $\alpha$  e diversidade- $\beta$ . A diversidade- $\alpha$  mede a riqueza e equidade da população microbiana intestinal e a diversidade- $\beta$  compara a composição da microbiota entre dois ou mais habitats. Conforme mostrado na figura 2, não houve diferença estatística na diversidade- $\alpha$  estimada pelas OTUs observadas, Índice de Shannon, Chao1, Simpson e Simpson inverso entre os indivíduos casos e controles. No entanto, diferenças significativas na composição da microbiota intestinal entre os grupos foram encontradas no gráfico de PCoA com base nas análises não ponderada ( $p = 0,003$ ,  $R^2 = 0,034$ ) e ponderada ( $p = 0,001$ ,  $R^2 = 0,033$ ). Conforme mostrado na

figura 3, a diversidade- $\beta$  ou diversidade- $\beta$  verdadeira diferiu significativamente entre os grupos caso e controle.

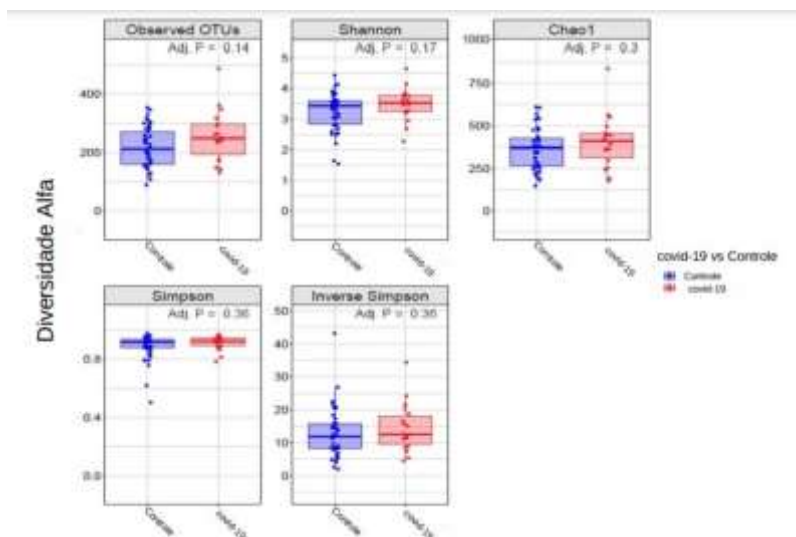


Figura 2: **Diversidade- $\alpha$**

Legenda: Figura apresentando a diversidade- $\alpha$  entre os grupos controle (azul) e covid-19 (vermelho), calculada pelos índices: OTUs observadas, Shannon, Chao1, Simpson e Simpson inverso. Figura elaborada pela autora.

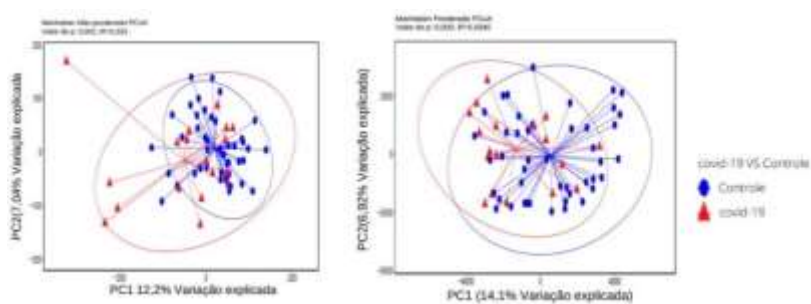


Figura 3: **Diversidade- $\beta$**

Legenda: Figura apresentando a diversidade- $\beta$  entre os grupos controle (azul) e covid-19 (vermelho), calculada pelas matrizes não ponderada e ponderada de Manhatta e apresentada pelo gráfico de análise de coordenadas principais (PCoA). Figura elaborada pela autora.

#### 4.3 DIFERENÇA NA ABUNDÂNCIA RELATIVA NOS TÁXONS DA MICROBIOTA DE SUJEITOS COM DIAGNÓSTICO PRÉVIO PARA COVID-19 (CASOS) COMPARANDO COM CONTROLES

Para investigar alterações nos táxons da microbiota intestinal, a proporção relativa de microrganismos foi avaliada nos níveis de filo, classe e gênero. Com base na análise taxonômica, foram encontradas alterações entre casos e controles em amplos níveis filogenéticos. Não foi encontrado diferença entre os grupos ao nível do filo,  $p \geq 0,05$  (Fig. 4A e 4B). A abundância relativa da classe Verrucomicrobiae foi reduzida em indivíduos casos em comparação com controles,  $p < 0,05$  (Fig. 5A e 5B). A abundância relativa dos gêneros Lachnospira, Muribaculaceae e Mitsuokella aumentou no grupo caso em comparação com o grupo controle. O gênero Akkermansia diminuiu no grupo caso em comparação com o grupo controle,  $p < 0,05$  (Fig. 6A e 6B). Esses dados demonstram diferenças marcantes na microbiota intestinal do grupo de indivíduos que tiveram covid-19 em comparação com o grupo controle.

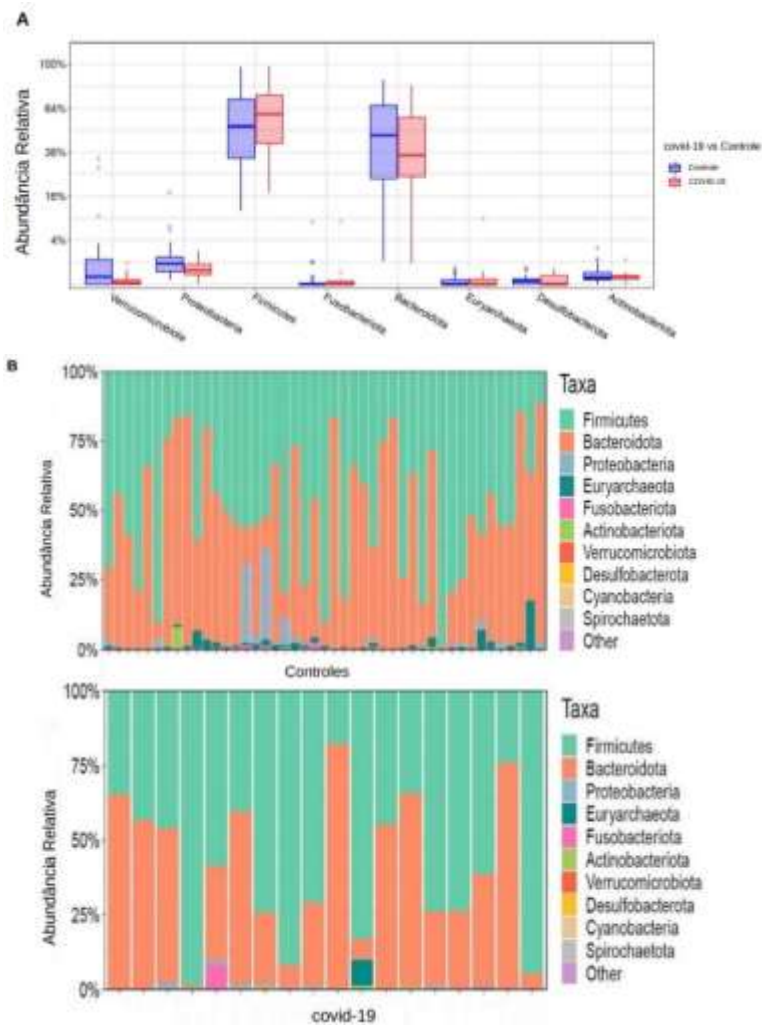


Figura 4: **Abundância relativa de filo**

Legenda: Figuras apresentando a abundância relativa de filo entre os grupos controle (azul) e covid-19 (vermelho). Figura elaborada pela autora.

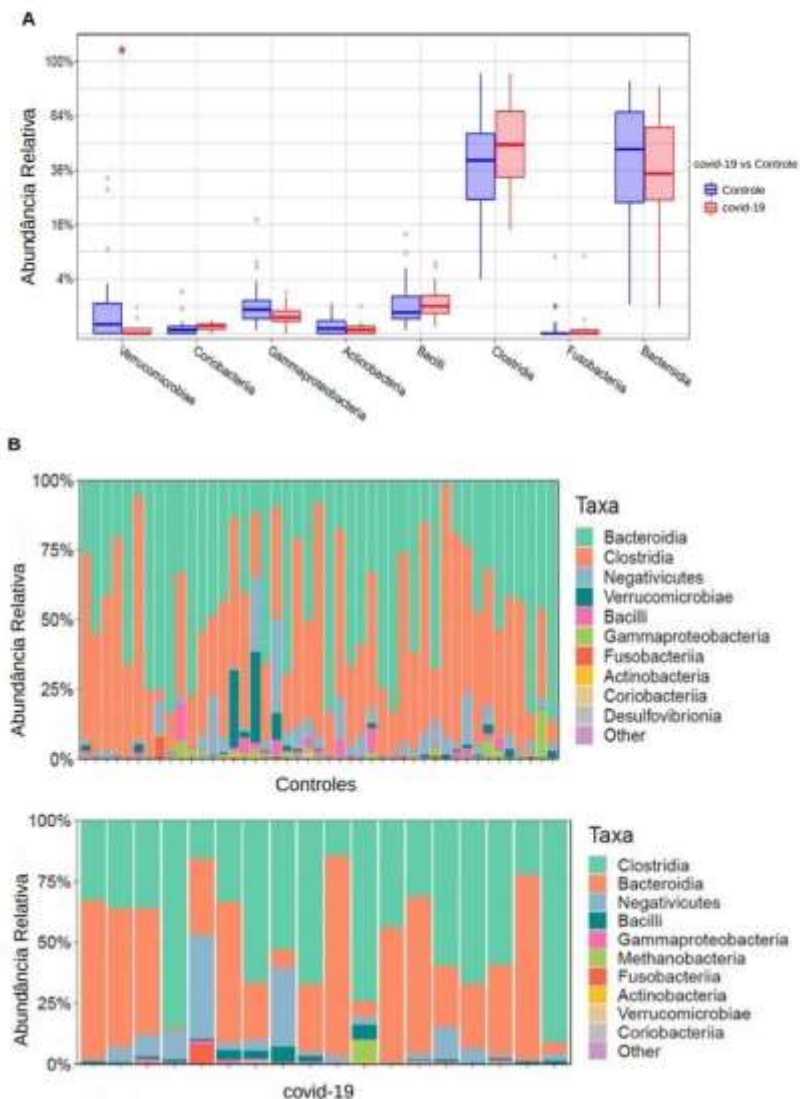


Figura 5: **Abundância relativa de classe**

Legenda: Figuras apresentando a abundância relativa de classe entre os grupos controle (azul) e covid-19 (vermelho). Figura elaborada pela autora.

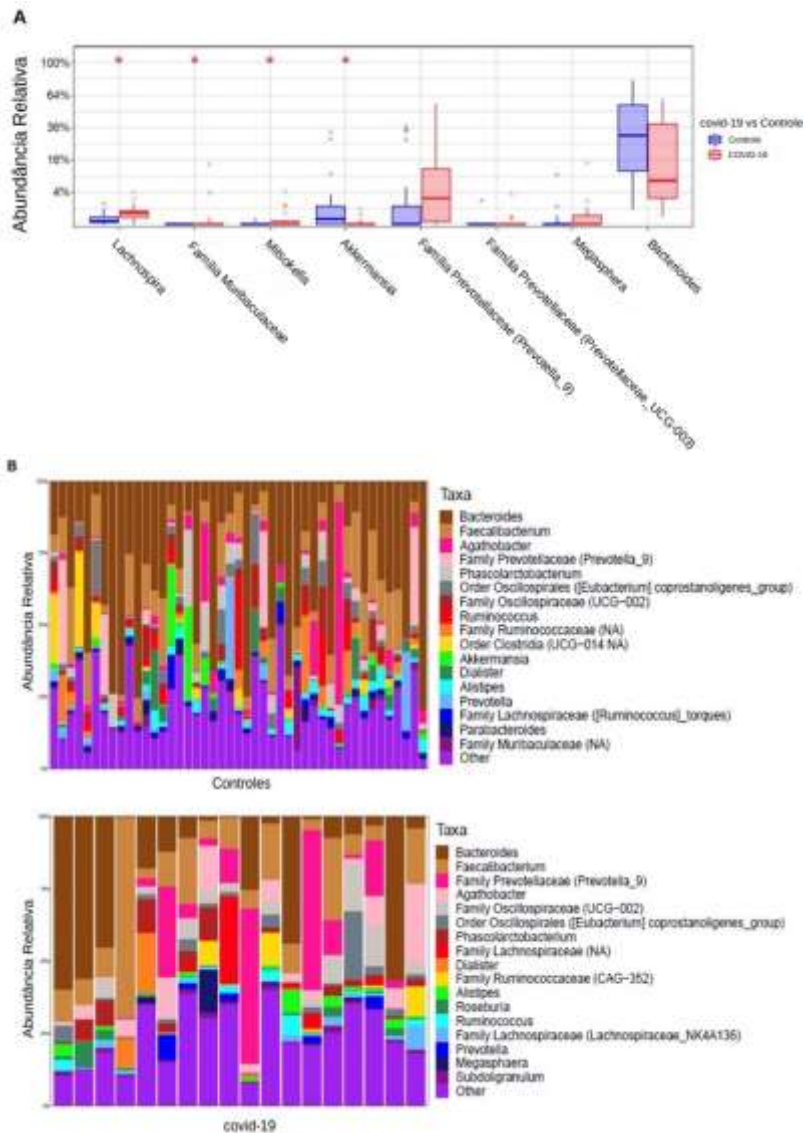


Figura 6: **Abundância relativa de gênero**

Legenda: Figuras apresentando a abundância relativa de gênero entre os grupos controle (azul) e covid-19 (vermelho). Figura elaborada pela autora.

## 5 DISCUSSÃO

As análises metagenômicas realizadas no presente estudo demonstraram uma associação entre a covid-19 e a composição da microbiota intestinal, em que foram identificadas características distintas correlacionadas à abundância e diversidade do microbioma intestinal de indivíduos que contraíram a doença em comparação com indivíduos controles.

Como mencionado, a diversidade- $\alpha$  mede a riqueza e equidade da população microbiana, em que a riqueza é definida como a quantidade de espécies presentes em um habitat e a equidade é uma medida da abundância relativa das diferentes espécies que compõem a riqueza de um determinado habitat (Lloyd & Ghelardi, 1964; McIntosh, 1967; Hurlbert, 1971; Peet, 1974). No presente estudo não foi encontrada diferenças significativas em nenhum dos índices utilizados para medir a diversidade- $\alpha$ , ou seja, a riqueza e equidade da microbiota intestinal do grupo caso foi semelhante ao grupo controle.

Considerando que as amostras deste estudo foram coletadas de 4 a 6 semanas após o diagnóstico positivo para covid-19, este resultado vai ao encontro com os encontrados por Newsome et al. (2021) em que não foi observada diferença na diversidade- $\alpha$  entre indivíduos recuperados da covid-19 e controles não infectados (Newsome et al., 2021b). Porém, este dado ainda é controverso, alguns estudos já encontraram diferença na diversidade- $\alpha$  da microbiota intestinal mesmo após a recuperação da covid-19 (Cui et al., 2022; Maeda et al., 2022; Schult et al., 2022), tais controvérsias podem decorrer do número amostral de cada estudo e do tempo após a recuperação em que as amostras foram coletadas. De fato, um estudo encontrou diferença na diversidade- $\alpha$  em amostras coletadas um mês após a infecção em comparação com controles, mas em amostras dos mesmos indivíduos coletadas após 6 meses da covid-19 essa diferença não foi encontrada (Liu et al., 2022).

Vale ressaltar que, indivíduos com sintomas gastrointestinais estão associados com uma maior severidade da doença quando acometidos pela covid-19, apresentando uma resposta imune exacerbada (Honda & Littman, 2016; Hu et al., 2021). Portanto, levando em consideração que há uma interação recíproca entre a microbiota e o sistema imune, onde os microrganismos podem influenciar a imunidade inata e por sua vez, a resposta imunológica pode alterar a microbiota, indivíduos com uma microbiota saudável podem apresentar uma melhor resposta imunológica ao vírus e consequentemente, não apresentar alterações significativas na composição de bactérias comensais do intestino (Brodin, 2021).



A diversidade- $\beta$  é definida pelas diferenças na composição das espécies entre dois ou mais determinados habitats ou tempos. Existem várias formas de medir a diversidade- $\beta$ , mas as distâncias UniFrac são as mais utilizadas, podendo ela ser não ponderada (considera apenas as informações de presença e ausência de espécies) ou ponderada (usa informações de abundância de espécies e pondera o comprimento do ramo com diferença de abundância) (Chen et al., 2012).

Em relação a diversidade- $\beta$ , foi observado diferenças estatísticas tanto na análise não ponderada, quanto na análise ponderada, mostrando que apesar de a riqueza e equidade entre os grupos ser parecida, a composição das espécies em cada grupo é diferente. Esta mesma situação foi observada no estudo de Liu et al. (2022) que acompanhou 106 indivíduos desde a fase aguda da covid-19 até 6 meses depois da resolução da doença e 68 controles mostrando que a diversidade- $\beta$  dos indivíduos estava alterada um mês após a doença e essa alteração permaneceu na análise de seis meses quando comparado com o grupo controle (Liu et al., 2022). Também, um estudo avaliando as diferenças da microbiota intestinal entre indivíduos durante a infecção, pós-povid-19 e grupo controle, apresentou diferença significativa da diversidade- $\beta$  quando comparado o grupo controle e os grupos covid e pós-covid, este mesmo estudo encontrou uma correlação significativa entre as OTUs observadas durante a infecção por covid-19 e marcadores inflamatórios, como contagem de células brancas sanguíneas, PCR e procalcitonina (Schult et al., 2022), evidenciando a influência da microbiota intestinal na gravidade da doença.

Quando comparado indivíduos com a forma severa da covid-19, indivíduos recuperados e controles saudáveis a diversidade- $\beta$  do grupo recuperado foi diferente do grupo controle, mas não foi encontrada diferença entre sujeitos recuperados e com a forma severa da doença (Maeda et al., 2022). Por outro lado, apesar das diferenças encontradas durante a infecção e logo após a recuperação, um estudo que avaliou a diversidade- $\beta$  em um acompanhamento de até um ano depois da infecção pelo SARS-CoV-2 indicou um processo de retorno gradual à microbiota normal pela PCoA (Cui et al., 2022).

Estudos vêm relatando que sujeitos infectados pelo SARS-CoV-2 possuem uma microbiota intestinal alterada quando comparado com indivíduos saudáveis e que essa alteração pode estar correlacionada com a resposta imune do hospedeiro, gravidade da doença e complicações a longo prazo (Gu et al., 2020; Zuo et al., 2020; Yeoh et al., 2021). Nas análises taxonômicas, o presente estudo também encontrou alterações a níveis filogenéticos em indivíduos que tiveram a covid-19.

Em nível de gênero, a abundância relativa de *Lachnospira* foi significativamente aumentada no grupo caso em relação ao controle. Apesar de alguns estudos relatarem uma diminuição desse gênero durante a fase aguda da covid-19 (Zuo et al., 2020; Xu et al., 2022), a avaliação da microbiota intestinal durante a recuperação da doença mostrou um aumento gradual de *Lachnospira*. Este mesmo estudo mostrou que os gêneros *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* e *Lachnospira* foram positivamente correlacionados com níveis de esfingosina-1-fosfato, que está intimamente relacionada à tempestade de citocinas na covid-19 e aumentou significativamente durante o processo de recuperação (Marfia et al., 2021; Cui et al., 2022). Em contrapartida, as abundâncias de *Muribaculaceae* e *Mitsuokella* gradualmente diminuíram durante a recuperação (Cui et al., 2022), diferente do que foi encontrado neste estudo em que esses dois gêneros estavam também aumentados no grupo caso.

Bactérias do gênero *Mitsuokella* tem uma forte capacidade de fermentar carboidratos (Jiang et al., 2020), assim como membros da família *Muribaculaceae*, que são abundantes no intestino de mamíferos, especializados na fermentação de polissacarídeos complexos e produtores de propionato, que está envolvido na modulação de citocinas e quimiocinas, saciedade, trânsito intestinal e metabolismos da glicose (Samuel et al., 2008; Ormerod et al., 2016). O aumento da abundância de tais bactérias no trato intestinal pode ser uma mudança adaptativa para aumentar a ingestão de energia do hospedeiro em situações em que essa demanda é aumentada (Jiang et al., 2020), como é no caso do estado inflamatório gerado para combater uma infecção viral. De fato, já foi demonstrado que a microbiota fecal de sujeitos positivos para o vírus da imunodeficiência humana (HIV) e que não estavam em terapia antirretroviral tinham uma maior abundância de *Mitsuokella* comparado com a população sem HIV (Dubourg et al., 2017), além disso, a infecção pelo vírus da imunodeficiência símia (SIV) em macacos rhesus foi associada ao rompimento do revestimento epitelial intestinal que levou a uma ativação do sistema imunológico, contribuindo para a progressão da infecção pelo SIV para AIDS (Handley et al., 2012).

A relação entre a microbiota e o desenvolvimento e funcionamento do sistema imune dos mamíferos incluem diversas interações recíprocas que podem ser moduladas diferentemente durante a homeostase e a doença (Zheng et al., 2020). Enquanto a microbiota possui papel importante no desenvolvimento de componentes da resposta imune inata e adaptativa do hospedeiro, o sistema imune pode modular recursos importantes relacionados a simbiose entre a microbiota e o hospedeiro (Mazmanian et

al., 2008). Desequilíbrios na interação entre a microbiota e o sistema imune podem contribuir para a patogenicidade e gravidade de doenças que desencadeiam respostas imune exacerbadas (Britton et al., 2019; Bishehsari et al., 2020).

Segundo estudo de Zheng et al. (2020), a desregulação imune favorece a perturbação da homeostase da microbiota intestinal, frequentemente apresentando redução da abundância de bactérias *Ruminococcus* e *Lactobacilos* e aumento de *Proteobactérias*. No entanto, no presente estudo, não foram observadas diferenças significativas quando avaliadas estes grupos taxonômicos. Contudo, distúrbios capazes de alterar a riqueza microbiana também podem estar relacionados com fatores ambientais, tais como a dieta e o uso de antibióticos, ou até mesmo a susceptibilidade genética do indivíduo, podendo explicar a falta de correlação entre os dados observados neste trabalho (Vojdani, 2014; Rothschild et al., 2018).

Receptores de reconhecimento de padrão como os receptores Toll-like (TLRs) são fundamentais na sensibilidade de sinais durante a infecção, promovendo o início da resposta imune. No entanto, ligantes para estes receptores não são exclusivos de patógenos, sendo abundantemente produzidos pela microbiota em indivíduos saudáveis (Chu & Mazmanian, 2013). Também, os TLRs estão envolvidos na defesa do hospedeiro contra patógenos e podem regular a abundância da microbiota intestinal (Rakoff-Nahoum et al., 2004). Portanto, pode-se sugerir que com o aumento da resposta imune durante a infecção por covid-19 a microbiota intestinal do hospedeiro possa ser alterada.

Além disso, alterações na composição da microbiota também podem interferir na resposta imune do hospedeiro, principalmente através de seus metabólitos, como por exemplo o butirato que é um AGCC produzido pelas bactérias comensais do intestino e principal fonte de energia para os colonócitos, ele pode modular a diferenciação de monócitos para macrófagos a partir da inibição da histona deacetilase 3 (Schulthess et al., 2019). Como os monócitos e macrófagos são células efetoras fundamentais para o funcionamento normal do sistema imune inato durante a homeostase, o comprometimento da microbiota pode influenciar na capacidade imunológica de indivíduos acometidos por doenças infecciosas (Mosser & Edwards, 2008).

A análise taxonômica deste estudo revelou que os indivíduos que foram infectados pelo vírus SARS-CoV-2 tiveram uma diminuição da classe *Verrucomicrobiae* e do gênero *Akkermansia* (pertencente a classe *Verrucomicrobiae*) em sua microbiota intestinal em relação ao grupo controle. A *Akkermansia muciniphila* é uma bactéria que faz parte da

microbiota intestinal e é conhecida por ser uma produtora de AGCC, mais especificamente o acetado, agindo como agonista do receptor de hidrocarboneto aril (AhR) que bloqueia a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Koh et al., 2016).

Xu et al. (2022) mostrou que essa bactéria, assim como *Bacteroides ovatus* e *Bacteroides cellulosilyticus*, estavam diminuídas na microbiota de indivíduos com a forma moderada da covid-19. Os resultados aqui apresentados sugerem que mesmo após a recuperação, a abundância de *Akkermansia* permanece alterada. O mesmo estudo de Xu et al. (2022) também revelou que a *Akkermansia muciniphila* estava positivamente correlacionada com um aumento da isoenzima creatina quinase (CK) e AST, marcadores que indicam potencial comprometimento cardiovascular e hepático e já foi demonstrado que a suplementação de *Akkermansia muciniphila* viva é capaz de aumentar ligeiramente o nível de CK, indicando uma relação dessa bactéria com a regulação do sistema cardiovascular (Depommier et al., 2019). Essas observações contribuem com a hipótese de que alterações na microbiota intestinal podem contribuir para disfunções em vários órgãos, severidade e até mesmo para sintomas pós-covid-19.

É importante salientar que em indivíduos que desenvolveram a forma grave da covid-19, a inflamação sistêmica e repercussões fisiológicas prolongadas, como dano pulmonar grave, esteve associado a alterações da microbiota por um período de seis meses após a infecção (Wu et al., 2021; Zhang et al., 2021). Estas mudanças expressivas da riqueza, diversidade e abundância da microbiota podem estar relacionadas, tanto pela infecção intestinal direta, quanto pela interação entre a microbiota oral, pulmonar e intestinal, que sofre distúrbio durante a resposta inflamatória causada pelo SARS-CoV-2 (Omer & Kubra, 2021; Chen et al., 2022).

Também é válido destacar que a redução da abundância e diversidade de microrganismos intestinais pode levar a colonização de patógenos oportunistas e prejudicar o sistema de defesa do hospedeiro (Gu et al., 2020). Como demonstrado no presente estudo, a alteração da diversidade e abundância de espécies de microrganismos intestinais pode estar relacionada a disbiose após a infecção por covid-19 (Hilpert & Mikut, 2021). No entanto, fatores como a nutrição e alimentação dos indivíduos neste período pode influenciar fortemente no reestabelecimento da microbiota normal, favorecendo a homeostase do organismo (Alberca & Alberca, 2021). Além disso, a utilização de probióticos para o tratamento da disbiose intestinal possibilita uma melhora tanto nos sintomas

persistentes pós-covid como na própria saúde gastrointestinal dos indivíduos (d'Ettorre et al., 2020; Ceccarelli et al., 2021).

Os achados do presente estudo devem ser interpretados considerando algumas limitações. Primeiro, por se tratar de um estudo transversal que iniciou após o colapso da pandemia, não sendo possível coletar dados de antes desse período, não se pode inferir causalidade. Em segundo lugar, o número pequeno da amostra, em que a maioria dos casos incluídos no estudo foram assintomáticos ou apresentavam sintomas leves, o que pode limitar a generalização dos achados para casos moderados/graves. Finalmente, a ausência de dados, como condições médicas gerais, uso recente de antibióticos e padrões de consumo alimentar, levando em consideração que a microbiota intestinal é influenciada fortemente por fatores ambientais como os mencionados. Apesar dessas limitações, o presente estudo tem pontos fortes. Esse estudo avaliou a microbiota intestinal através da análise da região V4 do gene RNA ribossomal 16S por sequenciamento de nova geração que é considerado método de referência para a identificação bacteriana. Também, por conta dessa metodologia de sequenciamento também foi possível identificar até 2.507 OTUs nas amostras de cada indivíduo incluído na pesquisa. Por fim, esses resultados podem contribuir para o desenho de futuros estudos de coorte prospectivos destinados a avaliar sintomas e consequências de longo prazo na microbiota intestinal decorrentes da infecção pelo SARS-CoV-2, assim como os mecanismos moleculares envolvidos nessas condições.

## 6 CONCLUSÃO

É fato que os mecanismos envolvidos com a patogênese da covid-19, sua influência em órgãos e sistemas além do sistema pulmonar e as consequências que a infecção pode gerar a longo prazo ainda precisam ser melhor elucidadas. Os achados do presente estudo mostraram que a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 está associada com alterações na abundância, riqueza e diversidade da microbiota intestinal de indivíduos que contraíram a covid-19 e que essa alteração ainda está presente pelo menos um mês após a resolução da doença. São necessários mais estudos para esclarecer as características dessas alterações, mecanismos envolvidos e as consequências que essas alterações podem gerar a longo prazo, além de estratégias de manejo e tratamento para tais alterações.

## REFERÊNCIAS

- Akour A. Probiotics and COVID-19: is there any link? *Lett Appl Microbiol* 2020;71:229–34. <https://doi.org/10.1111/LAM.13334>.
- Alberca GGF, Alberca RW. Nutrition and the microbiota post-COVID-19. *Saudi J Gastroenterol* 2021;27:112. [https://doi.org/10.4103/SJG.SJG\\_75\\_21](https://doi.org/10.4103/SJG.SJG_75_21).
- Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Paslier D le, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473:174–80. <https://doi.org/10.1038/NATURE09944>.
- Bäckhed F, Ley RE, Sonnenburg JL, Peterson DA, Gordon JI. Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science* 2005;307:1915–20. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1104816>.
- Bercik P, Denou E, Collins J, Jackson W, Lu J, Jury J, et al. The intestinal microbiota affect central levels of brain-derived neurotropic factor and behavior in mice. *Gastroenterology* 2011;141:599–609. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2011.04.052>.
- Bibbò S, Dore MP, Pes GM, Delitala G, Delitala AP. Is there a role for gut microbiota in type 1 diabetes pathogenesis? *Ann Med* 2017;49:11–22. <https://doi.org/10.1080/07853890.2016.1222449>.
- Bishehsari F, Engen PA, Voigt RM, Swanson G, Shaikh M, Wilber S, et al. Abnormal Eating Patterns Cause Circadian Disruption and Promote Alcohol-Associated Colon Carcinogenesis. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol* 2020;9:219–37. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2019.10.011>.
- Bostanciklioglu M. Temporal Correlation Between Neurological and Gastrointestinal Symptoms of SARS-CoV-2. *Inflamm Bowel Dis* 2020;26:E89–91. <https://doi.org/10.1093/IBD/IZAA131>.
- Britton GJ, Contijoch EJ, Mogno I, Vennaro OH, Llewellyn SR, Ng R, et al. Microbiotas from Humans with Inflammatory Bowel Disease Alter the Balance of Gut Th17 and ROR $\gamma$ t+ Regulatory T Cells and Exacerbate Colitis in Mice. *Immunity* 2019;50:212–224.e4. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.12.015>.
- Brodin P. Immune determinants of COVID-19 disease presentation and severity. *Nat Med* 2021;27:28–33. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-01202-8>.

del Brutto OH, Wu S, Mera RM, Costa AF, Recalde BY, Issa NP. Cognitive decline among individuals with history of mild symptomatic SARS-CoV-2 infection: A longitudinal prospective study nested to a population cohort. *Eur J Neurol* 2021;28:3245–53. <https://doi.org/10.1111/ENE.14775>.

Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nature Methods* 2016 13:7 2016;13:581–3. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3869>.

Carlessi AS, Borba LA, Zugno AI, Quevedo J, Réus GZ. Gut microbiota-brain axis in depression: The role of neuroinflammation. *Eur J Neurosci* 2021;53:222–35. <https://doi.org/10.1111/EJN.14631>.

Ceccarelli G, Borrazzo C, Pinacchio C, Santinelli L, Innocenti G, Cavallari EN, et al. Oral Bacteriotherapy in Patients With COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Front Nutr* 2021;7:613928. <https://doi.org/10.3389/FNUT.2020.613928>.

Chassaing B, Koren O, Goodrich JK, Poole AC, Srinivasan S, Ley RE, et al. Dietary emulsifiers impact the mouse gut microbiota promoting colitis and metabolic syndrome. *Nature* 2015;519:92–6. <https://doi.org/10.1038/NATURE14232>.

Chaves Andrade M, Souza de Faria R, Avelino Mota Nobre S. COVID-19: Can the symptomatic SARS-CoV-2 infection affect the homeostasis of the gut-brain-microbiota axis? *Med Hypotheses* 2020;144:110206. <https://doi.org/10.1016/J.MEHY.2020.110206>.

Chen G, Wu D, Guo W, Cao Y, Huang D, Wang H, et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. *J Clin Invest* 2020;130:2620–9. <https://doi.org/10.1172/JCI137244>.

Chen J, Bittinger K, Charlson ES, Hoffmann C, Lewis J, Wu GD, et al. Associating microbiome composition with environmental covariates using generalized UniFrac distances. *Bioinformatics* 2012;28:2106–13. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTS342>.

Chen Yanfei, Gu S, Chen Yunbo, Lu H, Shi D, Guo J, et al. Six-month follow-up of gut microbiota richness in patients with COVID-19. *Gut* 2022;71:222–5. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2021-324090>.



Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, et al. Gastrointestinal Manifestations of SARS-CoV-2 Infection and Virus Load in Fecal Samples From a Hong Kong Cohort: Systematic Review and Meta-analysis. *Gastroenterology* 2020;159:81–95. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.03.065>.

Chu H, Mazmanian SK. Innate immune recognition of the microbiota promotes host-microbial symbiosis. *Nat Immunol* 2013;14:668–75. <https://doi.org/10.1038/NI.2635>.

Cox LM, Yamanishi S, Sohn J, Alekseyenko A v., Leung JM, Cho I, et al. Altering the intestinal microbiota during a critical developmental window has lasting metabolic consequences. *Cell* 2014;158:705–21. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2014.05.052>.

Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour. *Nat Rev Neurosci* 2012;13:701–12. <https://doi.org/10.1038/NRN3346>.

Cryan JF, O’Mahony SM. The microbiome-gut-brain axis: from bowel to behavior. *Neurogastroenterol Motil* 2011;23:187–92. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2982.2010.01664.X>.

Cui GY, Rao BC, Zeng ZH, Wang XM, Ren T, Wang HY, et al. Characterization of oral and gut microbiome and plasma metabolomics in COVID-19 patients after 1-year follow-up. *Mil Med Res* 2022;9:1–13. <https://doi.org/10.1186/S40779-022-00387-Y/FIGURES/5>.

D’Aversa F, Tortora A, Ianiro G, Ponziani FR, Annicchiarico BE, Gasbarrini A. Gut microbiota and metabolic syndrome. *Intern Emerg Med* 2013;8 Suppl 1:S11. <https://doi.org/10.1007/S11739-013-0916-Z>.

Dawood FS, Ricks P, Njie GJ, Daugherty M, Davis W, Fuller JA, et al. Observations of the global epidemiology of COVID-19 from the prepandemic period using web-based surveillance: a cross-sectional analysis. *Lancet Infect Dis* 2020;20:1255–62. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30581-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30581-8).

Deng J, Zhou F, Hou W, Silver Z, Wong CY, Chang O, et al. The prevalence of depression, anxiety, and sleep disturbances in COVID-19 patients: a meta-analysis. *Ann N Y Acad Sci* 2021;1486:90–111. <https://doi.org/10.1111/NYAS.14506>.

Depommier C, Everard A, Druart C, Plovier H, van Hul M, Vieira-Silva S, et al. Supplementation with *Akkermansia muciniphila* in overweight and obese human volunteers: a proof-of-concept exploratory study. *Nat Med* 2019;25:1096–103. <https://doi.org/10.1038/S41591-019-0495-2>.

d'Ettoire G, Ceccarelli G, Marazzato M, Campagna G, Pinacchio C, Alessandri F, et al. Challenges in the Management of SARS-CoV2 Infection: The Role of Oral Bacteriotherapy as Complementary Therapeutic Strategy to Avoid the Progression of COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 2020;7:389. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00389>.

Dubourg G, Surenaud M, Lévy Y, Hüe S, Raoult D. Microbiome of HIV-infected people. *Microb Pathog* 2017;106:85–93. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2016.05.015>.

Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, Purdom E, Dethlefsen L, Sargent M, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005;308:1635–8. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1110591>.

Eckerle I, Meyer B. SARS-CoV-2 seroprevalence in COVID-19 hotspots. *Lancet* 2020;396:514–5. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)31482-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)31482-3).

Erny D, de Angelis ALH, Jaitin D, Wieghofer P, Staszewski O, David E, et al. Host microbiota constantly control maturation and function of microglia in the CNS. *Nat Neurosci* 2015;18:965–77. <https://doi.org/10.1038/NN.4030>.

Evrensel A, Ceylan ME. The Gut-Brain Axis: The Missing Link in Depression. *Clin Psychopharmacol Neurosci* 2015;13:239–44. <https://doi.org/10.9758/CPN.2015.13.3.239>.

Flint HJ, Scott KP, Louis P, Duncan SH. The role of the gut microbiota in nutrition and health. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2012;9:577–89. <https://doi.org/10.1038/NRGASTRO.2012.156>.

Follmer C. Viral Infection-Induced Gut Dysbiosis, Neuroinflammation, and  $\alpha$ -Synuclein Aggregation: Updates and Perspectives on COVID-19 and Neurodegenerative Disorders. *ACS Chem Neurosci* 2020;11:4012–6. <https://doi.org/10.1021/ACSCHEMNEURO.0C00671>.

Forchette L, Sebastian W, Liu T. A Comprehensive Review of COVID-19 Virology, Vaccines, Variants, and Therapeutics. *Curr Med Sci* 2021;41:1037–51. <https://doi.org/10.1007/S11596-021-2395-1>.

- Foster JA, McVey Neufeld KA. Gut-brain axis: how the microbiome influences anxiety and depression. *Trends Neurosci* 2013;36:305–12. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2013.01.005>.
- Frank DN, Pace NR. Gastrointestinal microbiology enters the metagenomics era. *Curr Opin Gastroenterol* 2008;24:4–10. <https://doi.org/10.1097/MOG.0B013E3282F2B0E8>.
- Galanopoulos M, Gkeros F, Doukatas A, Karianakis G, Pontas C, Tsoukalas N, et al. COVID-19 pandemic: Pathophysiology and manifestations from the gastrointestinal tract. *World J Gastroenterol* 2020;26:4579–88. <https://doi.org/10.3748/WJG.V26.I31.4579>.
- Gao QY, Chen YX, Fang JY. 2019 Novel coronavirus infection and gastrointestinal tract. *J Dig Dis* 2020;21:125–6. <https://doi.org/10.1111/1751-2980.12851>.
- Geva-Zatorsky N, Sefik E, Kua L, Pasmán L, Tan TG, Ortiz-Lopez A, et al. Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell* 2017;168:928-943.e11. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2017.01.022>.
- Gill SR, Pop M, DeBoy RT, Eckburg PB, Turnbaugh PJ, Samuel BS, et al. Metagenomic analysis of the human distal gut microbiome. *Science* 2006;312:1355–9. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1124234>.
- Gorbalenya AE, Baker SC, Baric RS, de Groot RJ, Drosten C, Gulyaeva AA, et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nat Microbiol* 2020;5:536–44. <https://doi.org/10.1038/S41564-020-0695-Z>.
- Governo de Santa Catarina. Boletins – Coronavírus 2022. <http://www.coronavirus.sc.gov.br/boletins/> (accessed April 7, 2022).
- Gu S, Chen Yanfei, Wu Z, Chen Yunbo, Gao H, Lv L, et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients With Coronavirus Disease 2019 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis* 2020;71:2669–78. <https://doi.org/10.1093/CID/CIAA709>.
- Guan W, Ni Z, Hu Yu, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. *N Engl J Med* 2020;382:1708–20. <https://doi.org/10.1056/NEJMOA2002032>.

Gupta A, Madhavan M v., Sehgal K, Nair N, Mahajan S, Sehrawat TS, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med* 2020;26:1017–32. <https://doi.org/10.1038/S41591-020-0968-3>.

Hamming I, Timens W, Bulthuis MLC, Lely AT, Navis GJ, van Goor H. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol* 2004;203:631–7. <https://doi.org/10.1002/PATH.1570>.

Handley SA, Thackray LB, Zhao G, Presti R, Miller AD, Droit L, et al. Pathogenic simian immunodeficiency virus infection is associated with expansion of the enteric virome. *Cell* 2012;151:253–66. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2012.09.024>.

Hao Q, Dong BR, Wu T. Probiotics for preventing acute upper respiratory tract infections. *Cochrane Database Syst Rev* 2015;1:CD006895. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006895.PUB3>.

Hashimoto T, Perlot T, Rehman A, Trichereau J, Ishiguro H, Paolino M, et al. ACE2 links amino acid malnutrition to microbial ecology and intestinal inflammation. *Nature* 2012;487:477–81. <https://doi.org/10.1038/NATURE11228>.

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;58:1021–8. <https://doi.org/10.1515/CCLM-2020-0369>.

Hilpert K, Mikut R. Is There a Connection Between Gut Microbiome Dysbiosis Occurring in COVID-19 Patients and Post-COVID-19 Symptoms? *Front Microbiol* 2021;12:732838. <https://doi.org/10.3389/FMICB.2021.732838>.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell* 2020;181:271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2020.02.052>.

Honda K, Littman DR. The microbiota in adaptive immune homeostasis and disease. *Nature* 2016;535:75–84. <https://doi.org/10.1038/NATURE18848>.

Hu B, Guo H, Zhou P, Shi ZL. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 2021;19:141–54. <https://doi.org/10.1038/S41579-020-00459-7>.

Huang J, Hume AJ, Abo KM, Werder RB, Villacorta-Martin C, Alysandratos KD, et al. SARS-CoV-2 Infection of Pluripotent Stem Cell-Derived Human Lung Alveolar Type 2 Cells Elicits a Rapid Epithelial-Intrinsic Inflammatory Response. *Cell Stem Cell* 2020;27:962-973.e7. <https://doi.org/10.1016/J.STEM.2020.09.013>.

Huang Q, Wu X, Zheng X, Luo S, Xu S, Weng J. Targeting inflammation and cytokine storm in COVID-19. *Pharmacol Res* 2020;159:105051. <https://doi.org/10.1016/J.PHRS.2020.105051>.

Hurlbert SH. The Nonconcept of Species Diversity: A Critique and Alternative Parameters. *Ecology* 1971;52:577–86. <https://doi.org/10.2307/1934145>.

Hussman JP. Cellular and Molecular Pathways of COVID-19 and Potential Points of Therapeutic Intervention. *Front Pharmacol* 2020;11:1169. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01169>.

Jiang S, Wang B, Sha T, Li X. Changes in the Intestinal Microbiota in Patients with Stage 5 Chronic Kidney Disease on a Low-Protein Diet and the Effects of Human to Rat Fecal Microbiota Transplantation. *Med Sci Monit* 2020;26:e921557. <https://doi.org/10.12659/MSM.921557>.

Jin X, Lian JS, Hu JH, Gao J, Zheng L, Zhang YM, et al. Epidemiological, clinical and virological characteristics of 74 cases of coronavirus-infected disease 2019 (COVID-19) with gastrointestinal symptoms. *Gut* 2020;69:1002–9. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-320926>.

Johnson KD, Harris C, Cain JK, Hummer C, Goyal H, Perisetti A. Pulmonary and Extra-Pulmonary Clinical Manifestations of COVID-19. *Front Med (Lausanne)* 2020;7:526. <https://doi.org/10.3389/FMED.2020.00526>.

Kaakoush NO. Insights into the Role of Erysipelotrichaceae in the Human Host. *Front Cell Infect Microbiol* 2015;5. <https://doi.org/10.3389/FCIMB.2015.00084>.

Kim A. Dysbiosis: A Review Highlighting Obesity and Inflammatory Bowel Disease. *J Clin Gastroenterol* 2015;49 Suppl 1:S20–4. <https://doi.org/10.1097/MCG.0000000000000356>.

- Koh A, de Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, Bäckhed F. From Dietary Fiber to Host Physiology: Short-Chain Fatty Acids as Key Bacterial Metabolites. *Cell* 2016;165:1332–45. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2016.05.041>.
- Krishnamoorthy Y, Nagarajan R, Saya GK, Menon V. Prevalence of psychological morbidities among general population, healthcare workers and COVID-19 patients amidst the COVID-19 pandemic: A systematic review and meta-analysis. *Psychiatry Res* 2020;293:113382. <https://doi.org/10.1016/J.PSYCHRES.2020.113382>.
- Krishnan S, Ding Y, Saedi N, Choi M, Sridharan G v., Sherr DH, et al. Gut Microbiota-Derived Tryptophan Metabolites Modulate Inflammatory Response in Hepatocytes and Macrophages. *Cell Rep* 2018;23:1099–111. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2018.03.109>.
- Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med* 2020;8:1233–44. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30404-5](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30404-5).
- Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine. *Cell* 2006;124:837–48. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2006.02.017>.
- Liu Jing, Li S, Liu Jia, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* 2020;55:102763. <https://doi.org/10.1016/J.EBIOM.2020.102763>.
- Liu Q, Mak JWY, Su Q, Yeoh YK, Lui GCY, Ng SSS, et al. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. *Gut* 2022;71:544–52. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2021-325989>.
- Lloyd M, Ghelardi RJ. A Table for Calculating the 'Equitability' Component of Species Diversity. *J Anim Ecol* 1964;33:217. <https://doi.org/10.2307/2628>.
- Louis P, Flint HJ. Formation of propionate and butyrate by the human colonic microbiota. *Environ Microbiol* 2017;19:29–41. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13589>.

Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* 2020;395:565–74. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8).

Maeda Y, Motooka D, Kawasaki T, Oki H, Noda Y, Adachi Y, et al. Longitudinal alterations of the gut mycobiota and microbiota on COVID-19 severity. *BMC Infect Dis* 2022;22:572. <https://doi.org/10.1186/S12879-022-07358-7>.

Maes M, Kubera M, Leunis JC, Berk M, Geffard M, Bosmans E. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neoepitopes. *Acta Psychiatr Scand* 2013;127:344–54. <https://doi.org/10.1111/J.1600-0447.2012.01908.X>.

Magne F, Gotteland M, Gauthier L, Zazueta A, Pessoa S, Navarrete P, et al. The Firmicutes/Bacteroidetes Ratio: A Relevant Marker of Gut Dysbiosis in Obese Patients? *Nutrients* 2020;12:1474. <https://doi.org/10.3390/NU12051474>.

Mahooti M, Miri SM, Abdolalipour E, Ghaemi A. The immunomodulatory effects of probiotics on respiratory viral infections: A hint for COVID-19 treatment? *Microb Pathog* 2020;148:104452. <https://doi.org/10.1016/J.MICPATH.2020.104452>.

Mak JWY, Chan FKL, Ng SC. Probiotics and COVID-19: one size does not fit all. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020;5:644–5. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(20\)30122-9](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(20)30122-9).

Mancabelli L, Milani C, Lugli GA, Turrone F, Mangifesta M, Viappiani A, et al. Unveiling the gut microbiota composition and functionality associated with constipation through metagenomic analyses. *Sci Rep* 2017;7:9879. <https://doi.org/10.1038/S41598-017-10663-W>.

Manosso LM, Lin J, Carlessi AS, Recco KCC, Quevedo J, Gonçalves CL, et al. Sex-related patterns of the gut-microbiota-brain axis in the neuropsychiatric conditions. *Brain Res Bull* 2021;171:196–208. <https://doi.org/10.1016/J.BRAINRESBULL.2021.04.001>.

Marfia G, Navone S, Guarnaccia L, Campanella R, Mondoni M, Locatelli M, et al. Decreased serum level of sphingosine-1-phosphate: a novel

predictor of clinical severity in COVID-19. *EMBO Mol Med* 2021;13:e13424. <https://doi.org/10.15252/emmm.202013424>.

Mazmanian SK, Round JL, Kasper DL. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease. *Nature* 2008;453:620–5. <https://doi.org/10.1038/NATURE07008>.

McIntosh RP. An Index of Diversity and the Relation of Certain Concepts to Diversity. *Ecology* 1967;48:392–404. <https://doi.org/10.2307/1932674>.

McLaren MR, Callahan BJ. Silva 138.1 prokaryotic SSU taxonomic training data formatted for DADA2 2021. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.4587955>.

McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: an R package for reproducible interactive analysis and graphics of microbiome census data. *PLoS One* 2013;8:e61217. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0061217>.

Mikryukov V. vmikk/metagMisc: v.0.0.0.9000 2017. <https://doi.org/10.5281/ZENODO.571403>.

Mönkemüller K, Fry LC, Ricketts S. COVID-19, coronavirus, SARS-CoV-2 and the small bowel. *Rev Esp Enferm Dig* 2020;112:383–8. <https://doi.org/10.17235/REED.2020.7137/2020>.

Mörkl S, Lackner S, Meinitzer A, Mangge H, Lehofer M, Halwachs B, et al. Gut microbiota, dietary intakes and intestinal permeability reflected by serum zonulin in women. *Eur J Nutr* 2018;57:2985–97. <https://doi.org/10.1007/S00394-018-1784-0>.

Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 2008;8:958–69. <https://doi.org/10.1038/NRI2448>.

Negi S, Pahari S, Bashir H, Agrewala JN. Gut Microbiota Regulates Mincle Mediated Activation of Lung Dendritic Cells to Protect Against Mycobacterium tuberculosis. *Front Immunol* 2019;10:1142. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2019.01142>.

Newsome RC, Gauthier J, Hernandez MC, Abraham GE, Robinson TO, Williams HB, et al. The gut microbiome of COVID-19 recovered patients returns to uninfected status in a minority-dominated United States cohort.



Gut Microbes 2021a;13:1–15.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1926840>.

Newsome RC, Gauthier J, Hernandez MC, Abraham GE, Robinson TO, Williams HB, et al. The gut microbiome of COVID-19 recovered patients returns to uninfected status in a minority-dominated United States cohort. Gut Microbes 2021b;13:1–15.  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1926840>.

Omer S, Kubra S. Systematic Review of microRNAs in the SARS-CoV-2 Infection: Are microRNAs Potential Therapy for COVID-19? J Genet Genome Res 2021;8:053. <https://doi.org/10.23937/2378-3648/1410053>.

Ormerod KL, Wood DLA, Lachner N, Gellatly SL, Daly JN, Parsons JD, et al. Genomic characterization of the uncultured Bacteroidales family S24-7 inhabiting the guts of homeothermic animals. Microbiome 2016;4:36. <https://doi.org/10.1186/S40168-016-0181-2>.

Pan L, Mu M, Yang P, Sun Y, Wang R, Yan J, et al. Clinical Characteristics of COVID-19 Patients With Digestive Symptoms in Hubei, China: A Descriptive, Cross-Sectional, Multicenter Study. Am J Gastroenterol 2020;115:766–73.  
<https://doi.org/10.14309/AJG.0000000000000620>.

Peet RK. The Measurement of Species Diversity. Annu Rev Ecol Syst 1974;5:285–307.  
<https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ES.05.110174.001441>.

Perlot T, Penninger JM. ACE2 - from the renin-angiotensin system to gut microbiota and malnutrition. Microbes Infect 2013;15:866–73.  
<https://doi.org/10.1016/J.MICINF.2013.08.003>.

Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature 2010;464:59–65.  
<https://doi.org/10.1038/NATURE08821>.

Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. Front Immunol 2020;11:1446. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2020.01446>.

Rajilić-Stojanović M. Function of the microbiota. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2013;27:5–16. <https://doi.org/10.1016/J.BPG.2013.03.006>.

Rajilić-Stojanović M, de Vos WM. The first 1000 cultured species of the human gastrointestinal microbiota. *FEMS Microbiol Rev* 2014;38:996–1047. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12075>.

Rakoff-Nahoum S, Paglino J, Eslami-Varzaneh F, Edberg S, Medzhitov R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. *Cell* 2004;118:229–41. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.07.002>.

Ramanan P, Barreto JN, Osmon DR, Tosh PK. *Rothia* bacteremia: a 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. *J Clin Microbiol* 2014;52:3184–9. <https://doi.org/10.1128/JCM.01270-14>.

Ramani A, Müller L, Ostermann PN, Gabriel E, Abida-Islam P, Müller-Schiffmann A, et al. SARS-CoV-2 targets neurons of 3D human brain organoids. *EMBO J* 2020;39:e106230. <https://doi.org/10.15252/EMBJ.2020106230>.

Rothschild D, Weissbrod O, Barkan E, Kurilshikov A, Korem T, Zeevi D, et al. Environment dominates over host genetics in shaping human gut microbiota. *Nature* 2018;555:210–5. <https://doi.org/10.1038/NATURE25973>.

Samuel BS, Shaito A, Motoike T, Rey FE, Backhed F, Manchester JK, et al. Effects of the gut microbiota on host adiposity are modulated by the short-chain fatty-acid binding G protein-coupled receptor, Gpr41. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:16767–72. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0808567105>.

Schult D, Reitmeier S, Koyumdzhieva P, Lahmer T, Middelhof M, Erber J, et al. Gut bacterial dysbiosis and instability is associated with the onset of complications and mortality in COVID-19. *Gut Microbes* 2022;14:2031840. <https://doi.org/10.1080/19490976.2022.2031840>.

Schulthess J, Pandey S, Capitani M, Rue-Albrecht KC, Arnold I, Franchini F, et al. The Short Chain Fatty Acid Butyrate Imprints an Antimicrobial Program in Macrophages. *Immunity* 2019;50:432-445.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2018.12.018>.

Secretarias Estaduais de Saúde. Coronavírus Brasil 2022. <https://covid.saude.gov.br/> (accessed April 7, 2022).

Singh RK, Chang HW, Yan D, Lee KM, Ucmak D, Wong K, et al. Influence of diet on the gut microbiome and implications for human

health. *J Transl Med* 2017;15:73. <https://doi.org/10.1186/S12967-017-1175-Y>.

Sinha P, Matthay MA, Calfee CS. Is a “Cytokine Storm” Relevant to COVID-19? *JAMA Intern Med* 2020;180:1152–4. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2020.3313>.

Song E, Zhang C, Israelow B, Lu-Culligan A, Prado AV, Skriabine S, et al. Neuroinvasion of SARS-CoV-2 in human and mouse brain. *J Exp Med* 2021;218:e20202135. <https://doi.org/10.1084/JEM.20202135>.

Spor A, Koren O, Ley R. Unravelling the effects of the environment and host genotype on the gut microbiome. *Nat Rev Microbiol* 2011;9:279–90. <https://doi.org/10.1038/NRMICRO2540>.

Suez J, Korem T, Zeevi D, Zilberman-Schapira G, Thaiss CA, Maza O, et al. Artificial sweeteners induce glucose intolerance by altering the gut microbiota. *Nature* 2014;514:181–6. <https://doi.org/10.1038/NATURE13793>.

Sundaraman A, Ray M, Ravindra P v., Halami PM. Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Appl Microbiol Biotechnol* 2020;104:8089–104. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10832-4>.

Tamboli CP, Neut C, Desreumaux P, Colombel JF. Dysbiosis in inflammatory bowel disease. *Gut* 2004;53:1–4. <https://doi.org/10.1136/GUT.53.1.1>.

Tay MZ, Poh CM, Rénia L, MacAry PA, Ng LFP. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nat Rev Immunol* 2020;20:363–74. <https://doi.org/10.1038/S41577-020-0311-8>.

To KF, Lo AWI. Exploring the pathogenesis of severe acute respiratory syndrome (SARS): the tissue distribution of the coronavirus (SARS-CoV) and its putative receptor, angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). *J Pathol* 2004;203:740–3. <https://doi.org/10.1002/PATH.1597>.

Torales J, O’Higgins M, Castaldelli-Maia JM, Ventriglio A. The outbreak of COVID-19 coronavirus and its impact on global mental health. *Int J Soc Psychiatry* 2020;66:317–20. <https://doi.org/10.1177/0020764020915212>.

Ursell LK, Clemente JC, Rideout JR, Gevers D, Caporaso JG, Knight R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *J Allergy Clin Immunol* 2012;129:1204–8. <https://doi.org/10.1016/J.JACI.2012.03.010>.

Vojdani A. A Potential Link between Environmental Triggers and Autoimmunity. *Autoimmune Dis* 2014;2014:437231. <https://doi.org/10.1155/2014/437231>.

Wang Y, Li X, Ge T, Xiao Y, Liao Y, Cui Y, et al. Probiotics for prevention and treatment of respiratory tract infections in children: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Medicine* 2016;95:e4509. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004509>.

Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. *Adv Virus Res*, vol. 81, *Adv Virus Res*; 2011, p. 85–164. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385885-6.00009-2>.

West NP, Horn PL, Pyne DB, Gebiski VJ, Lahtinen SJ, Fricker PA, et al. Probiotic supplementation for respiratory and gastrointestinal illness symptoms in healthy physically active individuals. *Clin Nutr* 2014;33:581–7. <https://doi.org/10.1016/J.CLNU.2013.10.002>.

WHO WHO. WHO Director-General’s opening remarks at the media briefing on COVID-19 - 11 March 2020 2020. <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-COVID-19---11-march-2020> (accessed March 27, 2022).

Wu F, Zhao S, Yu B, Chen YM, Wang W, Song ZG, et al. A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* 2020;579:265–9. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2008-3>.

Wu Y, Cheng X, Jiang G, Tang H, Ming S, Tang L, et al. Altered oral and gut microbiota and its association with SARS-CoV-2 viral load in COVID-19 patients during hospitalization. *NPJ Biofilms Microbiomes* 2021;7:61. <https://doi.org/10.1038/S41522-021-00232-5>.

Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *J Neurochem* 2008;107:1482–94. <https://doi.org/10.1111/J.1471-4159.2008.05723.X>.

Xu K, Cai H, Shen Y, Ni Q, Chen Y, Hu S, et al. [Management of COVID-19: the Zhejiang experience]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2020;49:147–57. <https://doi.org/10.3785/J.ISSN.1008-9292.2020.02.02>.

Xu X, Zhang W, Guo M, Xiao C, Fu Z, Yu S, et al. Integrated analysis of gut microbiome and host immune responses in COVID-19. *Front Med* 2022;16:263–75. <https://doi.org/10.1007/S11684-022-0921-6>.

Yeoh YK, Zuo T, Lui GCY, Zhang F, Liu Q, Li AYL, et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. *Gut* 2021;70:698–706. <https://doi.org/10.1136/GUTJNL-2020-323020>.

Zhang F, Wan Y, Zuo T, Yeoh YK, Liu Q, Zhang L, et al. Prolonged Impairment of Short-Chain Fatty Acid and L-Isoleucine Biosynthesis in Gut Microbiome in Patients With COVID-19. *Gastroenterology* 2022;162:548-561.e4. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2021.10.013>.

Zhang Q, Ran X, He Y, Ai Q, Shi Y. Acetate Downregulates the Activation of NLRP3 Inflammasomes and Attenuates Lung Injury in Neonatal Mice With Bronchopulmonary Dysplasia. *Front Pediatr* 2021;8:595157. <https://doi.org/10.3389/FPED.2020.595157>.

Zheng D, Liwinski T, Elinav E. Interaction between microbiota and immunity in health and disease. *Cell Res* 2020;30:492–506. <https://doi.org/10.1038/S41422-020-0332-7>.

Zhou P, Yang X lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* 2020;579:270–3. <https://doi.org/10.1038/S41586-020-2012-7>.

Zhu Q, Gao R, Wu W, Qin H. The role of gut microbiota in the pathogenesis of colorectal cancer. *Tumour Biol* 2013;34:1285–300. <https://doi.org/10.1007/S13277-013-0684-4>.

Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. *JAMA Neurol* 2020;77:1018–27. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2020.2065>.

Zuo T, Zhang F, Lui GCY, Yeoh YK, Li AYL, Zhan H, et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. *Gastroenterology* 2020;159:944-955.e8. <https://doi.org/10.1053/J.GASTRO.2020.05.048>.

## ANEXO A - CEP

UNIVERSIDADE DO EXTREMO  
SUL CATARINENSE - UNESC

## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

## DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DE MARCADORES DE DANO NEURONAL E NEUROINFLAMATÓRIOS E SUAS RELAÇÕES COM TRANSTORNOS NEUROPSIQUIÁTRICOS EM SUJEITOS POSITIVOS PARA COVID-19

**Pesquisador:** Galaine Zilli Réus

**Área Temática:**

**Versão:** 7

**CAAE:** 35443820.2.1001.0119

**Instituição Proponente:** Universidade do Extremo Sul Catarinense

**Patrocinador Principal:** Universidade do Extremo Sul Catarinense

## DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 5.608.964

## Apresentação do Projeto:

Avaliação da versão 7 - Emenda. A emenda é exclusiva de seu Centro Coordenador, então as alterações realizadas, em virtude da emenda, NÃO serão replicadas nos

Centros Participantes vinculados e nos Comitês de Ética das Instituições Coparticipantes, quando da sua aprovação.

## Resumo:

A pandemia causada pelo novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), causador da COVID-19 cresce a níveis

alarmantes trazendo graves problemas de saúde pública, além dos próprios problemas ocasionados pelo vírus, que incluem graves problemas

respiratórios. Além disso, tanto o vírus quanto as consequências da pandemia podem levar ao surgimento de problemas neurológicos e transtornos

psiquiátricos. Estudos recentes apontam que indivíduos infectados apresentam alterações neurológicas, mas os mecanismos pelos quais essas

alterações e outras que possivelmente ocorrerão tardiamente ainda não foram elucidadas. Há evidências de que o processo inflamatório decorrente

da infecção, bem como do estresse psicológico causado pela pandemia levaria a alterações importantes em vários sistemas biológicos e que

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.105

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 88.806-000

**UF:** SC

**Município:** CROZÁLIA

**Telefone:** (48)3431-2506

**E-mail:** cep@unesc.net

Continuação do Parecer: 0.031.934

afetaria o sistema nervoso central (SNC), levando então ao surgimento de transtornos psiquiátricos. Assim, o presente projeto tem como objetivo investigar a associação de marcadores inflamatórios e de dano neuronal e suas relações com transtornos neuropsiquiátricos em sujeitos positivos para COVID-19. O estudo será um caso-controle em que os casos serão indivíduos sintomáticos e assintomáticos positivos para COVID-19 e os controles serão indivíduos negativos para COVID-19. Serão aplicadas escalas para avaliação da presença de estresse, depressão, ansiedade e alterações do ritmo biológico. Além disso, será investigado perifericamente marcadores de dano neuronal, bem como de inflamação, dano mitocondrial e microbiota intestinal, os quais também se relacionam com inflamação. Será correlacionado esses marcadores com a ocorrência dos transtornos psiquiátricos. Os resultados da pesquisa poderão trazer o entendimento de como o vírus afeta o SNC além de identificar a presença de transtornos que já são por si um problema de saúde pública. As correlações entre os escores de transtornos e a expressão de marcadores biológicos serão também relevantes, tanto para subsídio dos serviços de saúde, quanto para elencar novos estudos que apontem para possíveis tratamentos.

**Hipótese:**

• A COVID-19 tem gerado estressores psicológicos importantes que podem levar ao surgimento de transtornos psiquiátricos e alterações no ritmo biológico • A COVID-19 pode causar danos neuronais e mitocondriais • A COVID-19 pode alterar o sistema imunológico e o SNC • A COVID-19 pode aumentar a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal • A COVID-19 pode influenciar na microbiota intestinal • O exercício físico contínuo melhora sintomas depressivos e capacidades físicas em pacientes que já contrariam

Em dezembro de 2019 iniciou na cidade de Wuhan, na China um surto epidêmico viral, causando em algumas pessoas infectadas uma inflamação intensa, a partir de uma tempestade de citocinas, culminando em síndrome respiratória aguda grave (CHEN et al., 2020; JIN et al., 2020; LU et al., 2020). O vírus da doença foi identificado como um novo coronavírus e denominado de vírus da

Endereço: Avenida Universidade, 1.100  
Bairro: Universitário  
UF: SC Município: CROZÁLIA

CEP: 88.905-000

Telefone: (48)3431-2000

E-mail: [etica@unesc.net](mailto:etica@unesc.net)



Continuação do Projeto: 1.036.004

síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2) e a doença foi denominada de COVID-19 (MCMICHAEL et al., 2020). A doença foi se espalhando e a Organização Mundial da Saúde declarou a epidemia, em 30 de janeiro de 2020, como uma urgência de saúde pública de interesse internacional e em seguida como uma pandemia global (WHO, 2020). No Brasil, os primeiros casos foram observados em fevereiro/2020 e vêm aumentando em números e mortes alarmantes, como em outros países (BRASIL, 2020a). Estudos a partir de doenças causadas por outras variantes de coronavírus, bem como estudos preliminares em pacientes com a COVID-19 vêm mostrando que essas doenças virais podem afetar o sistema nervoso de forma direta, como também, através da inflamação periférica (CAIN et al., 2019; DE FELICE et al., 2020; PLATT et al., 2020). A inflamação no sistema nervoso central (SNC) é um dos mecanismos-chaves em diversas doenças e transtornos psiquiátricos, podendo culminar em prejuízos neuronais crônicos e graves, levando a neurodegeneração em diversas áreas envolvidas com as emoções e processos cognitivos (ANDERSON & MAES, 2017). Os prejuízos neuronais, estruturais e fisiológicos, em longo prazo podem agravar os quadros de doenças neurológicas e transtornos psiquiátricos, trazendo maiores dificuldades de tratamento e maiores prejuízos, tanto aos pacientes, quanto ao sistema de saúde. Portanto, os estudos elencados nesta proposta, objetivam avaliar algumas das importantes alterações em mecanismos inflamatórios e outros marcadores funcionais associados a danos neuronais, os quais podem ocorrer no SNC. Paralelamente serão avaliados os níveis de estresse, transtornos depressivos, ansiosos e do sono. Pelo fato da COVID-19 poder afetar vários sistemas, uma equipe multidisciplinar para a reabilitação dos indivíduos têm se demonstrado de grande importância (BARKER-DAVIES et al., 2020). Dentre as recomendações para a reabilitação dos sujeitos com COVID-19, destaca-se o papel do exercício físico, em especial para a reabilitação pulmonar (BARKER-DAVIES et al., 2020; LI, 2020). Além disso, já é bem documentado na literatura a importância do exercício físico no tratamento de transtornos neuropsiquiátricos (BARBOUR; EDENFIELD; BLUMENTHAL, 2007) e para a saúde mental.

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.105

**Bairro:** Universitário

**CEP:** 88.800-000

**UF:** SC

**Município:** CROZALMA

**Telefone:** (48) 3431-2000

**E-mail:** unesc@unesc.net

Continuação do Parecer: 0.038.954

(MIKKELSEN et al., 2017). Os resultados deste estudo serão de extrema relevância para considerações em monitoramento e avaliações futuras dos indivíduos, tendo em vista que possíveis transtornos ou até mesmo outros prejuízos neuronais podem acarretar em incapacitações e sobrecarga nos serviços de saúde em um futuro não muito distante do período de colapso da pandemia. As correlações entre os escores de transtornos e a expressão de marcadores biológicos serão também relevantes, tanto para subsídio dos serviços de saúde, quanto para elencar novos estudos que apontem para possíveis tratamentos. É importante considerar também que alguns marcadores e mecanismos funcionais que emergirem de forma expressiva neste estudo podem ser relevantes para subsidiar outros estudos relacionados à COVID-19, considerando-se não somente as disfunções no SNC, mas outras funções sistêmicas afetadas pelo SARS-CoV-2 que possam ou não estar interligadas ao sistema nervoso.

**Hipótese:**

• A COVID-19 tem gerado estressores psicológicos importantes que podem levar ao surgimento de transtornos psiquiátricos e alterações no ritmo biológico.  
 • A COVID-19 pode causar danos neuronal e mitocondrial.  
 • A COVID-19 pode alterar o sistema imunológico e o SNC.  
 • A COVID-19 pode aumentar a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal.  
 • A COVID-19 pode influenciar na microbiota intestinal.  
 • O exercício físico contínuo melhora sintomas depressivos e capacidades físicas em pacientes que já contrariam COVID-19.  
 • O treinamento intervalado de alta intensidade (HIIT) melhora sintomas depressivos e capacidades físicas em pacientes que já contrariam COVID-19.

**Objetivo Primário:**

Investigar a associação de marcadores inflamatórios e de dano neuronal e suas relações com transtornos neuropsiquiátricos em sujeitos positivos para COVID-19.

**Objetivo Secundário:**

1) Analisar os níveis periféricos de CCL23 (marcador envolvido em respostas inflamatórias após lesões cerebrais), das citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-15, IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ )) e das anti-inflamatórias IL-10, IL-17 IL-1ra.

Endereço:	Avenida Universitária, 1.105	CEP:	88.205-000
Bairro:	Universitário		
UF:	SC	Município:	CAROLINA
Telefone:	(48)3431-2000	E-mail:	cat304@unesc.net

Continuação do Projeto: 5.602.094

as quais são envolvidas em ativação de células gliais em sujeitos positivos para COVID-19;2) Avaliar os níveis periféricos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e receptor de glicocorticoide (GR), os quais estão associados a ativação do eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA), em sujeitos positivos para COVID-19; 3) Avaliar os níveis periféricos de caspase 8 e do fator neurotrófico-derivado do cérebro (BDNF) (associados a danos no SNC) além da concentração enzimática da enzima acetilcolinesterase em sujeitos positivos para COVID-19;4) Avaliar perifericamente marcadores de estresse oxidativo/nitrosativo (os quais são associados com inflamação e ativação de células gliais) em sujeitos positivos para COVID-19;5) Verificar parâmetros físicos e laboratoriais indicadores de síndrome metabólica; 6) Analisar a microbiota intestinal (a qual está associada com inflamação) em sujeitos positivos para COVID-19;7) Avaliar os níveis de free DNAm e o número de cópias de DNA mitocondrial, assim como o processo da dinâmica mitocondrial e mitofagia através da avaliação do imunociteado das proteínas mitofusins 1, mitofusins 2, Opa1, Fis-1, Drp-1, PINK1, Parkin, Bnip3, Beclin-1, P62/SQSTM1 LC3 A/B em sujeitos positivos para COVID-19;8) Investigar a ocorrência de sintomas de estresse, ansiedade, depressão, ritmo biológico e funcionalidade em sujeitos positivos para COVID-19;9) Aplicar ferramentas de bioinformática e análises estatísticas robustas para avaliar correlações entre marcadores inflamatórios e mitocondriais, assim como para integrar os marcadores periféricos com dados clínicos e neuropsicológicos relevantes;10) Comparar o efeito de um treinamento de HIIT de moderada duração com um treinamento contínuo de moderada duração em sintomas neuropsiquiátricos e nas capacidades físicas em sujeitos positivos para COVID-19.

#### Metodologia Proposta:

Procedimentos para Coleta de Dados:Indivíduos com 4 a 6 semanas após diagnóstico de COVID-19; Primeiramente, o pesquisador responsável pelo recrutamento, entrará em contato com os possíveis indivíduos da pesquisa por meio de contato telefônico. Na ocasião, será realizado o convite, e se aceito, será realizado o agendamento para coleta de dados. As avaliações serão realizadas de

Endereço: Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

CEP: 88.806-090

UF: SC Município: CRICIUMA

Telefone: (48)3431-2000

E-mail: cotica@unesc.net

UNIVERSIDADE DO EXTREMO  
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer 5.888/068

forma prospectiva em três ondas. A coleta de dados para a primeira onda (baseline) ocorrerá de 4 a 6 semanas após diagnóstico comprovado para COVID-19 e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido. Neste momento, será aplicado um questionário para determinação do perfil sociodemográfico e registro retrospectivo sobre o estado de saúde do indivíduo e escalas para a investigação de transtornos psiquiátricos e alterações do ritmo biológico. Além disso, serão obtidas medidas biométricas e amostras de material biológico através da coleta de sangue e fezes. Nas ondas dois (de 24 a 26 semanas após baseline) e três (de 48 a 50 semanas após baseline), além da aplicação das escalas para transtornos psiquiátricos, serão obtidas medidas biométricas e coletadas amostras de material biológico para monitoramento de marcadores neuroinflamatórios e de dano neuronal. Serão computados apenas óbitos ocasionados por COVID-19. Demais casos, serão excluídos do estudo. Após a entrevista e coleta de material biológico da onda dois, os indivíduos que entrarem nos critérios de inclusão serão convidados a participar do protocolo de exercício físico. Inicialmente os voluntários serão submetidos aos testes para avaliar as capacidades físicas. Depois, farão 12 semanas de atividade aquática (contínua ou HIIT). Após a finalização das sessões de treino, serão repetidos os testes iniciais. A parte do exercício físico será realizado pelo grupo de pesquisa em exercícios aquáticos avançados (GPEAA) da Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Santa Catarina, Brasil, localizado nas dependências do curso de educação física, sala 11. Os testes de capacidades físicas serão realizados no laboratório de psicofisiologia do exercício (LaPsico). O GPEAA associado ao LaPsico apresentam todas as condições estruturais e técnicas necessárias para o desenvolvimento do estudo e para atender as eventuais intercorrências, garantindo a proteção aos possíveis riscos. Indivíduos hospitalizados: Serão convidados a participar dessa pesquisa. Indivíduos que estejam internados no HSD, em UTI ou não. Nos casos em que o indivíduo não apresente condições físicas e mentais para decidir se aceita participar do estudo, será contatado seu representante legal, também indicado pelo HSD. As avaliações serão realizadas de forma

Endereço: Avenida Universitária, 1.100 -  
Bairro: Universitário CEP: 88.806-000  
UF: SC Município: CRICIÚMA  
Telefone: (48)3431-2606 Email: reitca@unesc.net

Continuação do Parecer: 3.006.364

prospectiva em três ondas. A coleta de dados para o baseline ocorrerá a qualquer tempo após o diagnóstico comprovado para COVID-19 e

assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelo próprio indivíduo ou seu representante legal. Poderá ser aplicado um questionário

para determinação do perfil sociodemográfico e registro retrospectivo sobre o estado de saúde do indivíduo e escalas para a investigação de

transtornos psiquiátricos e alterações do ritmo biológico, apenas para os casos em que o indivíduo disponha de condições físicas e mentais para tais

questionamentos. Além disso, serão obtidas medidas biométricas, se possível, e amostras de material biológico através da coleta de sangue e fezes.

Considerando a situação dos indivíduos que se encontram hospitalizados, a falta de qualquer um desses dados não ocasionará sua exclusão do

estudo. Nas ondas dois (de 24 a 26 semanas após baseline) e três (de 48 a 50 semanas após baseline), além da aplicação das escalas para

transtornos psiquiátricos, serão obtidas medidas biométricas e coletadas amostras de material biológico para monitoramento de marcadores

neuroinflamatórios e de dano neuronal. Serão computados apenas óbitos ocasionados por COVID-19. Demais casos, serão excluídos do estudo.

**Critério de Inclusão:**

- Ter diagnóstico para COVID-19, comprovado por teste - Possuir idade entre 18 e 90 anos - Residir na região sul do Brasil - Ter diagnóstico de

depressão, diagnosticada pela escala de Hamilton. (Apenas para o protocolo de exercício físico) - Ter liberação médica para exercício físico

aquático. (Apenas para o protocolo de exercício físico) - Ter baixo nível de exercício físico, avaliado pelo Questionário Internacional de Atividade

Física (IPAQ). (Apenas para o protocolo de exercício físico) - Aceitar participar da pesquisa - Assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**Critério de Exclusão:**

- Presença de Transtorno de Humor Bipolar pela M.I.N.I. Plus - Presença de Transtorno de Uso de Substância Psicoativa nos últimos 6 meses

(exceto nicotina, cafeína e álcool) pela M.I.N.I. Plus - Apresentar alguma condição física ou cognitiva que dificulte a participação da pessoa nas

etapas do projeto - Não ter diagnóstico de depressão. (Apenas para o protocolo de exercício

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.925

**Bairro:** Universitário

**UF:** SC

**Telefone:** (48)3431-2638

**Município:** RICIUMA

**CEP:** 88.800-000

**E-mail:** [etica@unesc.net](mailto:etica@unesc.net)

UNIVERSIDADE DO EXTREMO  
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 3.000.004

físico) - Ter alto nível de exercício físico (avaliado pelo Questionário Internacional de Atividade Física (IPAQ)). (Apenas para o protocolo de exercício físico) - Não aceitar participar da pesquisa - Não

assinar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - Desistir de participar da pesquisa a qualquer tempo.

Riscos:

Os entrevistados podem se sentir desconfortáveis com a aplicação dos questionários, os quais envolvem aspectos emocionais. Caso ocorra, os psicólogos e/ou psiquiatras da equipe avaliarão a necessidade de interrupção momentânea da entrevista e darão o suporte necessário. O indivíduo não será excluído da pesquisa, a não ser que opte por isso, e poderá dar continuidade num segundo momento. Além disso, as entrevistas serão realizadas em local reservado e confortável. Há também o risco da perda da confidencialidade dos dados e este risco será amenizado pelo comprometimento dos pesquisadores em manter a privacidade dos dados pessoais do participante da pesquisa. Também pode haver um pequeno desconforto na coleta de fezes, que será amenizado pelo fornecimento de um kit para proporcionar maior conforto durante a coleta. Também pode haver desconforto na coleta de sangue e pequeno hematoma local, ambos transitórios. O risco de infecção é mínimo e serão minimizados com a coleta sendo realizada por um enfermeiro ou biomédico responsáveis e habilitados para coletas de sangue além da aplicação do protocolo de segurança preconizado pela OMS.

Durante a execução do programa de exercícios, será respeitado carga, velocidade e a amplitude de movimento, de acordo com a individualidade biológica de cada indivíduo com a supervisão de dois profissionais de educação física. Cabe destacar que em casos raros podem surgir pequenos efeitos colaterais como dor muscular e câimbras, que serão tratados com a interrupção momentânea do exercício. É importante deixar claro que estes efeitos colaterais geralmente são totalmente revertidos com repouso, não necessitando de nenhum tratamento complementar. No entanto, em casos extremos que possam vir a ocorrer, o voluntário será encaminhado para as clínicas integradas da Unesc para atendimento interdisciplinar.

Endereço: Avenida Universitária, 1.105  
Bairro: Universitário CEP: 88.806-000  
UF: SC Município: CRICIUMA  
Telefone: (48)411-2806 Email: oeca@unesc.net

UNIVERSIDADE DO EXTREMO  
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 3.000.364

especializado com profissionais das áreas da medicina, fisioterapia e enfermagem.

**Benefícios:**

Os indivíduos participantes da pesquisa serão voluntários e não terão qualquer ganho financeiro ou de atendimento do profissional da área da saúde. No entanto, serão ressarcidos os custos com transporte dos indivíduos para participação neste projeto. A pesquisa de dados gerais e das bases biológicas servirá de subsídio para o entendimento do comportamento da nova doença COVID-19 na população da região sul do Brasil. Nos casos que forem identificados sintomas depressivos e ansiosos importantes, os indivíduos serão encaminhados para atendimento especializado em unidades de saúde. A participação na pesquisa trará a possibilidade de busca de soluções para o tratamento e entendimento do curso da COVID19. É esperado benefícios mentais associados a prática de exercício físico, já que a mesma pode aumentar a liberação de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e noradrenalina. Além disso, libera a tensão dos músculos reduzindo a dor, reduz o cortisol, diminui ansiedade, aumenta a autoestima promovendo uma melhor qualidade de vida. Todavia, esperamos que durante a pesquisa os voluntários se conscientizem da importância da prática de atividade física, e adotem um estilo de vida mais ativo após a conclusão da pesquisa (programa de exercícios).

**Metodologia de Análise de Dados:**

A análise preliminar dos dados inspecionará as relações entre as variáveis basais/demográficas, variáveis preditoras (ex. [COVID-19 vs. controle]) e índices de função mitocondrial, inflamação, etc. por meio de testes estatísticos tradicionais (ex., qui-quadrado). As análises preliminares também avaliarão a confusão por variáveis demográficas correspondentes. As análises formais usarão principalmente a modelagem linear generalizada com componentes multiníveis para observações correlacionadas e funções de link apropriadas conforme necessário. A avaliação das premissas distributivas usará gráficos residuais, testes estatísticos formais e verificação preditiva posterior. As violações de premissas serão tratadas por meio de transformação, estimativa robusta, estratificação e/ou escalonamento de coeficientes, quando apropriado. Técnicas de agrupamento serão

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

CEP: 05.000-000

UF: SC

Município: CANGARUA

Telefone:

(48)3431-2608

E-mail: [calicia@unesc.net](mailto:calicia@unesc.net)

Continuação de Protocolo: 5.000.064

usadas para discriminar pontuações para grupos de diagnóstico. As análises serão realizadas separadamente em homens e mulheres e em casos e controles para explorar as possíveis associações específicas de sexo e fenótipo entre os marcadores e as variáveis mencionadas.

**Desfecho Primário:**

Agregar conhecimento a respeito da carga da doença COVID-19 na população da região sul do Brasil. Investigar a associação de marcadores

inflamatórios e de dano neuronal e suas relações com transtornos neuropsiquiátricos em sujeitos positivos para COVID-19.

**Desfecho Secundário:**

Os dados obtidos possibilitarão a divulgação em eventos, revistas, ou congressos científicos relacionados à área e para públicos nãoespecializados. Além de contribuir para o entendimento global da carga da doença COVID-19.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a associação de marcadores inflamatórios e de dano neuronal e suas relações com transtornos neuropsiquiátricos em sujeitos positivos para COVID-19.

**Objetivo Secundário:**

1) Analisar os níveis periféricos de CCL23 (marcador envolvido em respostas inflamatórias após lesões cerebrais), das citocinas pró-inflamatórias (IL

-6, IL-15, IL-17, fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e das anti-inflamatórias IL-10, IL-17 IL-1ra, as quais são envolvidas em ativação de células

glaiais em sujeitos positivos para COVID-19; 2) Avaliar os níveis periféricos de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e receptor de

glicocorticóide (GR), os quais estão associados a ativação do eixo hipotálamo-hipofisária-adrenal (HPA), em sujeitos positivos para COVID-19; 3)

Avaliar os níveis periféricos de caspase 8 e do fator neurotrófico-derivado do cérebro (BDNF) (associados a danos no SNC) além da concentração

enzimática da enzima acetilcolinesterase em sujeitos positivos para COVID-19; 4) Avaliar perifericamente marcadores de estresse

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitária

CEP: 88.600-000

UF: SC

Município: ORSILVIA

Telefone: (48)3431-2600

E-mail: [edfka@unesc.net](mailto:edfka@unesc.net)



Continuação do Parecer: 3.000.304

oxidativo/nitrosativo (os quais são associados com inflamação e ativação de células gliais) em sujeitos positivos para COVID-19;5) Verificar parâmetros físicos e laboratoriais indicadores de síndrome metabólica. 6) Analisar a microbiota intestinal (a qual está associada com inflamação) em sujeitos positivos para COVID-19;7) Avaliar os níveis de free DNAmT e o número de cópias de DNA mitocondrial, assim como o processo de dinâmica mitocondrial e mitofagia através da avaliação do imunocnteúdo das proteínas mitofusins 1, mitofusins 2, Opa1, Fis-1, Ddp-1, PINK1, Parkin, Bnip3, Beclin-1, P62/SQSTM1 LC3 A/B em sujeitos positivos para COVID-19;8) Investigar a ocorrência de sintomas de estresse, ansiedade, depressão, ritmo biológico e funcionalidade em sujeitos positivos para COVID-19;9) Aplicar ferramentas de bioinformática e análises estatísticas robustas para avaliar correlações entre marcadores inflamatórios e mitocondriais, assim como para integrar os marcadores periféricos com dados clínicos e neuropsicológicos relevantes. 10) Comparar o efeito de um treinamento de HIIT de moderada duração com um treinamento contínuo de moderada duração em sintomas neuropsiquiátricos e nas capacidades físicas em sujeitos positivos para COVID-19.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

Os entrevistados podem se sentir desconfortáveis com a aplicação dos questionários, os quais envolvem aspectos emocionais. Caso ocorra, os psicólogos e/ou psiquiatras da equipe avaliarão a necessidade de interrupção momentânea da entrevista e darão o suporte necessário. O indivíduo não será excluído da pesquisa, a não ser que opte por isso, e poderá dar continuidade num segundo momento. Além disso, as entrevistas serão realizadas em local reservado e confortável. Há também o risco da perda da confidencialidade dos dados e este risco será amenizado pelo comprometimento dos pesquisadores em manter a privacidade dos dados pessoais do participante da pesquisa. Também pode haver um pequeno desconforto na coleta de fezes, que será amenizado pelo fornecimento de um kit para proporcionar maior conforto durante a coleta. Também pode

**Endereço:** Avenida Universitária, 1.925

**Bairro:** Universitário

**UF:** SC

**Telefone:** (47)3431-2638

**CEP:** 88.900-000

**Município:** (RICA) JARÁ

**E-mail:** [etica@unesc.net](mailto:etica@unesc.net)

Continuação do Parecer: 5.008.004

haver desconforto na coleta de sangue e pequeno hematoma local, ambos transitórios. O risco de infecção é mínimo e serão minimizados com a

coleta sendo realizada por um enfermeiro ou biomédico responsável e habilitado para coletas de sangue além da aplicação do protocolo de

segurança preconizado pela OMS. Durante a execução do programa de exercícios, será respeitado carga, velocidade e a amplitude de movimento, de acordo com a individualidade

biológica de cada indivíduo com a supervisão de dois profissionais de educação física. Cabe destacar que em casos raros podem surgir pequenos

efeitos colaterais como dor muscular e câimbras, que serão tratados com a interrupção momentânea do

exercício. É importante deixar claro que

estes efeitos colaterais geralmente são totalmente revertidos com repouso, não necessitando de nenhum tratamento complementar. No entanto, em

casos extremos que possam vir a ocorrer, o voluntário será encaminhado para as clínicas integradas da Unesc para atendimento interdisciplinar

especializado com profissionais das áreas da medicina, fisioterapia e enfermagem.

#### Benefícios:

Os indivíduos participantes da pesquisa serão voluntários e não terão qualquer ganho financeiro ou de atendimento do profissional da área da

saúde. No entanto, serão ressarcidos os custos com transporte dos indivíduos para participação neste projeto. A pesquisa de dados gerais e das

bases biológicas servirá de subsídio para o entendimento do comportamento da nova doença COVID-19 na população da região sul do Brasil. Nos

casos que forem identificados sintomas depressivos e ansiosos importantes, os indivíduos serão encaminhados para atendimento especializado em

unidades de saúde. A participação na pesquisa trará a possibilidade de busca de soluções para o tratamento e entendimento do curso da COVID19. É esperado benefícios mentais associados a prática de

exercício físico, já que a mesma pode aumentar a liberação de neurotransmissores como a dopamina, serotonina e noradrenalina. Além disso, libera a tensão dos músculos reduzindo a dor, reduz o

cortisol, diminui ansiedade, aumenta a

autoestima promovendo uma melhor qualidade de vida. Todavia, esperamos que durante a pesquisa os voluntários se conscientizem da importância

da prática de atividade física, e adotem um estilo de vida mais ativo após a conclusão da pesquisa

Endereço: Avenida Universitária, 1.100

Bairro: Universitario

CEP: 88.904-000

UF: SC

Município: CASCADIA

Telefone: (48)3031-3000

E-mail: [etica@unesc.net](mailto:etica@unesc.net)

Continuação do Parecer: 5.006.994

(programa de exercícios).

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Sétima versão apresentada. Inclusão de amostra. Pesquisa relevante, pela temática abordada: consequências da Covid-19 sobre as condições de saúde de pessoas infectadas, após a cura da doença, pesquisa quantitativa, longitudinal, de coorte, que pretende avaliar, na versão apresentada, o efeito de um treinamento de HIIT de moderada duração com um treinamento contínuo de moderada duração em sintomas neuropsiquiátricos e nas capacidades físicas em sujeitos positivos para COVID-19. A amostra será constituída por 120 praticantes, por indivíduos adultos entre 18 e 90 anos residentes na região sul do Brasil, que tiveram Covid-19, comprovados por teste, que tenham ou não manifestado os sintomas para a doença e que tenham sido diagnosticados com depressão pela escala de Hamilton. Ressalta-se que a amostra proposta é uma coorte da amostra participante das versões anteriores deste projeto. Metodologia: os indivíduos serão distribuídos, de forma randomizada, entre três grupos (n=40 para cada grupo), sendo que dois deles serão submetidos a exercícios físicos aquáticos e um grupo não realizará exercício físico (grupo controle). Os grupos que farão exercícios físicos aquáticos utilizarão modalidades distintas: um grupo fará protocolo de HIIT de moderada duração (30 minutos) e outro grupo fará exercício contínuo de moderada duração (60 minutos). Todas as intervenções serão realizadas nas dependências da universidade proponente da pesquisa.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

A partir desse momento o CEP passa a ser corresponsável, em termos éticos, do seu projeto de pesquisa – vide artigo X.3.9. da Resolução 466 de 12/12/2012.

Fique atento(a) para as suas obrigações junto a este CEP ao longo da realização da sua pesquisa. Tenha em mente a Resolução CNS 466 de 12/12/2012, a Norma Operacional CNS 001/2013 e o Capítulo III da Resolução CNS 251/1997.

Lembre-se que:

Endereço:	Avenida Universitária, 1.105	
Bairro:	Universitário	CEP: 88.200-000
UF:	SC	Município: Criciúma
Teléfono:	(48)3431-3000	E-mail: cetic@unesc.net

Continuação de Parecer: 5.000.064

1. No prazo máximo de 6 meses, a contar da emissão deste parecer consubstanciado, deverá ser enviado um relatório parcial a este CEP (via NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil) referindo em que fase do projeto a pesquisa se encontra. Um novo relatório parcial deverá ser enviado a cada 6 meses, até que seja enviado o relatório final.
2. Qualquer alteração que ocorra no decorrer da execução do seu projeto e que não tenha sido prevista deve ser imediatamente comunicada ao CEP por meio de EMENDA, na Plataforma Brasil. O não cumprimento desta determinação acarretará na suspensão ética do seu projeto.
3. Ao final da pesquisa deverá ser encaminhado o relatório final por meio de NOTIFICAÇÃO, na Plataforma Brasil. Deverá ser anexado comprovação de publicação dos resultados.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

#### Considerações Finais e critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1999629_ES.pdf	26/07/2022 19:08:36		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_COVID_emenda_4.docx	26/07/2022 15:00:45	Gelaine Zili Réus	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_COVID_emenda_3_ok.docx	21/09/2021 18:59:14	Gelaine Zili Réus	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_4_emenda_3_ok.docx	21/09/2021 18:51:47	Gelaine Zili Réus	Aceito
Outros	Carta_Pendencias_CEP_emenda_3.pdf	21/09/2021 18:47:07	Gelaine Zili Réus	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_4_emenda_2.docx	18/03/2021 14:51:49	Gelaine Zili Réus	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta_de_aceite_HSD.pdf	18/02/2021 18:22:50	Gelaine Zili Réus	Aceito

Endereço: Avenida Universitária, 1.105

Bairro: Universitário

CEP: 88.600-000

UF: SC

Município: ORIZAMA

Telefone: (48)3431-2600

E-mail: cep@unesc.net

UNIVERSIDADE DO EXTREMO  
SUL CATARINENSE - UNESC



Continuação do Parecer: 5.000.984

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_4_emenda.pdf	18/02/2021 16:17:17	Gislaine Zilli Réus	Aceito
TCLÉ / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_COVID_ok.docx	01/10/2020 16:07:36	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_3.pdf	01/10/2020 16:05:47	Gislaine Zilli Réus	Aceito
TCLÉ / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tcle_COVID.pdf	01/10/2020 16:00:44	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Outros	Declaracao_Biorepositorio.pdf	30/09/2020 18:13:03	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo_4.pdf	30/09/2020 18:09:42	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Outros	Carta_Pendencias_CEP.pdf	30/09/2020 18:01:34	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_aceto_UFFS.pdf	22/07/2020 16:41:37	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_aceto_UNESC.pdf	22/07/2020 16:41:29	Gislaine Zilli Réus	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_2.pdf	22/07/2020 14:59:22	Gislaine Zilli Réus	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação de CONEP:**

Não

CRICIUMA, 26 de Agosto de 2022

Assinado por:  
Marco Antônio da Silva  
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Universitária, 1.000  
Bairro: Universitário CEP: 88.806-000  
UF: SC Município: CRICIUMA E-mail: unesc@unesc.net  
Telefone: (48)3431.2500