



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS**

**PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA DE PACIENTES COM COVID-19**

**NEREU SERAFIM MACHADO**

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná  
2023



**INSTITUTO LATINO-AMERICANO DE  
CIÊNCIAS DA VIDA E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOCIÊNCIAS**

**PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA DE PACIENTES COM COVID-19**

**NEREU SERAFIM MACHADO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino- Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini

Coorientador(a): Profa. Dra. Júlia Ronzella Ottoni

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná  
2023

**NEREU SERAFIM MACHADO**

**PERFIL DA MICROBIOTA INTESTINAL HUMANA DE PACIENTES COM COVID-19**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, do Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Michel Rodrigo Zambrano Passarini  
Orientador  
UNILA

---

Dra. Maria Leandra Terencio  
Examinadora  
UNILA

---

Dr. Alysson Wagner Fernandes Duarte  
Examinador  
UFAL

Foz do Iguaçu, Estado do Paraná, 15 de dezembro de 2023.

Catálogo elaborado pelo Setor de Tratamento da Informação  
Catálogo de Publicação na Fonte. UNILA - BIBLIOTECA LATINO-AMERICANA - PTI

M149

Machado, Nereu Serafim.

Perfil da microbiota intestinal humana de pacientes com COVID-19 / Nereu Serafim Machado. - Foz do Iguaçu, 2023.

65 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Instituto Latino-Americano de Ciências da Vida e da Natureza, Programa de Pós-Graduação em Biociências. Foz do Iguaçu – PR, 2024.

Orientador: Prof. Dr. Michel Rodrigo Zambrano.

Coorientadora: Profª. Dra. Júlia Ronzella Ottoni.

1. Coronavírus. 2. Enterobactérias. 3. Metabarcoding. 4. Comunidade microbiana intestinal. I. Zambrano, Michel Rodrigo. II. Ottoni, Júlia Ronzella. III. Título.

CDU 612.336:616.9

MACHADO, Nereu Serafim. 2023. **Perfil da microbiota intestinal humana de pacientes com Covid-19**. Orientadores: PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano (orientador); OTTONI, Júlia Ronzella (coorientador). 65 f. Dissertação (Mestrado) - PPG-BC (Programa de Pós-Graduação em Biociências), UNILA (Universidade Federal da Integração Latino-Americana), Foz do Iguaçu.

## RESUMO

O vírus Sars-CoV-2, causador da doença Covid-19, foi responsável por uma pandemia que assombrando o mundo, desde o final do ano de 2019. Essa doença se disseminou rapidamente resultando em graves efeitos sobre a saúde pública e, conseqüentemente, sobre os aspectos socioeconômicos em escala global. Estudos vêm sendo desenvolvidos a fim de maior compreensão da doença, pela necessidade urgente de estratégias e terapias que visem frear o rápido avanço e gravidade da doença. A microbiota humana tem papel fundamental no funcionamento do organismo, influenciando desde a digestão de alimentos até a imunomodulação do sistema imune. O RNA viral do coronavírus já foi encontrado na microbiota intestinal de pacientes infectados e, estudos já demonstraram uma correlação entre a gravidade da infecção por SARS-CoV-2 e a diversidade dessa microbiota natural, o que enfatiza a necessidade de mais estudos para sua compreensão. Assim, o entendimento das relações entre as comunidades microbianas pertencentes no intestino de pacientes acometidos com o Covid-19 poderá elucidar possíveis ferramentas que irão proporcionar mais informações a respeito dessa doença que acometeu a população mundial. Neste sentido, o presente projeto avaliou os efeitos da Covid-19 nas comunidades microbianas de pacientes de diferentes idades com e sem sintomas da doença, bem como suas interações com o hospedeiro humano, utilizando a abordagem *Metabarcoding*. Para realizar a análise do processamento dos dados, foram utilizadas ferramentas tanto do *pipeline Qiime2* e *Galaxy Europe*. Após análise de *Metabarcoding* de cada uma das 3 amostras de fezes coletadas dos 6 pacientes (total de amostras n=18), obteve-se um total de 534.769 sequências listadas em arquivo de metadados. Através dos dados coletados, observamos que a doença da Covid-19 afetou significativamente a diversidade alfa, os pacientes controle que não entraram em contato com o vírus de SARS-CoV-2 (CT1; CT2) obtiveram valores relativos de diversidade microbiana mais elevados quando comparados aos outros indivíduos que contraíram a doença. Além disso, pode-se evidenciar a complexidade para encontrar correlação das Aqueias com doenças, especialmente aquelas causadas por vírus. Este estudo apresenta uma diferença notável da presença de arqueias nos diferentes pacientes, enfatizando sua correlação com aspectos da doença que devem ser investigados mais a fundo. A análise das principais vias metabólicas (*Kegg function*, *Ec function* e *MetaCyc function*) demonstrou uma produção mais atenuada da L-isoleucina (PWY-5103) pelo paciente com sintomas graves da Covid-19 (GV2) em relação aos demais pacientes analisados. Já as vias *Glutaryl-CoA degradation* (PWY-3001) e *D-galacturonate degradation I* (GALACTUROCAT-PWY), responsáveis pela síntese do butirato, demonstraram valores baixos nas amostras do paciente com Covid-19 grave. Outros fatores predominantemente diminuídos nas amostras do paciente grave foram as vias relacionadas a *PWY-1269 CMP-3-deoxy-D-mannooctulosonate biosynthesis I* e *PWY-7220 adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II*, vias cuja subclasse corresponde a biossíntese de nucleotídeos. Evidências da diminuição das vias de produção de ácidos graxos de cadeia curta associada a Covid-19 em pacientes graves, além da diminuição dos níveis de butirato fecal e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL10 e quimiocina CXCL-10, destacam a importância dessas vias metabólicas na patogênese da Covid-19. O presente estudo destaca a importância da análise das vias funcionais dentro da diversidade do microbioma intestinal, enfatizando sua importância na compreensão do curso da Covid-19. O estudo das perturbações nas funções microbianas intestinais abre caminho para entender o papel do microbioma intestinal na progressão da doença no Covid-19.

**Palavras-chaves:** coronavírus; enterobactérias, *metabarcoding*; comunidade microbiana intestinal.

MACHADO, Nereu Serafim. 2023. *Profile of the human intestinal microbiota of patients with Covid-19*. Advisors: PASSARINI, Michel Rodrigo Zambrano (advisor); OTTONI, Júlia Ronzella (co-advisor). 65 s. Master's thesis (Master's degree) - PPG-BC (Graduate Program in Biosciences), UNILA (Federal University of Latin American Integration), Foz do Iguaçu.

### **ABSTRACT**

*The SARS-CoV-2, which causes the disease Covid-19, was responsible for a pandemic that has haunted the world since the end of 2019. This disease spread quickly resulting in serious effects on public health and, consequently, on socioeconomic aspects on a global scale. Studies have been developed to better understand the disease, due to the urgent need for strategies and therapies that aim to stop the rapid progression and severity of the disease. The human microbiota plays a fundamental role in the functioning of the organism, influencing everything from food digestion to the immunomodulation of the immune system. The viral RNA of the coronavirus has already been found in the intestinal microbiota of infected patients, and studies have already demonstrated a correlation between the severity of SARS-CoV-2 infection and the diversity of this natural microbiota, which emphasizes the need for more studies to understand it. Thus, understanding the relationships between the microbial communities belonging to the intestine of patients affected by Covid-19 may elucidate possible tools that will provide more information about this disease that has affected the world population. In this sense, the present project evaluated the effects of Covid-19 on the microbial communities of patients of different ages with and without symptoms of the disease, as well as their interactions with the human host, using the Metabarcoding approach. To perform the data processing analysis, tools from both the Qiime2 and Galaxy Europe pipeline were used. After Metabarcoding analysis of each of the 3 stool samples collected from the 6 patients (total samples n=18), a total of 534,769 sequences were obtained listed in the metadata file. Through the data collected, we observed that the Covid-19 disease significantly affected alpha diversity, control patients who did not come into contact with the SARS-CoV-2 virus (CT1; CT2) obtained higher relative values of microbial diversity when compared to other individuals who contracted the disease. Furthermore, the complexity of finding a correlation between Archaea and diseases, especially those caused by viruses, can be highlighted. This study presents a notable difference in the presence of archaea in different patients, emphasizing its correlation with aspects of the disease that should be investigated further. The analysis of the main metabolic pathways (Kegg function, Ec function and MetaCyc function) demonstrated a more attenuated production of L-isoleucine (PWY-5103) by the patient with severe symptoms of Covid-19 (GV2) in relation to the other patients analyzed. The Glutaryl-CoA degradation (PWY-3001) and D-galacturonate degradation I (GALACTUROCAT-PWY) pathways, responsible for the synthesis of butyrate, demonstrated low values in samples from patients with severe Covid-19. Other factors predominantly decreased in the critically ill patient's samples were the pathways related to PWY-1269 CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate biosynthesis I and PWY-7220 adenosine deoxyribonucleotides biosynthesis II, pathways whose subclass corresponds to sugar nucleotide biosynthesis. Evidence of decreased short-chain fatty acid production pathways associated with Covid-19 in critically ill patients, in addition to decreased fecal butyrate levels and increased levels of pro-inflammatory cytokines IL10 and chemokine CXCL-10, highlight the importance of these pathways metabolic processes in the pathogenesis of Covid-19. The present study highlights the importance of analyzing functional pathways within the diversity of the intestinal microbiome, emphasizing its importance in understanding the course of Covid-19. Studying perturbations in gut microbial functions paves the way to understanding the role of the gut microbiome in disease progression in Covid-19.*

**Keywords:** coronavirus; enterobacteria, metabarcoding; gut microbiota.

## LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1	Organização genética e estrutural do SARS-CoV-2	11
Figura 2	Casos de Covid-19 relatados por região pela OMS e mortes globais em intervalos de 28 dias	14
Figura 3	Casos por região das Américas, segundo a OMS	15
Figura 4	Casos novos por semana epidemiológica de notificação em todo o Brasil	16
Figura 5	Casos novos por semana epidemiológica de notificação em Foz do Iguaçu – Paraná	16
Figura 6	Número de doses da vacina Covid-19 administradas em todo o mundo até 20 de março de 2023, por país	17
Figura 7	Esquematização básica da capacidade do DNA <i>Metabarcoding</i> de identificar um número maior de espécies	21
Tabela 1	Detalhamento das características dos pacientes e coleta de amostra de fezes	29
Figura 8	Média do total de microrganismos encontrados em cada Paciente	30
Figura 9	Diferenças de domínios encontrados na microbiota dos pacientes	31
Figura 10	Diversidade dos Pacientes com sintomas graves de Covid-19, GV1 e GV2, demonstrando diferentes domínios (Bactéria e Arqueias)	32
Figura 11	Análise de Rarefação da Diversidade Alfa	34
Figura 12	Índice de Simpson da Diversidade Alfa	36
Figura 13	Índice de Chao1 e Shannon da Diversidade Alfa	37
Figura 14	Dendrograma de <i>cluster</i>	39
Figura 15	Percentual dos Filos encontrados nas amostras	40
Figura 16	Abundancia de gêneros encontrados nas amostras	42
Figura 17	Vias microbianas correlacionadas com a gravidade da Covid-19	45
Figura 18	Clusterização dos dados obtidos com a atividade funcional	48

## LISTA DE ABREVIACÕES

ACE2	Enzima conversora da angiotensina 2
CDC	Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CT	Controle
DNA	cido desoxirribonucleico
EUA	Estados Unidos
GI	Trato gastrointestinal
GV	Grave
H1N1	Influenzavirus
H2	Hidrognio
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
LV	Leve
OMS	Organização Mundial da Saúde
OTU	<i>Operational Taxonomic Unit</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RAAS	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
RNA	cido ribonucleico
SSRNA	<i>Single-stranded RNA</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>9</b>
<b>1.1. Referencial teórico</b>	<b>10</b>
1.1.1. Sars-CoV-2 e mecanismo de patogenicidade	10
1.1.2. Situação da pandemia	12
1.1.3. Cuidados e prevenção	16
1.1.4. Microbiota intestinal humana e a Covid-19	18
1.1.5. A ferramenta DNA <i>Metabarcoding</i> na investigação da Covid-19	20
<b>1.2. Justificativa</b>	<b>21</b>
<b>1.3. Pergunta norteadora e hipótese</b>	<b>22</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>2.1. Geral</b>	<b>22</b>
<b>2.2. Específicos</b>	<b>22</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>24</b>
<b>3.1. Coleta das amostras de fezes dos pacientes com Covid-19</b>	<b>24</b>
<b>3.2. Quantificação da presença do vírus nas amostras de fezes</b>	<b>24</b>
3.2.1. Pré-tratamento da amostra	24
3.2.2. Extração do DNA e RNA viral	24
3.2.3. Amplificação de RNA do SARS-CoV-2	25
<b>3.3. Análise <i>Metabarcoding</i></b>	<b>26</b>
3.3.1. Extração do DNA genômico da comunidade microbiana	26
3.3.2. Qualidade das amostras e amplificação do gene 16S	26
3.3.3. Reação de indexação	27
3.3.4. Purificação e quantificação da biblioteca	27
3.3.5. Análises de bioinformática	28
3.3.6. Análise da microbiota funcional	28
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>29</b>
<b>4.1. Amostras coletadas</b>	<b>29</b>
<b>4.2. Perfil da comunidade microbiana associada a fezes de pacientes com Covid-19</b>	<b>29</b>
<b>4.3. Perfil funcional da comunidade microbiana associada aos pacientes com Covid-19</b>	<b>44</b>
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO</b>	<b>50</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, uma nova doença assombrou milhões de pessoas ao redor do mundo, a qual desestabilizou o mundo moderno, afetando a economia de diversos países bem como diretamente as pessoas, com relação à fatores psicológicos, devido ao confinamento social imposto pelos órgãos de saúde pública (LIMA, 2020). A Covid-19, uma doença de proporções pandêmicas, causada por um novo betacoronavírus SARS-Cov-2 (SARS “*Severe Acute Respiratory Syndrome*” - Síndrome Respiratória Aguda Grave), fez o mundo estremecer com os elevados casos de óbito (WANG et al, 2020). Dados apontam seu surgimento na cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, no final de 2019, entretanto, veio a se espalhar para muitos países de todo o globo (DHAR & MOHANTY, 2020). Cerca de 96.000 casos de doença Covid-19 e 3.300 óbitos foram relatados até o dia 05 de março de 2020 (início dos casos no Brasil) e muitos dos casos iniciais ocorreram em pessoas que tiveram exposição no mercado atacadista de frutos do mar de Huanan (Hubei, na China), o qual também comercializava animais silvestres vivos (SINGHAL, 2020).

A comunidade microbiana associada ao intestino é responsável pela saúde deste órgão devido a suas ações protetoras e metabólicas. Enquanto os microrganismos obtêm habitat e alimento do hospedeiro, os mesmos microrganismos ajudam o hospedeiro regulando funções biológicas, entre elas a digestão dietética, bem como conferem imunidade contra patógenos invasores (DHAR & MOHANTY, 2020).

Estudos já mostraram que um dos mecanismos de entrada proposto do vírus está relacionado a sua capacidade de se ligar ao receptor de enzima conversora de angiotensina (ACE2), um receptor de membrana extracelular que é expresso em células epiteliais. Em áreas do trato gastrointestinal (GI) com grande expressão de ACE2, como estômago, duodeno e reto, foi encontrada a proteína do capsídeo viral, cuja presença foi notavelmente mais baixa em áreas desprovidas de receptores como o esôfago (ZHANG et al, 2020). Assim, apontando a possibilidade de o SARS-Cov2 ter um impacto na microbiota intestinal proporcionando uma mudança na composição da microbiota intestinal em pacientes com infecções respiratórias oriundas da Covid-19(DHAR & MOHANTY, 2020).

A perda da diversidade bacteriana do intestino pode causar a disbiose intestinal (desequilíbrio da comunidade bacteriana intestinal, reduzindo a capacidade de absorção dos nutrientes e a causa da carência de vitaminas), podendo estar associada a muitas outras doenças (MOSCA et al, 2016). Como idosos apresentam a comunidade microbiana intestinal menos diversa

em relação a pacientes mais jovens, podem estar ausentes, microrganismos benéficos como linhagens do gênero *Bifidobacterium* (NAGPAL *et al*, 2018).

Estudos utilizando a abordagem *Metabarcoding* podem ser empregados na tentativa de elucidar a causa e/ou a prevenção de algumas doenças que acometem os seres humanos. Entretanto, a pesquisa sobre a relação entre as mudanças na microbiota intestinal e as doenças humanas é um campo em crescimento. Estudos que utilizam a abordagem de sequenciamento de última geração, como a ferramenta *Metabarcoding*, para explorar a diversidade bem como inferir o perfil metabólico da comunidade microbiana associada ao intestino de pacientes acometidos com a Covid-19, ainda são escassos.

Desta forma, essa abordagem molecular poderá auxiliar na caracterização dos mecanismos de interação do vírus com a microbiota intestinal humana de pacientes com diferentes idades bem como no fornecimento de informações que respaldem o tratamento e/ou prevenção da doença.

## **1.1. Referencial teórico**

### ***1.1.1. Sars-CoV-2 e mecanismo de patogenicidade***

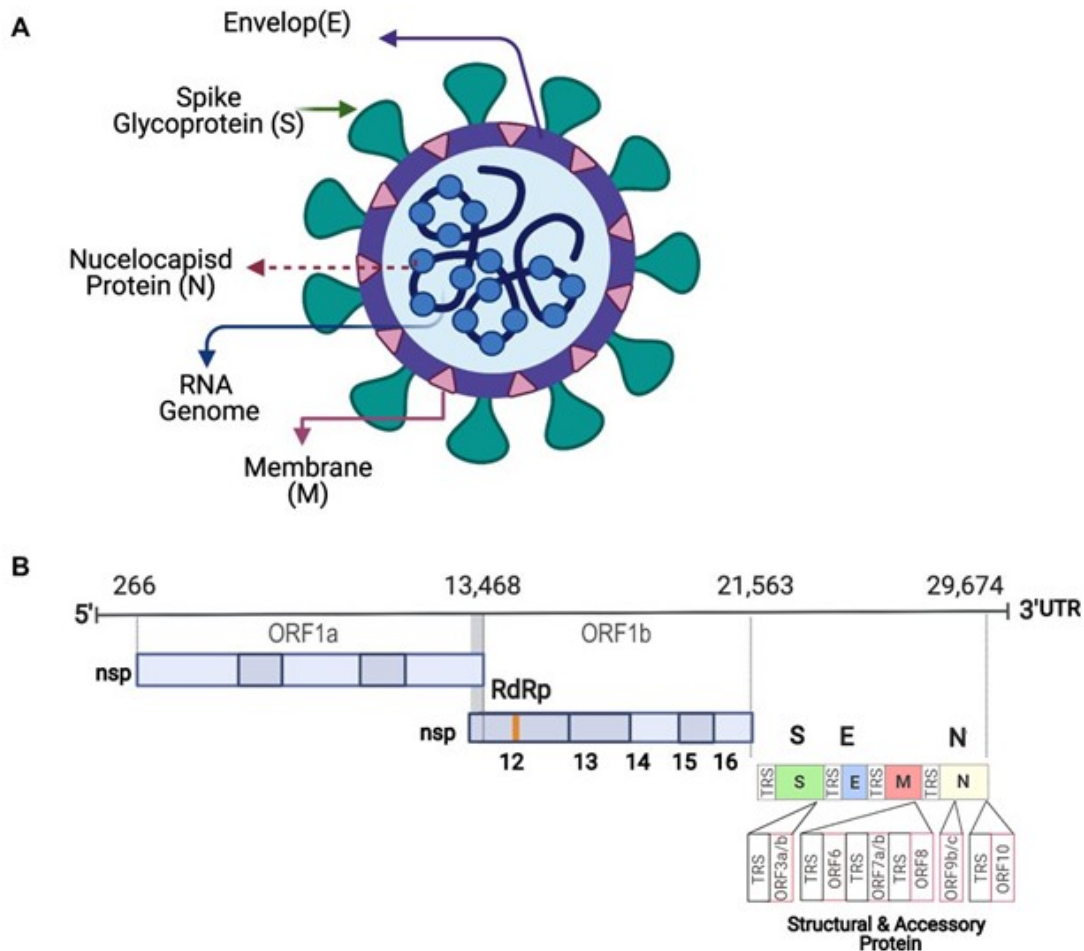
Em dezembro de 2019 surgiram relatos de alguns casos de pneumonia de causa desconhecida na cidade de Wuhan na China (MEHTA *et al*, 2020). Em janeiro de 2020, o agente etiológico foi isolado e descrito pelo governo chinês como um novo coronavírus (SARS-CoV-2 ou 2019-nCoV) (LI *et al*, 2020). O SARS-CoV2 é um dos sete coronavírus de infecção humana identificados até agora. É um SSRNA, single-stranded RNA (RNA de fita simples) de vírus de RNA sentido positivo de fita simples pertencente à linhagem B1-3 de  $\beta$ -coronavírus (OLIVEIRA *et al*, 2020).

Por ser altamente transmissível, essa nova doença, também conhecida como doença coronavírus 2019 (Covid-19), se espalhou rapidamente por todo o mundo representando uma ameaça extraordinária à saúde pública global (HU *et al*, 2021). Foi declarada uma pandemia pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020, com muitos países adotando medidas de saúde pública sem precedentes para conter sua propagação (WHO, 2020; WU *et al*, 2020).

O genoma do SARS-CoV-2 codifica uma poliproteína (ORF1ab) envolvida na transcrição e replicação do RNA viral e quatro proteínas estruturais: E para envelope; M para membrana; N para o nucleocapsídeo, necessário para a síntese viral; e a proteína S para Spike, que permite a entrada e

a infecção da célula hospedeira (Figura 1), além de cinco proteínas acessórias (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF8 e ORF10) (AMICO *et al*, 2020; OKBA *et al*, 2020; WANG *et al*, 2020).

**Figura 1.** Organização genética e estrutural do SARS-CoV-2



**Fonte:** Modificado de ALSOBAIE, 2021.

**Nota explicativa:** O SARS-CoV-2 formado por quatro proteínas estruturais (S, E, M e N) (A) e seis proteínas acessórias (ORF3a, ORF6, ORF7a, ORF7b, ORF8 e ORF10) (B).

A proteína S viral se liga ao receptor ACE2 humano, causando alterações conformacionais no coronavírus e permitindo sua fusão com a membrana da célula hospedeira. O processo de entrada na célula requer a ação da protease TMPRSS2, que regula a clivagem da proteína S6 (VAIRA *et al*, 2020).

A patogênese da infecção por SARS-CoV-2 em humanos apresenta desde sintomas leves até insuficiência respiratória grave. Ao ligar-se às células epiteliais no trato respiratório, o SARS-CoV-2 começa a se replicar e migrar para as vias aéreas e entra nas células epiteliais alveolares nos pulmões (HUANG *et al*, 2020). A rápida replicação do SARS-CoV-2 nos pulmões pode

desencadear uma forte resposta imunológica. A síndrome da tempestade de citocinas causa síndrome do desconforto respiratório agudo e insuficiência respiratória, que é considerada a principal causa de morte em pacientes com Covid-19 (MEHTA *et al*, 2020). Pacientes com idade avançada e doenças pré-existentes graves têm maior risco de desenvolver síndrome da angústia respiratória aguda e morte (CHEN *et al*, 2020).

A apresentação clínica da doença Covid-19 compreende uma ampla variação de sintomas, como febre, tosse seca, dispneia, cefaleia, diarreia e dor abdominal (AMICO *et al.*, 2020; ROTHAN & BYRAREDDY, 2020). A perda do olfato e paladar não foram tão descritas na China, mas foram relatadas em outros estudos como um marcador clínico inicial da Covid-19 em outros países como China e Reino Unido (BRANN *et al*, 2020; MOEIN *et al*, 2020).

Os pacientes com Covid-19 podem ser classificados como assintomáticos ou sintomáticos, e os sintomas podem variar de leves a graves e críticos (AHN *et al*, 2020). A síndrome respiratória aguda grave (SARS) é mais comum entre pessoas com fatores de risco, como idade avançada, tabagismo e aquelas com comorbidades associadas (diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, obesidade, doença pulmonar crônica, doenças renais) (ROTHAN & BYRAREDDY, 2020; OLIVEIRA *et*, 2020). A taxa de mortalidade em pacientes adultos hospitalizados pode variar de 4 a 11% sendo, a taxa geral de letalidade, estimada entre 2 e 3% (OMS, 2023).

### ***1.1.2. Situação da Pandemia***

O que começou como uma doença emergente semelhante à pneumonia em Wuhan, China, em dezembro de 2019, foi declarada como uma pandemia global pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 11 de março de 2020 (WHO, 2020). O Centro Chinês para Controle e Prevenção de Doenças (CDC) descartou os coronavírus relacionados, como influenza, influenza aviária, adenovírus, coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-1) e coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) como possíveis causas para a síndrome respiratória, mas acabou declarando-o como um novo coronavírus, dando-lhe o nome de Covid-19 (SANYAOLU *et al*, 2021).

Desde a primeira admissão de paciente relatada em 12 de dezembro de 2019, e a primeira morte de um cidadão chinês no início de janeiro de 2020, casos relacionados a viagens começaram a surgir na Tailândia, Japão, Coreia do Sul, França e Estados Unidos da América (EUA) em meados de janeiro. No final de janeiro, o novo coronavírus havia se espalhado pelo Pacífico Ocidental,

Sudeste Asiático, EUA, Canadá, Europa e países do Mediterrâneo Oriental (JABARIS & ANANTHALAKSHMI, 2021).

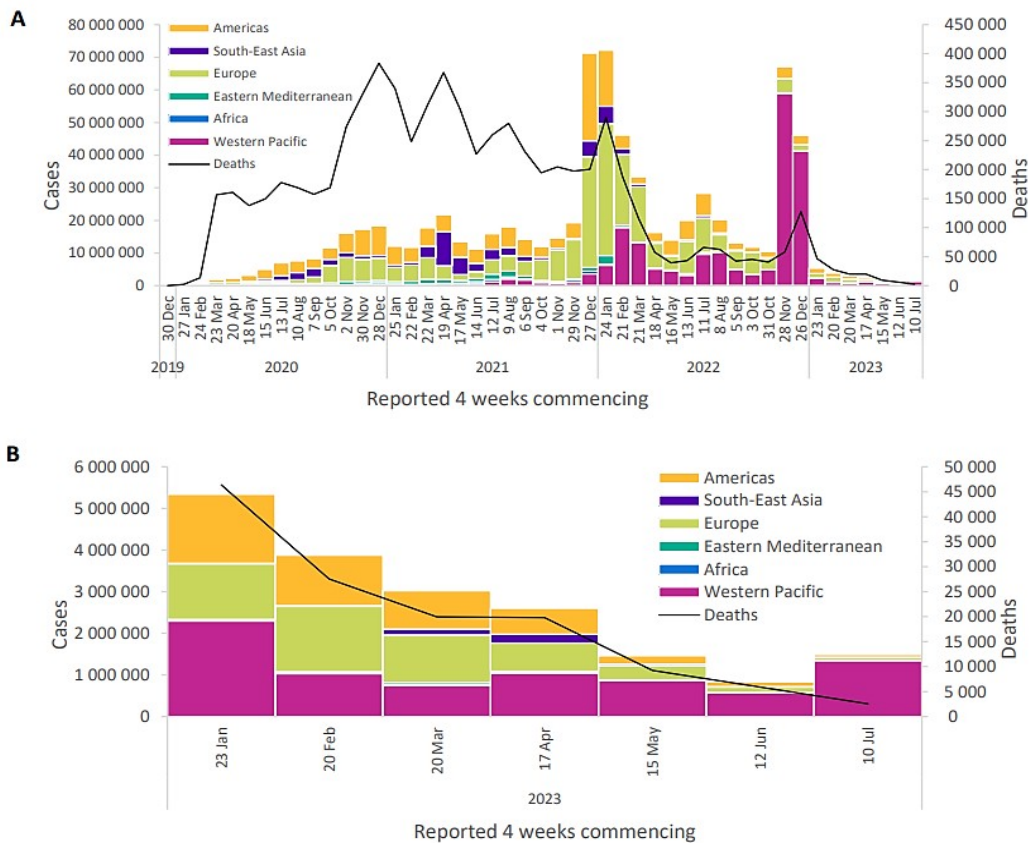
Essa disseminação constituiu uma Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional. Em 9 de junho de 2020, haviam 70.39918 casos confirmados com 404.396 mortes e 3.596.972 espalhados globalmente (SANYAOLU *et al*, 2021). Segundo dados da OMS, até o dia 29 de julho de 2021 foram confirmados 195.886.929 casos de Covid-19 em todo o mundo, incluindo 4.189.148 mortes relatadas (WHO, 2021).

Segundo a OMS (2023), globalmente, foram notificados quase 1,5 milhões de novos casos de Covid-19 e mais de 2.500 mortes nos últimos 28 dias (entre 10 de julho a 6 de agosto de 2023), um aumento de 80% e uma diminuição de 57%, respectivamente, em comparação com os 28 dias anteriores (Figura 2). Embora cinco regiões da OMS tenham relatado diminuições no número de casos e de mortes, a região do Pacífico Ocidental relatou um aumento nos casos e uma diminuição nas mortes. Até 6 de agosto de 2023, foram notificados mais de 769 milhões de casos confirmados e mais de 6,9 milhões de mortes em todo o mundo.

Embora a emergência de saúde pública de preocupação internacional devido à Covid-19 tenha sido declarada encerrada em 5 de maio de 2023, a Covid-19 continua a ser uma grande ameaça. A OMS continua a apelar aos Estados-Membros para que mantenham, e não desmantelem, as suas infraestruturas estabelecidas para a Covid-19. É crucial manter o alerta precoce, a vigilância e a notificação, o rastreio de variantes, a prestação precoce de cuidados clínicos, a administração de reforços de vacinas a grupos de alto risco, melhorias na ventilação e comunicação regular (WHO, 2023).

Em 9 de agosto de 2023, o Diretor-Geral da Organização Mundial da Saúde (OMS) emitiu recomendações permanentes para a Covid-19, de acordo com o Regulamento Sanitário Internacional (2005), para orientar os países na gestão a longo prazo da Covid-19. Estas recomendações permanentes estão em vigor para todos os Estados Partes de 9 de agosto de 2023 a 30 de abril de 2025. Atualmente, os casos notificados não representam com precisão as taxas de infecção devido à redução nos testes e notificações a nível mundial (WHO, 2023).

**Figura 2.** Casos de Covid-19 relatados por região pela OMS e mortes globais em intervalos de 28 dias



Fonte: World Health Organization (2023).

Legenda: A) em 6 de agosto de 2023; B) 23 de janeiro a 6 de agosto de 2023.

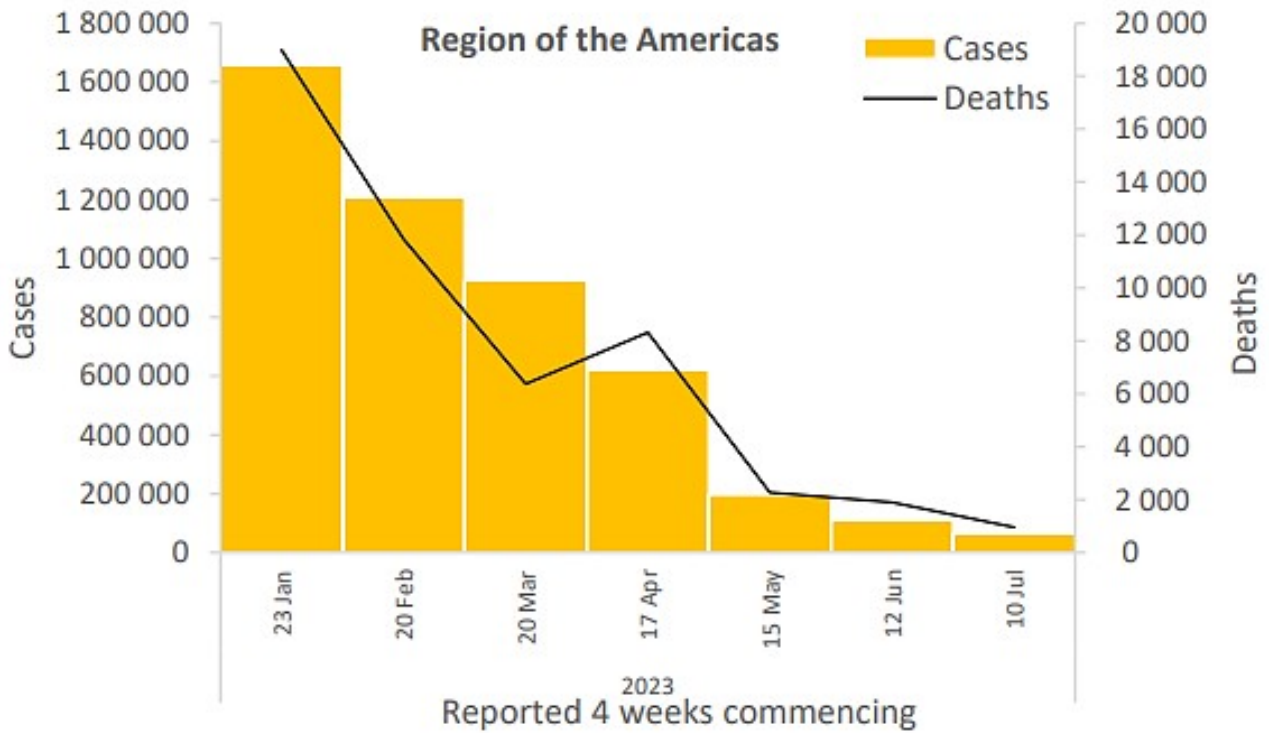
A Região das Américas notificou mais de 63.000 novos casos (Figura 3). Três dos 56 países para os quais há dados disponíveis relataram aumentos de novos casos de 20% ou mais, com os maiores aumentos proporcionais observados em Honduras, na República Dominicana e Jamaica. Os maiores números de novos casos foram notificados no Brasil (34.402 novos casos), Guatemala (6.487 novos casos) e Canadá (4.173 novos casos). O número de novas mortes em 28 dias na Região diminuiu 50% em comparação com o período anterior de 28 dias, com 954 novas mortes notificadas. Os maiores números de novas mortes foram relatados no Brasil (500), Peru (161 novas mortes) e Colômbia (100 novas mortes) (WHO, 2023).

Segundo dados do Ministério da Saúde (2023), o Brasil possui até o momento (15 de novembro de 2023) um total de 38.022.277 casos acumulados de Covid-19, sendo reportado 707.286 de mortes (BRASIL, 2023). Através do painel interativo disponibilizado pelo Ministério da Saúde, pode se ter acesso aos dados em tempo real onde é possível avaliar os novos casos semanalmente (Figura 4).

Ao que diz respeito a região Sul do Brasil, o Paraná representa 2.976.398 casos acumulados, dos quais 4.536 casos novos de Covid-19 foram relatados nas últimas semanas (44<sup>o</sup> e 45<sup>o</sup> semana do ano de 2023), e 35 óbitos foram registrados. Já a cidade de Foz do Iguaçu (Figura 5), que possui

85.386 casos acumulados e 1342 mortes por Covid-19, foram reportados nas últimas semanas 65 casos novos de Covid-19 (BRASIL, 2023).

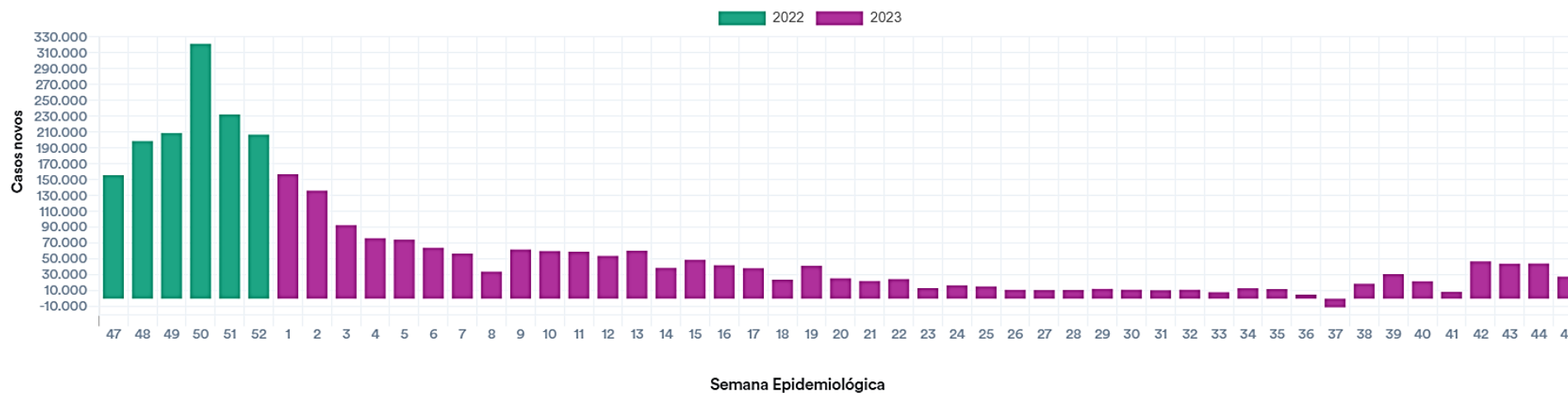
**Figura 3.** Casos por região das Américas, segundo a OMS



**Fonte:** World Health Organization (2023).

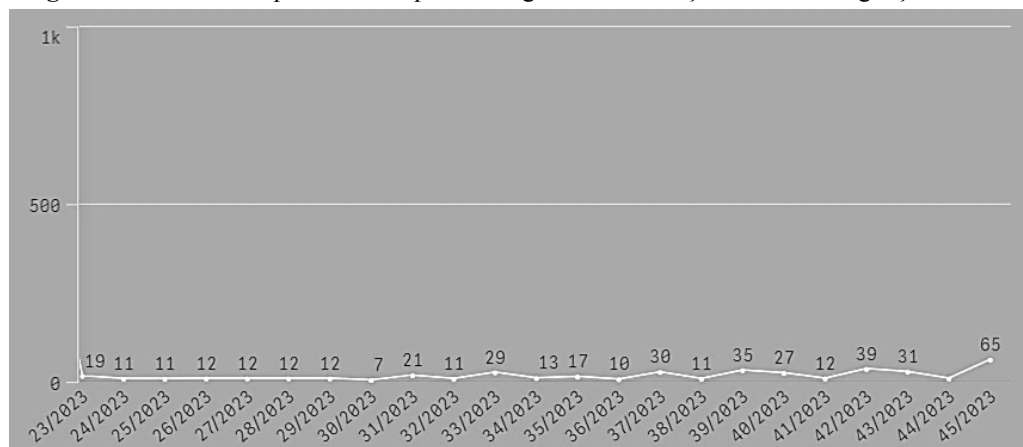


**Figura 4.** Casos novos por semana epidemiológica de notificação em todo o Brasil



Fonte: Ministério da Saúde, BRASIL (2023).

**Figura 5.** Casos novos por semana epidemiológica de notificação em Foz do Iguaçu – Paraná



Fonte: Ministério da Saúde, BRASIL (2023).

### ***1.1.3. Cuidados e prevenção***

Acredita-se que a população idosa, particularmente aqueles sem imunização, bem como os trabalhadores da linha de frente e suas respectivas famílias estejam entre o grupo de alto risco. Além disso, pacientes com doenças subjacentes, como asma, diabéticos e doenças cardíacas são mais suscetíveis à Covid-19 (KUMAR & KUMAR, 2020).

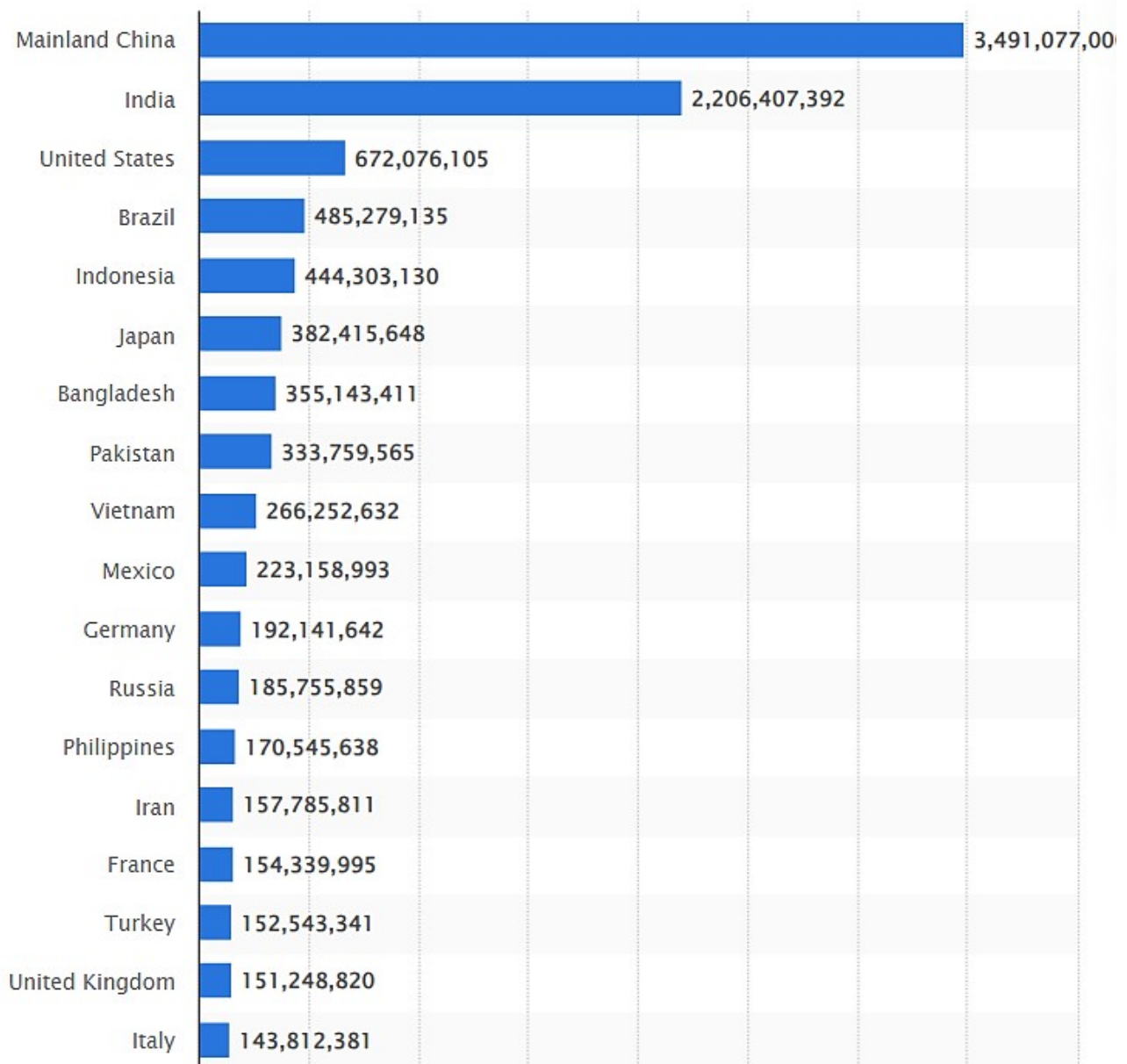
No dia 13 de janeiro de 2023, a OMS publicou em seu site uma atualização das suas recomendações em relação ao uso de máscaras, manejo clínico dos pacientes (referente ao tempo de isolamento) e tratamentos para Covid-19. Diante a mudança do cenário epidemiológico da Covid-19, o uso de máscaras faciais tornou-se facultativo em diversos municípios e unidades federadas no Brasil. A nota técnica Nº 6/2023-CGVDI/DIMU/SVSA/MS publicada cita as recomendações referentes ao uso de máscaras e do manejo clínico de pacientes. As máscaras continuam sendo uma ferramenta chave contra a Covid-19, sendo recomendado o uso pelo público em situações específicas como: Pessoas com sintomas gripais, casos suspeitos ou confirmados de Covid -19, ou pessoas que tenham tido contato próximo com caso suspeito/confirmado de Covid-19; pessoas com fatores de risco para complicações da Covid-19 (em especial imunossuprimidos, idosos, gestantes e pessoas com múltiplas co-morbidades) em situações de maior risco de contaminação pela Covid-19, como: locais fechados e mal ventilados, locais com aglomeração e em serviços de saúde (SAÚDE, 2023).

A nota ainda destaca que o isolamento e a quarentena são estratégias de saúde pública que visam proteger a população e evitar a disseminação de doenças contagiosas, como a Covid-19. Indivíduos com quadro de síndrome gripal leve com confirmação para Covid-19 (sintomáticos) devem permanecer 7 dias de isolamento (após início dos sintomas) e medidas adicionais até 10º dia. O isolamento pode ser reduzido se apresentar resultado negativo ao final do 5º dia, e estar sem sintomas/febre por pelo menos 24 horas. Caso o paciente ainda apresentar sintomas/febre no 7º dia ou testar positivo no 5º dia, permanecer em isolamento até 10 dias em isolamento. Indivíduos assintomáticos confirmados laboratorialmente para Covid-19 (assintomáticos), devem permanecer 7 dias de isolamento e medidas adicionais até 10º dia. O isolamento pode ser reduzido se apresentar resultado negativo ao final do 5º dia e continuar sem sintomas durante todo o período (SAÚDE, 2023).

As vacinas eficazes foram urgentemente necessárias para acabar com esta pandemia e ajudar a sociedade a voltar à normalidade. De fato, muitas vacinas candidatas Covid-19 foram pesquisadas, desenvolvidas, testadas e avaliadas a uma velocidade sem precedentes. No final de fevereiro de

2021, várias vacinas foram aprovadas condicionalmente e outras estão próximas de tal aprovação. É provável que muitas outras ainda em testes clínicos cheguem ao mercado nos próximos anos (LI *et al*, 2021). Até 20 de março de 2023, mais de 13 mil milhões de doses de vacinas contra a Covid-19 tinham sido administradas em todo o mundo (Figura 6).

**Figura 6.** Número de doses da vacina Covid-19 administradas em todo o mundo até 20 de março de 2023, por país



Fonte: Worldwide (2023).

Embora a vacinação contra o coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) não previna totalmente a infecção por Covid-19, ela continua sendo um componente crucial na prevenção da gravidade, hospitalização e mortalidade da Covid-19. Também ficou claro que

existe uma necessidade contínua de doses de reforço porque a imunidade da vacinação com RNA mensageiro (mRNA) diminui com o tempo (MIZRAHI *et al*, 2021; BLUMENTHAL *et al*, 2023).

Segundo a plataforma de dados *WHO* (2023), até a presente data (Nov, 2023), 70,6% da população mundial recebeu pelo menos uma dose da vacina Covid-19. 13,53 mil milhões de doses foram administradas a nível mundial e 7.510 são agora administradas todos os dias. 32,8% das pessoas em países de baixa renda receberam pelo menos uma dose.

A vacinação incompleta tem implicações substanciais para a saúde pública; indivíduos parcialmente vacinados apresentam maior risco de infecção, transmissão e mortalidade por Covid-19. Indivíduos vacinados com reforço apresentam menor risco de hospitalização e morte (LINK-GELLES *et al*, 2022; MASSONNAUD *et al*, 2022). A política de vacinação continua a evoluir, com a adição da Covid-19 vacinas ao calendário de imunização de rotina e, à medida que as variantes Omicron do SARS-CoV-2 evoluíram, a introdução de reforços bivalentes (BLUMENTHAL *et al*, 2023).

#### ***1.1.4. Microbiota intestinal humana e a Covid-19***

A microbiota intestinal consiste em uma comunidade microbiana multiespécie vivendo em um nicho particular em sinergia com o organismo hospedeiro. Além das bactérias, a microbiota inclui leveduras, arqueias e protozoários, além dos vírus, ainda mais numerosos do que as células microbianas (NEISH, 2009; SONNENBURG & BÄCKHED, 2016).

O trato gastrointestinal possui uma vasta camada epitelial, é um ecossistema complexo, aberto e integrado com maior exposição ao meio externo (QIN *et al*, 2010). Este local contém pelo menos mais de 2.000 espécies de microrganismos pertencentes a 12 filos diferentes. O microbioma associado contém 150 a 500 vezes mais genes do que o DNA humano (NEISH, 2009; HUTTENHOWER *et al*, 2020).

A microbiota intestinal apresenta grande diversidade, sendo individualmente moldada por inúmeros fatores desde a genética do hospedeiro, gênero, idade, sistema imunológico, parâmetros antropométricos, condição de saúde / doença, fatores geográficos até fatores socioeconômicos (urbanos ou rurais, condições sanitárias), tratamentos, dieta, entre outros (ARDISSONE *et al*, 2014; DE MARTINO *et al*, 2004).

Avanços recentes na pesquisa revelaram que o microbioma intestinal interfere ativamente em várias funções do hospedeiro, incluindo ritmicidade circadiana, respostas nutricionais, metabolismo e imunidade (ARDISSONE *et al*, 2014).

Os microrganismos desempenham um papel vital na defesa do hospedeiro contra vários agentes externos potencialmente prejudiciais e que causam perturbações endógenas da homeostase (LYNCH & HSIAO, 2019). De uma perspectiva ecológica, os mamíferos e seus microrganismos comensais coevoluíram em direção ao mutualismo e hemostasia (ZHENG *et al*, 2020).

O sistema imunológico da mucosa é altamente especializado, suas funções são amplamente independentes do sistema imunológico sistêmico e sofre grandes alterações após a colonização bacteriana do trato intestinal (KABAT *et al*, 2014). Microrganismos comensais são necessários para a maturação do sistema imunológico, que adquire a capacidade de diferenciar entre bactérias comensais e bactérias patogênicas (THAISS *et al*, 2016; NAKANISH *et al*, 2015).

O vírus SARS-CoV-2 foi encontrado em esfregaços nasofaríngeos, nasais, de fezes e da microbiota retal de pacientes com Covid-19 (XU *et al*, 2020; HUANG *et al*, 2020). O receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), que é fundamental nas doenças cardiovasculares, renais e pulmonares. Ele também tem um papel crucial na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (HERNÁNDEZ PRADA *et al*, 2008). Os receptores ACE2 são expressos em vários órgãos, incluindo o trato gastrointestinal e respiratório. Como afirmado anteriormente, a expressão diminuída de ACE2 está associada com infecção viral, desequilíbrio imunológico, bem como com disbiose bacteriana intestinal, e está bem estabelecida no SARS-CoV-2 (CHHIBBER-GOEL *et al*, 2021).

Alguns estudos realizados em pacientes com Covid-19 demonstraram que eles tinham microbiomas intestinais alterados em comparação com os grupos controle de pacientes saudáveis (ZUO *et al*, 2020; ZUO *et al*, 2021; GU *et al*, 2020; ZHANG *et al*, 2020). Os estudos de Zuo *et al*. (2020, 2021), usando sequenciamento metagenômico *shotgun* de amostras fecais, descreveu disbiose no microbioma bacteriano e no microbioma em pacientes com Covid-19 quando comparados com aqueles em controles saudáveis.

Notavelmente, os estudos demonstravam que os pacientes com Covid-19 tinham principalmente um número aumentado de patógenos oportunistas, uma parte da microbiota comensal que pode se tornar patogênica em caso de perturbação do hospedeiro, como disbiose ou sistema imunológico debilitado (YAMAMOTO *et al*, 2021; BROWN *et al*, 2012).

Várias observações sugerem um envolvimento substancial com o trato gastrointestinal, como a capacidade de SARS- CoV-2 infectar e replicar em enterócitos humanos do intestino

delgado como a detecção consistente de RNA de vírus em amostras fecais e a composição alterada da microbiota intestinal em indivíduos infectados com o vírus (LAMERS *et al*, 2020; WÖLFEL *et al*, 2020; ZUO *et al*, 2020).

Como o trato GI é o maior órgão imunológico no corpo e sua microbiota residente (*Bifidobacterium*, *Akkermansia*, *Faecalibacterium*, Lachnospiraceae, *Veillonella*, *Bacteroidaceae*, etc) é conhecida por modular as respostas imunes do hospedeiro, foi levantada a hipótese de que a microbiota intestinal está associada a respostas imunes inflamatórias do hospedeiro com Covid-19 (SCHIRMER *et al*, 2016; ARAOS & AGATA, 2019; ZUO *et al*, 2020).

### **1.1.5. A ferramenta DNA Metabarcoding na investigação da Covid-19.**

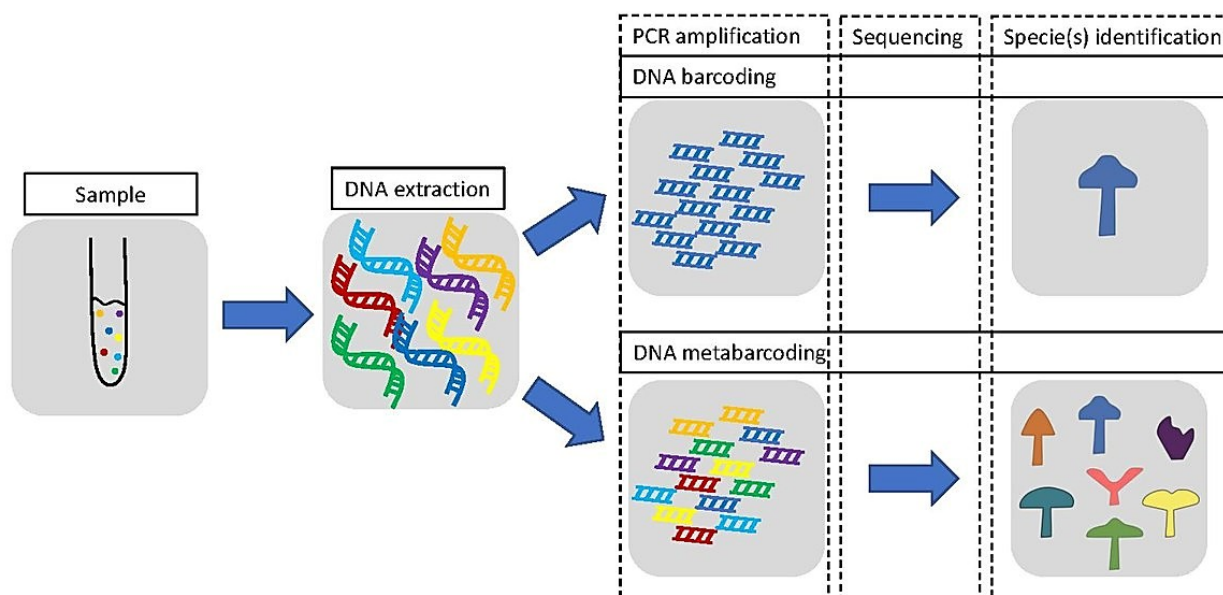
Atualmente, os avanços tecnológicos oferecem a oportunidade de gerar dados de biodiversidade de alta qualidade de maneira consistente, automatizando cada vez mais os dutos de processamento e expandindo radicalmente o escopo do monitoramento dos ecossistemas (Bush *et al*, 2017).

Um dos mais promissores deles é a técnica de *Metabarcoding* de DNA, que suporta a identificação taxonômica massivamente paralelizada e, portanto, de alto rendimento de assembleias de organismos em uma amostra biológica (Bush *et al*, 2019). Enquanto o código de barras de DNA de amostra única usa sequências genéticas curtas para identificar táxons individuais, muitas vezes no nível da espécie, o *Metabarcoding* suporta a identificação simultânea de assembleias inteiras por meio de sequenciamento de alto rendimento (Figura 7) (Yu *et al*, 2012).

A metagenômica, apesar de fornecer um nível maior e mais completo de informações, é muito mais onerosa e lenta comparada com a técnica de DNA *Metabarcoding* (Pavan-Kumar *et al*, 2015), quando o objetivo é o conhecimento da riqueza de um grupo específico de microrganismos.

Estudos utilizando a abordagem *Metabarcoding* vêm sendo empregados na tentativa de elucidar a causa e/ou o tratamento de algumas doenças que acometem os seres humanos. A pesquisa sobre a relação entre as mudanças na microbiota intestinal e as doenças humanas é um campo em crescimento. Hamad *et al*. (2018), analisaram o perfil metabólico da microbiota eucariótica do intestino de pacientes infectados com vírus HIV utilizando a abordagem *metabarcoding*. Purcell *et al*. (2017) analisaram os distintos padrões do microbioma intestinal em amostras de pacientes que estavam acometidos com câncer colorretal.

**Figura 7.** Esquematização básica da capacidade do DNA Metabarcoding de identificar um número maior de espécies



Fonte: Adaptado de LIU *et al.*, 2020.

Compreender a diversidade microbiana no intestino de indivíduos saudáveis, bem como em pacientes imunocomprometidos, é necessário para compreender seu papel na saúde e na doença (HOFFMANN *et al.*, 2013). O desenvolvimento de técnicas moleculares independentes de cultura, incluindo extração direta de DNA de fezes seguida de sequenciamento de clones, bem como métodos de sequenciamento de alto rendimento, oferecem novas oportunidades para estimar a diversidade microbiana no intestino humano, fornecendo dados sobre a totalidade da comunidade, particularmente em organismos ainda não cultivados ou fastidiosos em indivíduos saudáveis e pacientes acometidos com outras patologias (HAMAD *et al.*, 2012; REESE *et al.*, 2019).

## 1.2. Justificativa

A doença por coronavírus 2019 ou Covid-19 foi responsável por uma crise de saúde pública que ainda ameaça a humanidade. Embora tenha se originado na província de Hubei, na China, no final de 2019, ainda assim se espalhou para muitos países do mundo (WANG *et al.*, 2020). Esta doença pandêmica é causada pelo novo betacoronavírus, denominado SARS-Cov-2 (LAKE, 2020). A pandemia de Covid-19 redirecionou a atenção para estratégias de prevenção da infecção respiratória aguda. Embora a vacinação represente a base para o controle da doença, a sua eficácia a nível global é comprometida por fatores que incluem custo, disponibilidade, hesitação vacinal, falha vacinal e variantes, bem como novos agentes patogênicos respiratórios (BILEZIKIAN *et al.*, 2023).

Com o surgimento da pandemia de Covid-19, houve um rápido aumento na pesquisa relacionada à SARS-CoV-2. Tem se tornado fundamental obter informações sobre a evolução e patogênese do vírus para controlar a pandemia. Pesquisadores ao redor do mundo estão investigando a evolução da sequência SARS-CoV-2 em nível do genoma e da proteína, rastreando a pandemia usando modelos filodinâmicos e epidemiológicos, além de examinar potenciais alvos de drogas. Laboratórios estão compartilhando dados relacionados ao SARS-CoV-2 com velocidade sem precedentes (HUFISKY *et al*, 2021).

Alguns estudos que utilizam a abordagem de sequenciamento de última geração, como a ferramenta *Metabarcoding*, para explorar a diversidade bem como inferir o perfil metabólico da comunidade microbiana associada ao intestino de pacientes acometidos com a Covid-19, são raros. Desta forma, essa abordagem molecular poderá auxiliar na elucidação dos mecanismos de interação do vírus com a microbiota intestinal humana de pacientes com diferentes idades bem como no fornecimento de informações que respaldem o tratamento e/ou prevenção da doença.

### **1.3. Pergunta Norteadora e Hipótese.**

A composição da microbiota intestinal de pacientes com Covid-19 apresenta alterações na avaliação através da metodologia de DNA *Metabarcoding*?



## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

- avaliar a microbiota intestinal e inferir sua funcionalidade em amostras de pacientes acometidos com a Covid-19.

### 2.2. Específicos

- coletar amostras (fezes) de pacientes internados com Covid-19 positivo, apresentando sintomas leves e graves, e negativo para um grupo controle;
- realizar a extração do DNA genômico total da comunidade microbiana presente nas amostras de fezes;
- realizar o sequenciamento do gene rRNA 16S por tecnologia *Metabarcoding*;
- analisar por bioinformática os dados brutos gerados após o sequenciamento; e
- comparar a composição do microbioma procariótico de pacientes com e sem sintomas de Covid-19 e associar esses microrganismos com o vírus.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Coleta das amostras de fezes dos pacientes com Covid-19**

Número do parecer de aprovação do comitê de ética para esta pesquisa: 4.698.371.

A coleta das amostras de fezes de pacientes hospitalizados foi realizada no Hospital Municipal da cidade de Foz do Iguaçu. A metodologia empregou na coleta de 03 amostras de fezes de pacientes diferentes e de cinco grupos: *i)* pacientes jovens que tenham desenvolvido Covid-19, e apresentaram sintomas; *ii)* pacientes jovens que tenham desenvolvido Covid-19, mas não apresentaram sintomas; *iii)* pacientes idosos que tenham desenvolvido Covid-19, e apresentaram sintomas; *iv)* pacientes idosos que tenham desenvolvido Covid-19, mas não apresentaram sintomas da doença; *v)* grupo controle sem a presença de Covid-19; totalizando 18 amostras. A coleta foi realizada por pessoal devidamente treinado em manipular fluidos corpóreos contaminados com o material infeccioso. As amostras de fezes foram acondicionadas em frascos estéreis apropriados para coleta e foram armazenadas a -20 °C, até serem processadas.

#### **3.2. Quantificação da presença do vírus nas amostras de fezes**

##### ***3.2.1. Pré-tratamento da amostra***

Foi realizado um pré-tratamento das amostras dos pacientes positivos para Covid-19. Este procedimento foi realizado conforme as especificações do fabricante KASVI®. Foi preparado uma suspensão de amostra em tampão PBS 10% (solução 1:10), seguida de centrifugação (15.000 RPM) a temperatura ambiente, para realizar o processo de clarificação da amostra fecal. Separou-se 200 µL do sobrenadante da amostra clarificada livre de partícula. Utilizou-se a solução como amostra inicial para realização do passo de extração.

##### ***3.2.2. Extração do DNA, RNA viral e sequenciamento***

Para extração do DNA e RNA viral, foram seguidas as especificações do fabricante, KASVI®. Foram adicionados 5 µL de Proteinase K e 200 µL da amostra biológica em um tubo 1,5 mL e, em seguida, agitado moderadamente em vórtex. No caso de alguma amostra ter volume menor que 200 µL, o volume foi completado com PBS 1X. Foram adicionados 200 µL de Tampão de Lise V, sendo homogeneizado vigorosamente em vórtex (10-15 segundos). Quando necessário, o

tubo foi centrifugado brevemente (1 segundo a 2.000xg) para retirar gotículas da tampa do tubo (*short spin*). Foram adicionados 5,6 µL de solução estoque de Carreador RNA (1 µg/ µL) no tubo da extração e agitados no vórtex. Posteriormente foi realizada incubação em temperatura ambiente (18-25 °C) por 3 minutos. Se necessário, centrifugar o tubo brevemente (1 segundo a 2.000xg) para retirar gotículas da tampa do tubo (*short spin*). Adicionou-se 200 µL de etanol (96-100%), agitar vigorosamente em vórtex (10-15 segundos) e incubou-se por 5 minutos em temperatura ambiente (18-25 °C). Centrifugou-se o tubo brevemente (1 segundo a 2.000g) para retirar gotículas da tampa do tubo. Foi transferido toda a mistura (610 µL) para o Tubo Spin V. Centrifugou-se por 3 minutos 4000 g. Descartou-se o Tubo de Coleta com o filtrado. Foi colocado o tubo-filtro em um novo Tubo de Coleta e adicionar 400 µl de Tampão de Lavagem V1. Centrifugou-se por 30 segundos a 11.000g. Descartou-se Tubo de Coleta com o filtrado. Foi colocado o tubo-filtro em um novo tubo de coleta e adicionar 400 µl de Tampão de Lavagem V2. Centrifugar por 30 segundos a 11.000 x 9. Descarta-se o Tubo de Coleta com o filtrado. Deve ser verificado se todo tampão residual do passo anterior foi removido com o Tampão de Lavagem V2, principalmente se o lisado tiver entrado em contato com o aro interno da coluna durante a transferência do lisado. Foi colocado o tubo-filtro em um novo Tubo de Coleta e adicionou-se 200 µl de Tampão de Lavagem V2. Centrifugou-se por 5 minutos a 20.000 x g (ou velocidade máxima da centrífuga). Descartou-se o Tubo de Coleta com o filtrado, o tubo-filtro foi colocado em um novo tubo de 1.5 mL e incubado por 5 minutos a 56 °C com a tampa aberta. Adicionou-se 30 µl de Água Livre de Rnase (pré-aquecida a 70 °C) e incubou-se por 3 minutos em temperatura ambiente. Por fim, foi centrifugado por 3 minutos a 20.000 x g (ou velocidade máxima da centrífuga) para eluir os ácidos nucléicos do tubo-filtro.

### **3.2.3. Amplificação de RNA do SARS-CoV-2**

As amostras preparadas no item 3.2.2 foram então colocadas no aparelho CFX96 para realização do RT-PC, onde foram feitas as amplificações do RNA de corona vírus detectados. O teste foi realizado seguindo as orientações do KIT XGEN MASTER Covid-19, desenvolvido pela empresa Mobius Life Science Comércio de Produto para Laboratórios Ltda.

Foram adicionados 15 µL da MIX CV19 em cada poço de acordo com o número de reações necessárias, incluindo amostras e controles. Em seguida, foi adicionado e homogeneizado na Mix, 5 µL de RNA extraído de cada amostra. Centrifugou-se brevemente os microtubos e em seguida os mesmos foram colocados no equipamento CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System na

configuração de PCR para 1 Ciclo Hold 45°C durante 15 min; 1 Ciclo Hold 95°C durante 2 min; 45 Ciclos PCR 95°C durante 10 seg e 60°C durante 50 seg.

### **3.3. Análise *Metabarcoding***

#### **3.3.1. *Extração do DNA genômico da comunidade microbiana***

Todo o procedimento da tecnologia *Metabarcoding* foi realizado por serviço terceirizado, na empresa MicrobiomeX. Para a realização da extração do DNA microbiano das amostras, as amostras foram centrifugadas a 10.000 x g por 10 minutos, para concentrar o conteúdo celular das amostras clínicas. Após centrifugação, o líquido sobrenadante foi descartado e o *pellet* (cerca de 0.25 g) foi utilizado para o procedimento de extração do DNA. A extração do DNA total foi realizada utilizando o kit Dneasy® PowerSoil®, da empresa QIAGEN, seguindo o protocolo do fabricante. Todo procedimento foi realizado dentro de uma cabine de segurança biológica (fluxo laminar). O DNA genômico extraído foi quantificado utilizando o espectrofotômetro NanoDrop™ (1000 da Thermo Scientific). No software do equipamento, foi selecionado o módulo de ácidos nucleicos (detecta a absorvância da amostra nos comprimentos de onda de 230, 260 e 280 nanômetros). O equipamento foi calibrado usando água deionizada como solução branco. Aliquota de 1 µL de cada amostra de DNA extraído, foi quantificada.

#### **3.3.2. *Qualidade das amostras e amplificação do gene 16S***

O DNA total de cada amostra foi sequenciado como serviço de terceiro em empresa especializada pela tecnologia Illumina MiSeq. A análise de qualidade foi realizada através da quantificação por fluorescência utilizando o equipamento Qubit® 3.0 Fluorometer e kit Qubit™ dsDNA BR Assay (Thermo Fisher Scientific). A amplificação do gene ribossomal 16S, foi realizado pela reação de PCR utilizando 10 µL de GoTaq® Colorless Master Mix 2x (Promega, USL), 0,3µM de oligonucleotideo foward e 0,3µM de oligonucleotideo reverse, 1uL de DNA genômico e água ultrapura estéril suficiente para 20 uL (PASSARINI *et al.*, 2021). A região 16S (V3 e V4) do RNAr foi amplificado com primer 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3' (foward). O programa de amplificação foi: desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida por 27 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30 segundos, anelamento a 55 °C por 30 segundos; extensão a 72 °C

por 30 segundos e uma extensão final a 72 °C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) (PASSARINI *et al.*, 2021).

### **3.3.3. Reação de indexação**

Foram inseridos os indexadores nos adaptadores comuns, que são necessários para a geração de *clusters* e sequenciamento das amostras. A reação de indexação foi realizada seguindo o protocolo do kit Nextera XT Index (Illumina). O programa de amplificação consiste de: incubação à 72 °C por 3 minutos, desnaturação inicial à 95 °C por 30 segundos, seguidos de 12 ciclos de 95 °C por 10 segundos, 55 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos e extensão final a 72°C por 5 minutos. As reações de amplificação foram conduzidas em termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems). Os indexadores utilizados serão os N701 (TAAGGCGA) e S502 (ATAGAGAG) (PASSARINI *et al.*, 2021)

### **3.3.4. Purificação e quantificação da biblioteca**

As bibliotecas geradas foram submetidas as etapas de purificação utilizando *bead* magnética Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter), para remoção de fragmentos muito pequenos da população total de moléculas e restos de *primers*. Após, foi realizado uma quantificação pela metodologia de PCR Tempo Real utilizando Kit KAPA-KK4824 (Library Quantification Kit – Illumina/Universal), todos de acordo com protocolo do fabricante. O sequenciamento foi conduzido utilizando-se o sistema Illumina MiSeq de sequenciamento de nova geração (Illumina® Sequencing) e kit MiSeq Reagent Kit V2 Nano 500 ciclos – leitura de 2 x 250 pb (PASSARINI *et al.*, 2021).

### **3.3.5. Análises de Bioinformática**

Para realizar a análise do processamento dos dados, foram utilizadas ferramentas tanto do pipeline Qiime2 (Bolyen *et al*, 2018) e ferramentas compiladas na plataforma Galaxy Europe (Afgan *et al*, 2018). Para avaliar a qualidade do sequenciamento, foi utilizado o software FastQC (Andrews, 2010) através da plataforma Galaxy Europe. As sequências foram importadas num artefato SampleData[SequencesWithQuality], sendo processadas utilizando o ambiente Qiime2 e o *plugin* DADA2 (Callahan *et al*, 2016). As OTUs serão agrupadas pelo método *open reference* com 99% de identidade, através do Qiime2 com o *plugin vsearch* (Rice *et al*, 2000). A base de dados ribossomal SILVA (Quast *et al*, 2013) versão 132 (<https://www.arb-silva.de/download/archive/qiime>) será utilizada como referência externa.

O *plugin Taxa*, presente no Qiime2, foi utilizado para a atribuição taxonômica a cada OTU, utilizando as etiquetas taxonômicas com 99% de identidade da base de dados SILVA. A Diversidade Alfa será analisada através do *plugin alpha diversity*, do ambiente Qiime2. Foi possível calcular a curva de rarefação das sequências das amostras com uma profundidade de 9000 sequências. Foram utilizados os índices de Shannon (Shannon and Weaver, 1962), Simpson (Simpson, 1949) e a estimativa de cobertura de Good (Good, 1953).

### **3.3.6. Análise da Microbiota Funcional**

Para análise dos dados dos resultados do Picrust2 v2.5.2, foi utilizado o pacote R DESeq2 v1.40.2. A análise de expressão diferencial com DESeq2 foi definida com base na fórmula de design “Infectado + Controle”. A análise foi conduzida através da função de resultados com um teste de Wald, tendo definido um limite de taxa de descoberta falsa de 0,05 e um limite de Log2 Fold Change de 1. Os resultados do DESeq2 foram visualizados com o pacote ComplexHeatmap v2.16.0 R considerando apenas a função estatisticamente significativa (<0,05 e limite de alteração de dobra Log2 de >1) com as amostras infectadas versus os controles.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. Amostras coletadas

A coleta das amostras de fezes dos pacientes hospitalizados com sintomas de Covid foi realizada no Hospital Municipal Padre Germano Lauck da cidade de Foz do Iguaçu (Rua Adoniran Barbosa, 370 – Parque Monjolo, Foz do Iguaçu – PR, 85864-380). Foram colhidas amostras em triplicata de 6 pacientes diferentes (Tabela 1), sendo estes 3 pacientes jovens e 3 pacientes idosos.

**Tabela 1.** Detalhamento das características dos pacientes e coleta de amostra de fezes

Amostra	Paciente	Idade	Sintomas	Data coleta	Concentrações dos DNAs genômicos extraídos
LV1	F	29	Leves	07/07/2021	A – 296,6 ng/uL <sup>-1</sup> B – 547,2 ng/uL <sup>-1</sup> C – 207,2 ng/uL <sup>-1</sup>
LV2	M	67	Leves	28/08/2021	A – 53,0 ng/uL <sup>-1</sup> B – 40,3 ng/uL <sup>-1</sup> C – 65,8 ng/uL <sup>-1</sup>
GV1	M	30	Graves	09/07/2021	A – 88,6 ng/uL <sup>-1</sup> B – 76,7 ng/uL <sup>-1</sup> C – 22,4 ng/uL <sup>-1</sup>
GV2	M	60	Graves	08/08/2021	A – 88,6 ng/uL <sup>-1</sup> B – 76,7 ng/uL <sup>-1</sup> C – 22,4 ng/uL <sup>-1</sup>
CT1	F	28	-	05/10/2021	A – 61,0 ng/uL <sup>-1</sup> B – 90,0 ng/uL <sup>-1</sup> C – 112,0 ng/uL <sup>-1</sup>
CT2	F	67	-	28/10/2021	A – 90,7 ng/uL <sup>-1</sup> B – 70,3 ng/uL <sup>-1</sup> C – 94,5 ng/uL <sup>-1</sup>

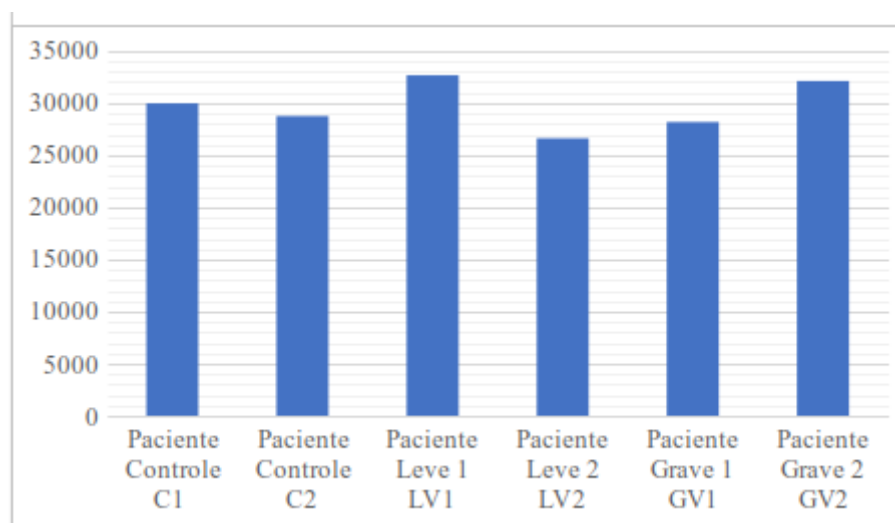
Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: M = Masculino; F = Feminino.

### 4.2. Perfil da comunidade microbiana associada a fezes de pacientes com Covid-19

Após análise de *Metabarcoding* de cada uma das 3 amostras de fezes coletadas dos 6 pacientes (total de amostras n=18), obteve-se um total de 534.769 seqüências listadas em arquivo de metadados (Figura 8). Várias listas foram geradas após a organização e análise das OTUs através da ferramenta Quime2, contendo reino, filo, classe, ordem, família e gênero.

**Figura 8.** Média do total de microrganismos encontrados em cada Paciente



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Nota explicativa:** Os valores de série 1 (Eixo X) correspondem a média total dos valores de microrganismos encontrados nas amostras dos pacientes. Série 2 (Eixo Y), barras demonstrando graficamente a diferença dos valores encontrados.

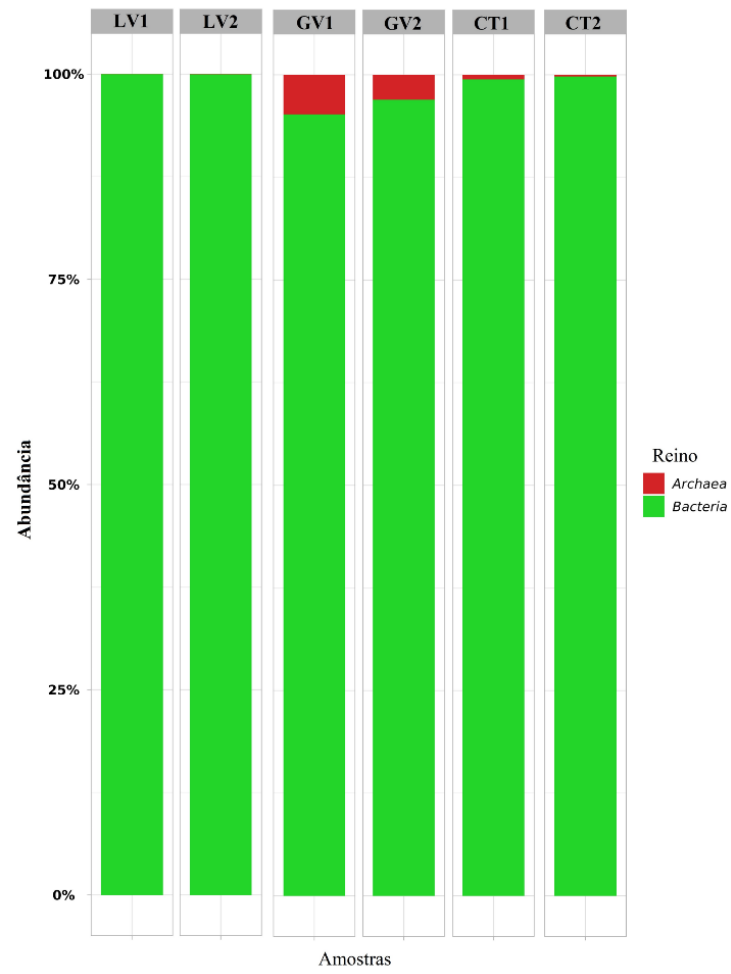
A análise de cada amostra de paciente (n=18) retornou com informações filogenéticas revelando a abundância relativa de Bactérias e Arqueias encontradas (Figura 9), destacando uma maior presença das Arqueias nos pacientes considerados graves (GV1 1367 e GV2 966 sequências).

Ao que diz respeito a presença das Arqueias, as amostras dos pacientes com sintomas leves de Covid-19 (LV1 e LV2) apresentaram apenas 0,002% e 0,01%, os pacientes controle CT1 e CT2 obtiveram 0,6% e 0,2%, enquanto os pacientes considerados graves apresentaram valores maiores, onde GV1 chegou a 5% e GV2 teve 3% de seu total de microrganismos associados ao Filo das Arqueias.

A seguir, na Figura 10, pode-se notar que na amostra de GV1 o total de 5% de OTUs representados por arqueias encontradas pertencem à família das Methanobacteriaceae, sendo 4% da composição o gênero das *Methanosphaera* e 0,9% *Methanobrevibacter*. O paciente GV2 apresentou 3% das Arqueias Methanobacteriaceae, sendo 2% do gênero *Methanosphaera* e 1% *Methanobrevibacter*.

**Figura 9.** Diferenças de domínios encontrados na microbiota dos pacientes

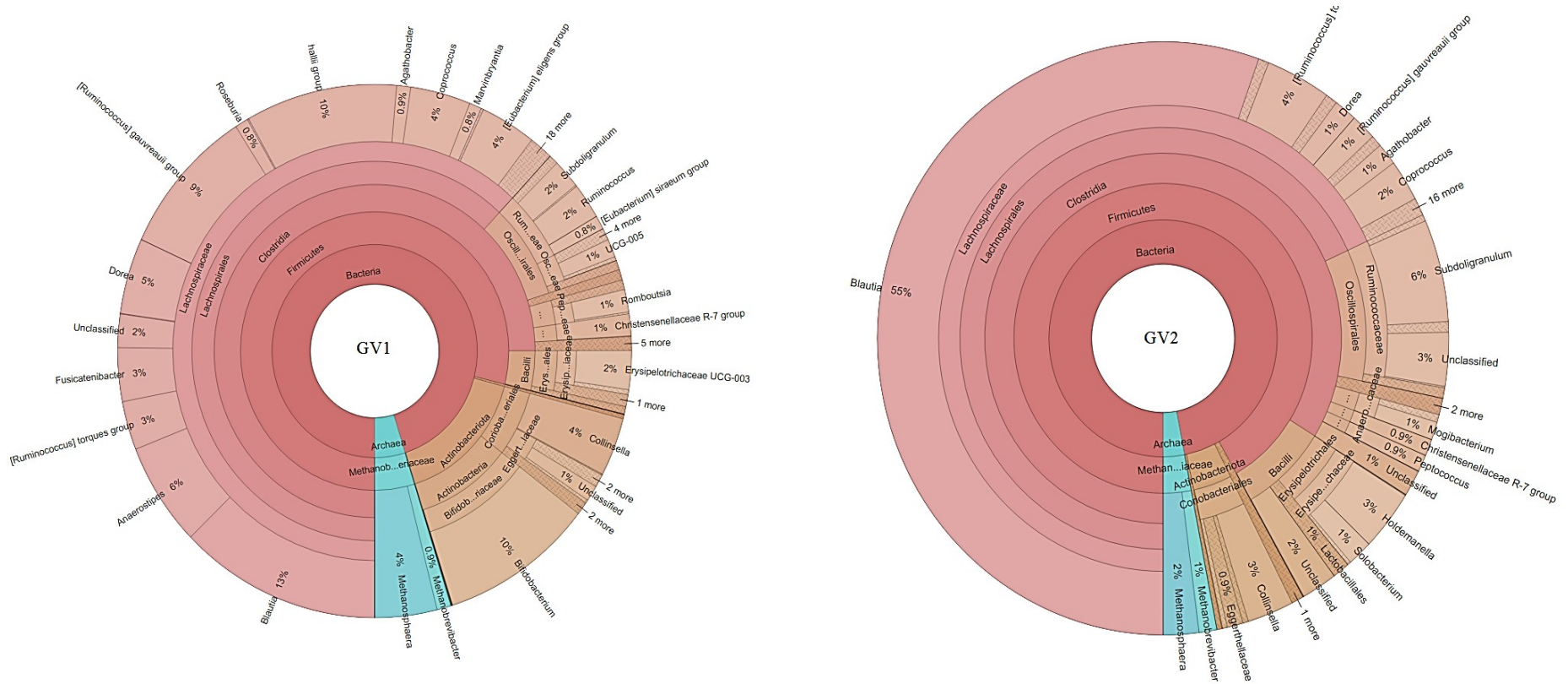




Fonte: Do autor, 2023.

**Legenda:** LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

**Figura 10.** Diversidade da comunidade microbiana intestinal dos Pacientes com sintomas graves de Covid-19, GV1 e GV2, demonstrando diferentes domínios (Bactéria e Arqueias)



Fonte: Do autor, 2023.

Legenda: GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; em azul está destacado as arqueias e quantidade de gêneros encontrados desse domínio nos pacientes GV1 e GV2.

As Arqueias estão presentes no intestino humano, sendo que a ocorrência mais frequente é da espécie *Methanobrevibacter smithii*, um produtor de metano a partir de subprodutos da fermentação bacteriana. As taxas de colonização relatadas por arqueias metanogênicas variam de 25% a 95% dos humanos (MATARAZZO *et al*, 2012).

O filo Euryarchaeota, pertencente as Arqueas aparecem nos pacientes graves (GV1 4,8% e GV2 3%). Sabe-se que Archaea constitui uma baixa proporção do microbioma humano com baixa diversidade. Apenas o filo de Euryarchaeota faz parte do microbioma humano, tendo *Methanobrevibacter smithii*, *M. oralis* e *Methanosphaera stadtmanae* como membros principais. *Methanobrevibacter smithii*, como visto anteriormente, é o principal colonizador do intestino em humanos (HORZ & CONRADS, 2010). ABOUSHANAB (2022), verificou um perfil de baixa abundância de archaea nas amostras de pacientes saudáveis. Neste estudo, os pacientes CT1, CT2, LV1 e LV2 apresentaram baixa percentagem de Euryarchaeota.

A maioria das arqueias metanogênicas coexistem e interagem intimamente com bactérias anaeróbicas. As arqueias metanogênicas utilizam compostos de baixo peso molecular, como  $H_2 + CO_2$ , ácido fórmico ou acetato, e, portanto, possuem relações simbióticas com os produtores desses substratos. Portanto, é razoável supor que a presença ou aumento no nível de arqueias metanogênicas altera a composição da comunidade polimicrobiana, resultando em mudanças na virulência da flora (MAEDA *et al*, 2013; HOQUE *et al*, 2021). Em ecossistemas microbianos, como o intestino humano, quando o  $H_2$  se acumula devido ao catabolismo bacteriano, o crescimento de arqueias é estimulado associado à incorporação de  $H_2$  no metano (HOFFMANN *et al*, 2013).

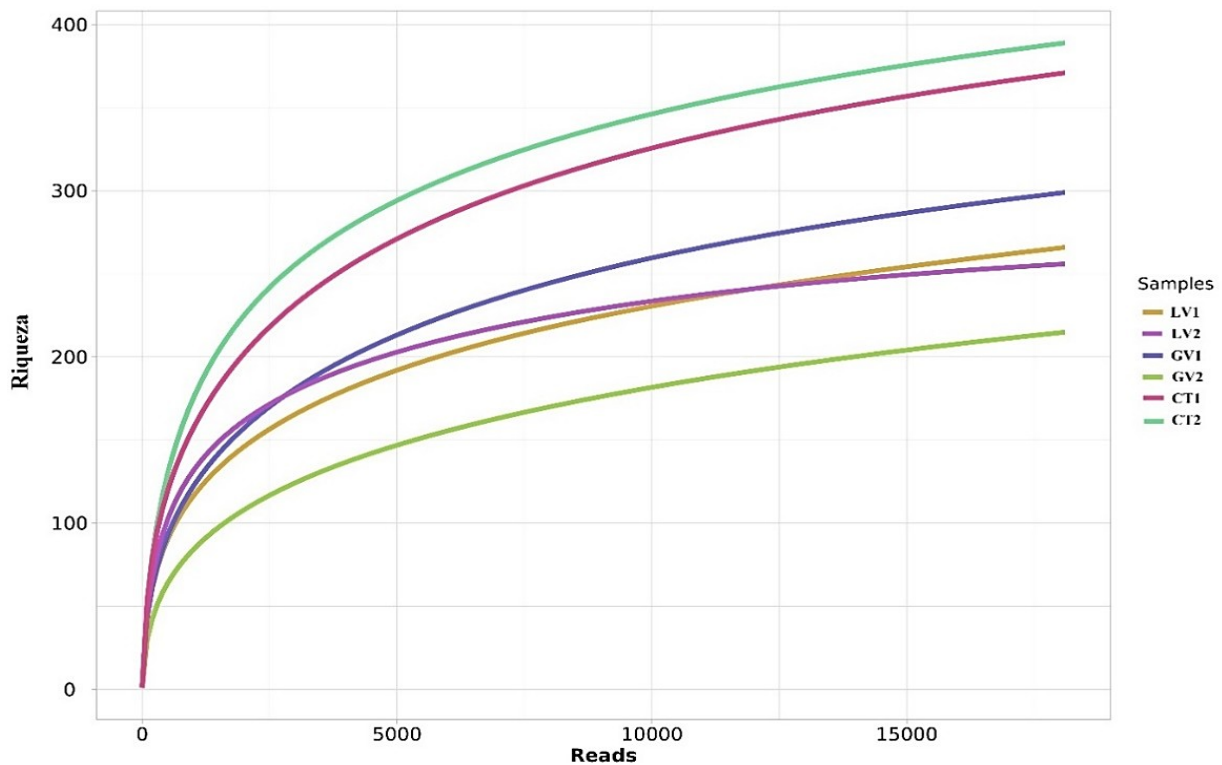
O microbioma humano está fortemente interligado com a saúde e as doenças humanas. O metano é um indicativo importante para várias doenças, incluindo o crescimento excessivo de metanogênio intestinal. Notavelmente, as arqueias responsáveis pela produção de metano são amplamente negligenciadas nos estudos do microbioma humano devido à sua biologia não bacteriana e aos problemas de detecção resultantes (HOEGENAUER *et al*, 2022).

Através das pesquisas realizadas, pode-se evidenciar a complexidade para encontrar correlação das Arqueias com doenças, especialmente aquelas causadas por vírus. Este estudo apresenta uma diferença notável entre a presença de arqueias nos diferentes pacientes, enfatizando sua correlação com aspectos da doença que devem ser investigados mais a fundo, tendo em vista que ainda se sabe muito pouco sobre o papel exercido das Arqueias nas doenças, como é o caso da Covid-19.

A microbiota intestinal desempenha um papel importante na saúde humana, moldando a imunidade local e remodelando os tecidos da mucosa (ROOKS & GARRETT, 2016). Através dos

dados coletados, podemos verificar que a doença da Covid-19 afetou significativamente a diversidade alfa, como pode ser observado no gráfico de rarefação (Figura 11) com os resultados do sequenciamento das amostras de fezes dos pacientes selecionado.

**Figura 11.** Análise de Rarefação da Diversidade Alfa



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

Através da análise do gráfico, pode-se observar que os pacientes controle que não entraram em contato com o vírus de SarsCov19 (CT1; CT2) obtiveram valores relativos de diversidade microbiana mais elevados quando comparados aos outros indivíduos que contraíram a doença. Dentre estes, o paciente com sintomas graves da doença e maior idade (GV2) apresentou uma diversidade muito menor em seu microbioma intestinal.

Em um estudo conduzido com 30 pacientes com Covid-19, 24 pacientes com influenza A (H1N1) e 30 controles saudáveis (HCs) para identificar diferenças na microbiota intestinal pelo sequenciamento do RNA ribossômico 16S, foi observado que os pacientes com Covid-19 tiveram uma diversidade bacteriana intestinal significativamente reduzida (GU *et al*, 2020).

A diversidade microbiana é um determinante crítico da estabilidade do ecossistema microbiano. Ecossistemas estáveis fornecem resistência à colonização por patógenos oportunistas

(ZUO *et al*, 2021). Portanto, a redução na diversidade e riqueza da microbiota intestinal pode contribuir de alguma forma para a expansão de bactérias oportunistas e ter impacto a longo prazo em pacientes com Covid-19 (BRETT FINLAY *et al*, 2021).

Pacientes com menor riqueza de microbioma bacteriano pós-convalescência apresentaram níveis mais elevados de gravidade de Covid-19 (piores funções pulmonares) e proteína C reativa (PCR) no sangue durante a fase aguda, sugerindo uma relação entre disbiose intestinal e resposta hiperinflamatória em Covid-19 (ZUO *et al*, 2021).

No presente estudo, ao observar a curva do gráfico na Figura 11, podemos constatar que a diversidade de cada amostra não foi totalmente recuperada pois as curvas não atingiram um platô. Desta forma, novas amostragens poderiam ser realizadas na tentativa de recuperar a microbiota em sua totalidade.

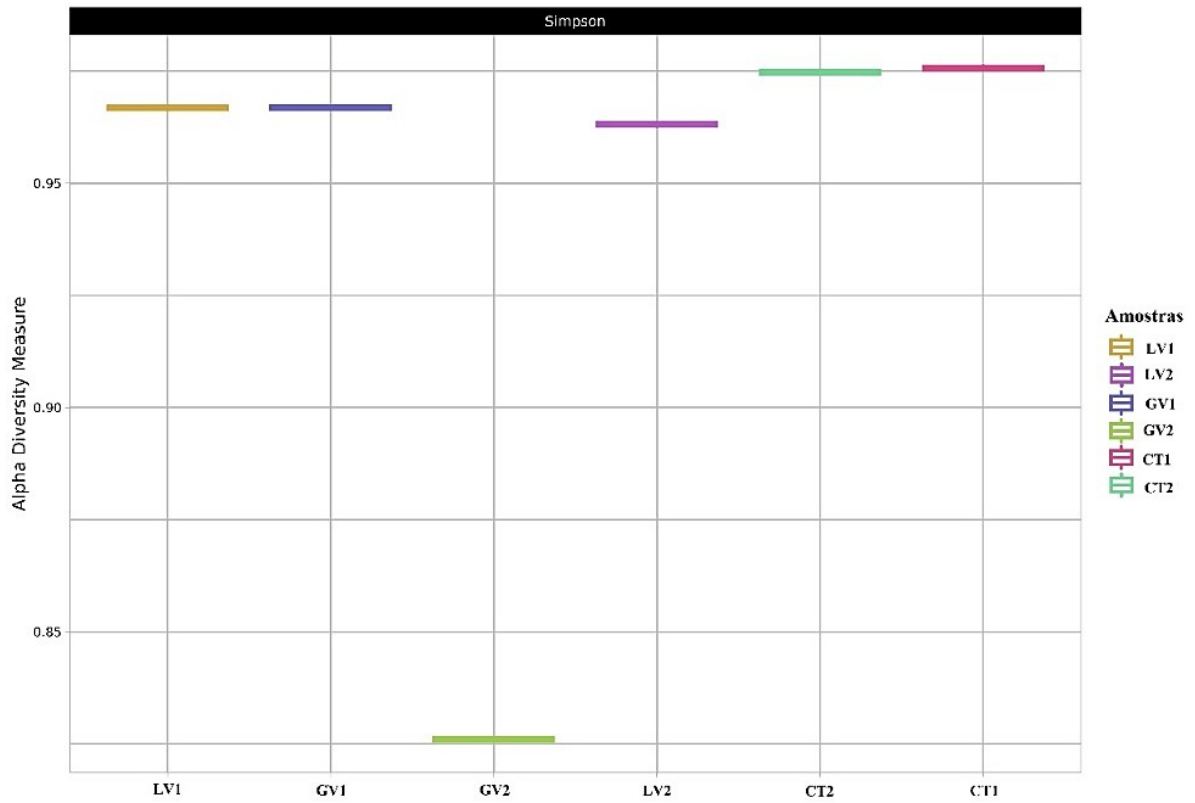
Em outra análise realizada, o índice de Simpson (Figura 12) apresentou a diversidade e uniformidade da distribuição das espécies. Através dos dados obtidos e na representação gráfica pode-se observar claramente o distanciamento entre a amostra obtida do paciente GV2 em comparação com a diversidade alpha encontrada nas demais amostras.

O índice de Shannon, que mede o número total de comunidades microbianas e suas proporções, foi maior no grupo dos pacientes com sintomas leves (LV1; LV2). O índice Chao1 foi usado para avaliar o número total de espécies e OTUs presentes nas amostras. Na Figura 13 a análise do índice de Chao1 releva como a diversidade Alpha dos pacientes com Covid se distancia dos valores encontrados nos pacientes que entraram em contato com a doença.

A diminuição da diversidade na microbiota intestinal tem sido frequentemente considerada como uma marca registrada de doenças, como infecção por HIV, infecção recorrente por *Clostridioides difficile*, doença intestinal inflamatória (TUDDENHAM *et al*, 2020). Assim, foi possível observar uma diminuição na microbiota intestinal de pacientes com Covid-19, medida pelos índices de diversidade alfa comumente aplicados (CHENG *et al*, 2022).

Os microbiomas com menor diversidade alfa aparecem com mais frequência em análises da fase inicial do Covid-19 (XU *et al*, 2021). Tal fato justifica a percentagem de diversidade dos pacientes leves estar próxima dos pacientes graves.

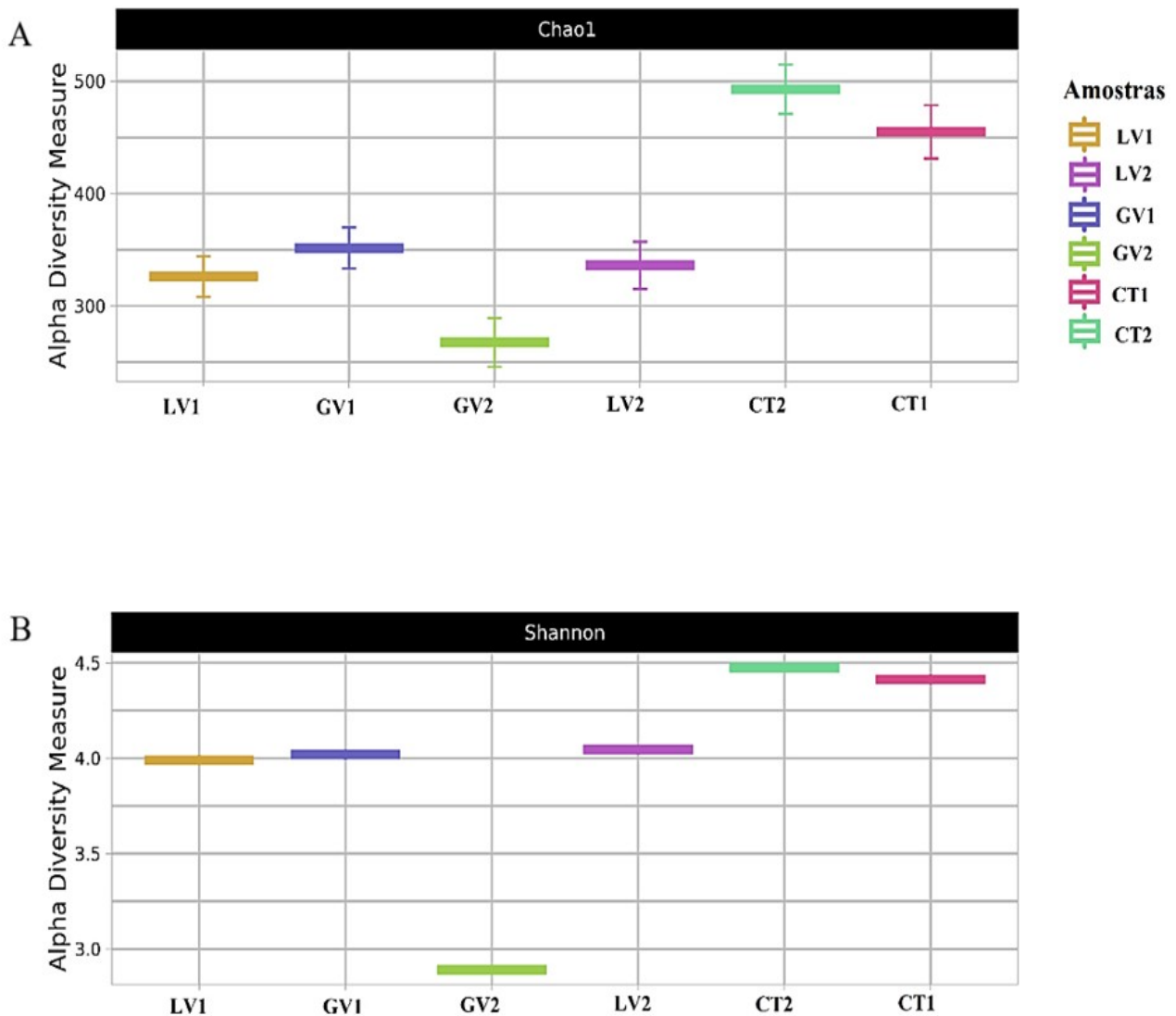
**Figura 12.** Índice de Simpson da Diversidade Alfa



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

**Figura 13.** Índice de Chao1 e Shannon da Diversidade Alfa



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** A: Índice de Chao1; B Índice Shannon; LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

Num estudo de acompanhamento de seis meses sobre o microbioma intestinal de pacientes com Covid-19, foram observadas diminuições significativas na riqueza (índice Chao1) do microbioma intestinal durante as fases aguda, de convalescença e pós-convalescença de Covid-19 (DEBOURDEAU *et al*, 2022).

Os resultados obtidos e demonstrados graficamente revelam um certo distanciamento dos pacientes controle (CT1; CT2). Estes não tiveram contato com a Covid-19 até o período da coleta das amostras. No caso dos pacientes com sintomas leves, a diversidade do microbioma ainda é mais

baixa, aproximando-se dos resultados obtidos na análise das amostras dos pacientes com sintomas graves (GV1; GV2).

Em estudo conduzido por Cheng *et al*, (2022) os índices de diversidade alfa da microbiota intestinal em pacientes recuperados de Covid-19 foram significativamente menores do que os de indivíduos não-Covid-19, o que implicava que a microbiota intestinal de pacientes recuperados de Covid-19 ainda estava em ecoestados insalubres. No entanto, a diversidade mostrou uma tendência de aumento em pacientes recuperados em comparação com pacientes com Covid-19 durante a fase aguda, sugerindo que os microbiomas em disbiose progrediram para microbiomas saudáveis após a eliminação do SARS-CoV-2.

Em outra análise realizada através do Dendograma de *Cluster* (Figura 14) podemos observar o quão distante os resultados da amostra do paciente grave (GV1) estão em relação aos demais pacientes.

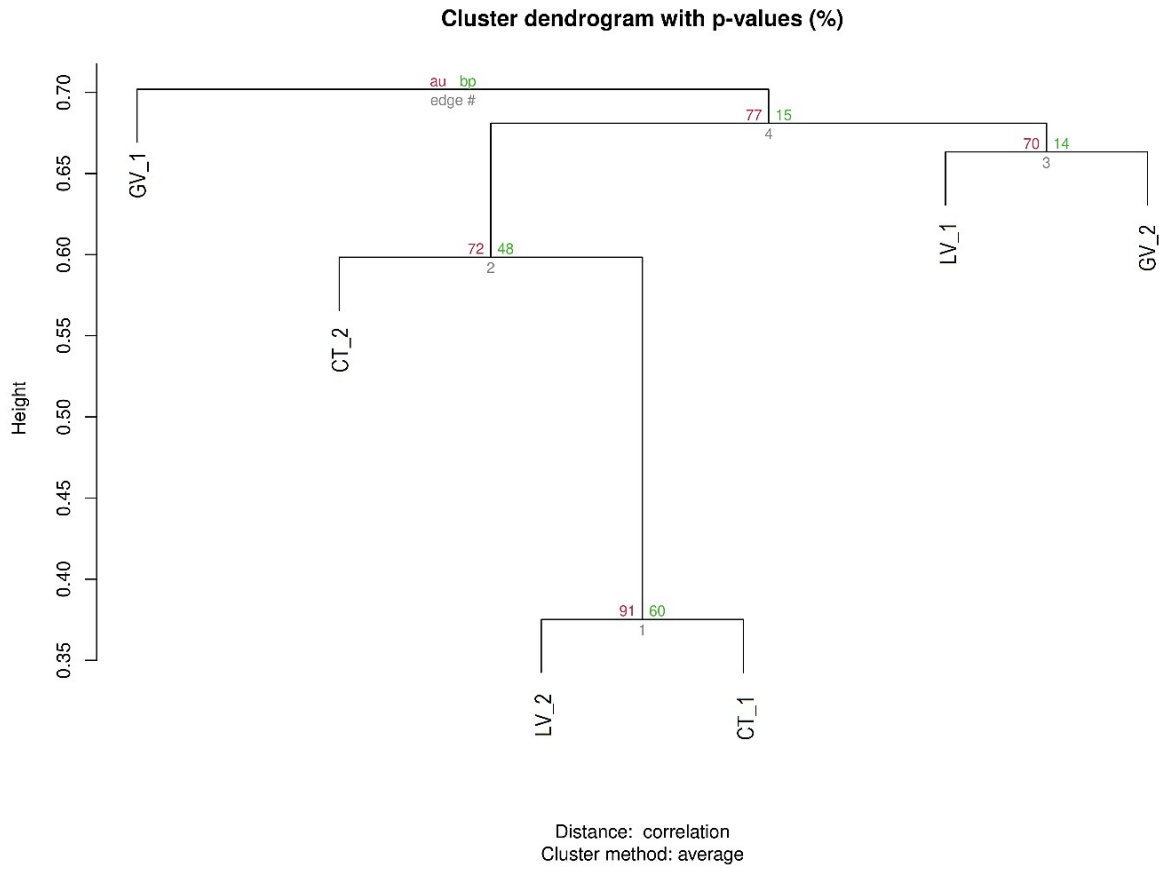
Ao avaliarmos a representação dos resultados no dendrograma, pode ser observado uma correlação de similaridade maior entre os pacientes LV2 e CT1. Outra similaridade avaliada foi com relação aos pacientes LV1 e GV2. Esses resultados podem sugerir que a diversidade do microbioma levando em consideração grupos taxonômicos distintos, são filogeneticamente mais próximos entre pacientes leves e controle, e o paciente com sintomas graves mais jovem, o que corroboram com os dados discutidos, ou seja, a Covid-19 pode favorecer uma diferença no perfil do microbioma, preferencialmente para grupos taxonômicos causadores de danos para a saúde do paciente.

O baixo n amostral do presente estudo impede traçar um parâmetro na observação da clusterização da figura 14. Os agrupamentos formados pelas amostras podem facilmente sofrer alterações devido ao estilo de vida e tratamentos condicionados a hospitalização de cada paciente.

As informações de abundância referentes ao Filo demonstraram alto percentual de Firmicutes em todas as amostras. Foram identificados nos pacientes graves (GV1 e GV2) a presença do Filo Euryarchaeota (Figura 15). Os pacientes graves também apresentaram um percentual inferior de bactérias do filo Bacteroidota em relação aos demais pacientes enquanto o paciente com sintomas leves (LV1) apresentou o percentual mais elevado deste Filo de bactérias. Os principais Filos de bactérias encontradas foram Firmicutes, Bacteroidota, Actinobacteriota, Proteobacteria, Desulfobacterota e Cyanobacteria e de Archaea foi Euryarchaeota. Através da leitura do gráfico pode-se observar como é distribuída a maior diversidade de microorganismos nos pacientes controle em relação aos demais pacientes infectados com a Covid-19.

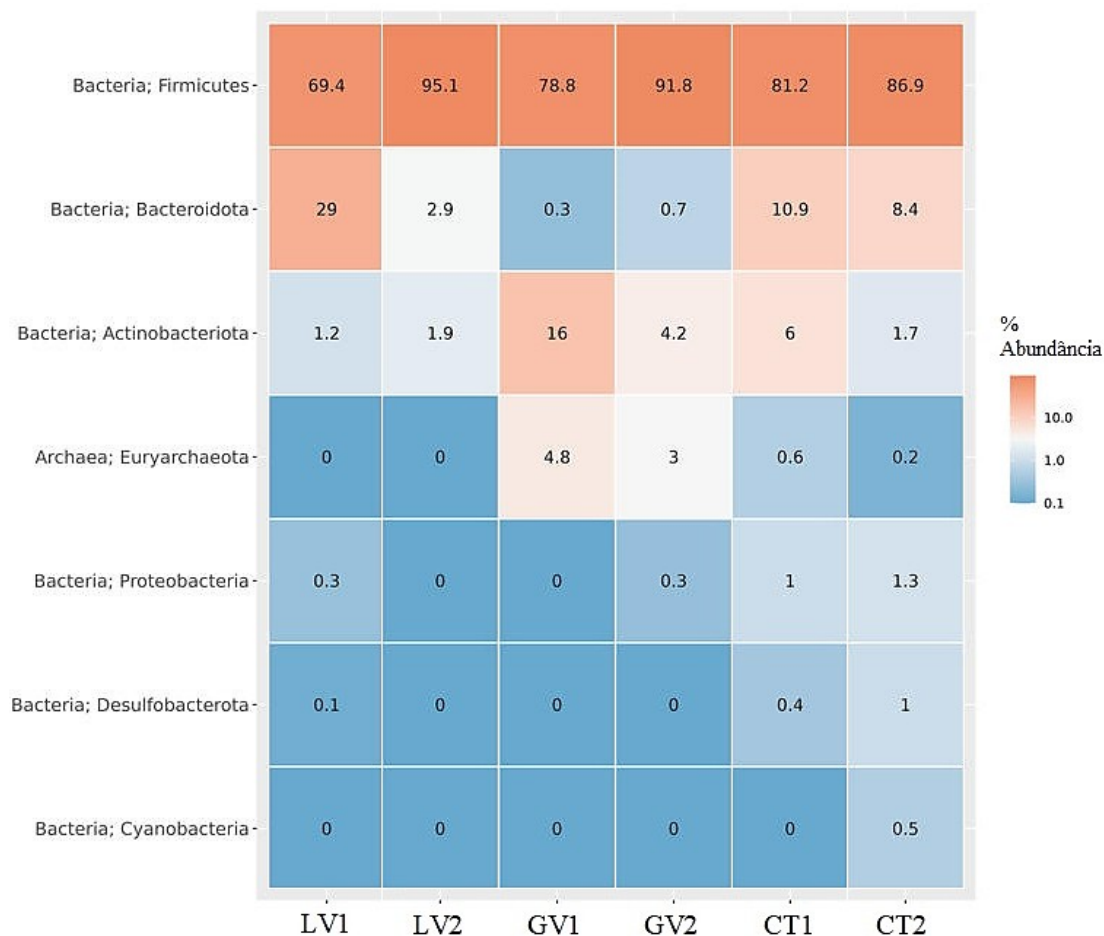


**Figura 14.** Dendrograma de *cluster*



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

**Figura 15.** Percentual dos Filos encontrados nas amostras

**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

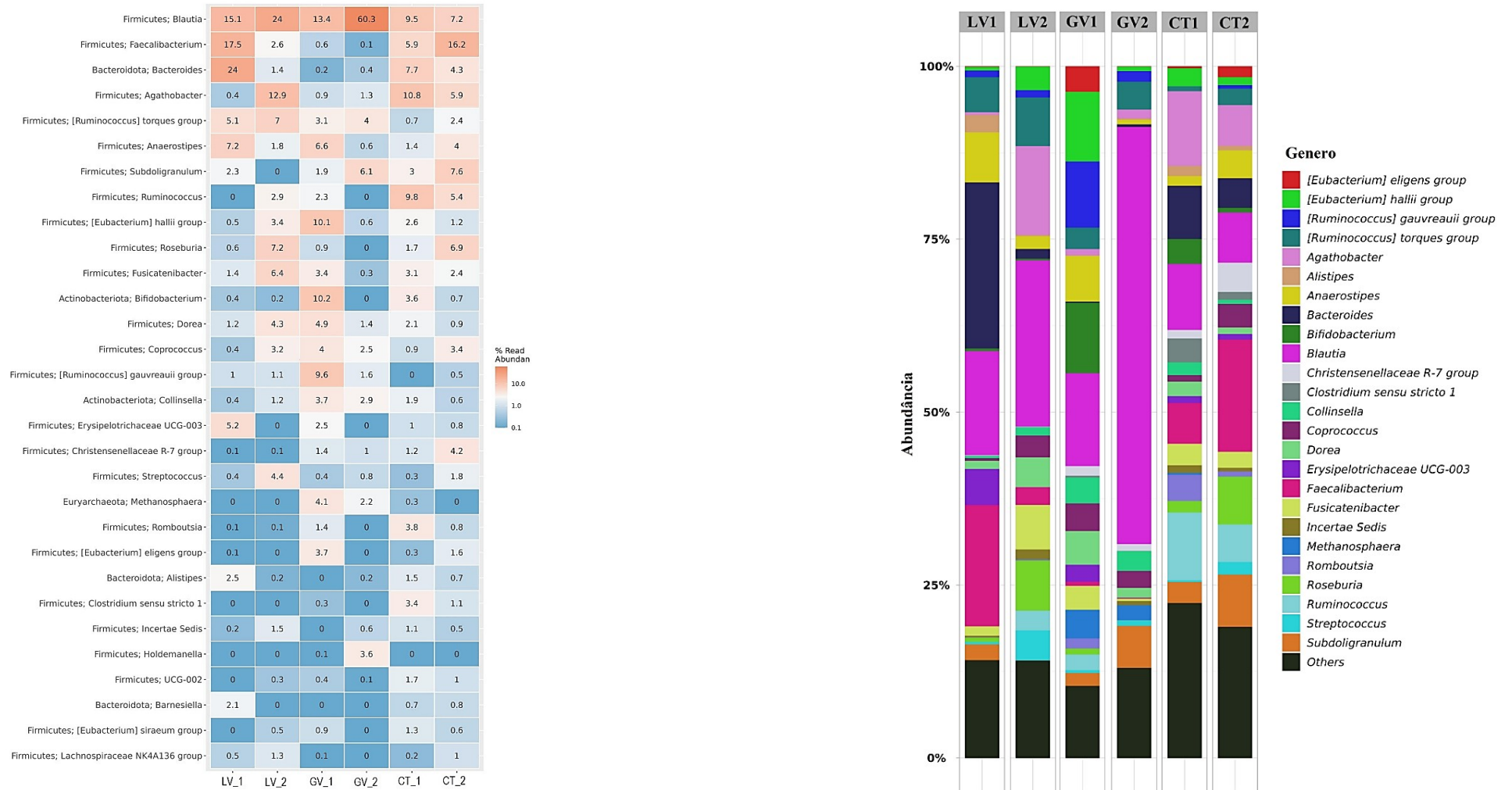
Os pacientes controles (CT1 e CT2) apresentaram percentuais de representantes de bactérias do Filo Desulfobacterota (CT1: 0,4% e CT2: 1%) enquanto os pacientes acometidos pela Covid-19, com sintomas graves, neste estudo não apresentaram valores percentuais aparentes do Filo. Além disso, nos pacientes controles também apresentaram um percentual maior de Proteobacteria em relação as outras amostras avaliadas (CT1: 1% e CT2: 0,5%). Em estudo conduzido por Oliveira *et al*, 2020, pode-se observar que a presença de Bacteroidetes foi maior que Firmicutes (OLIVEIRA *et al*, 2020). Os autores constataram alterações na microbiota intestinal devido a uma menor absorção de aminoácidos neutros acompanhada por um consequente aumento do comprimento das vilosidades intestinais. A disbiose intestinal demonstra claramente que a desregulação afeta o microbioma (OLIVEIRA *et al*, 2020). Em outro estudo também foi observado a associação positiva

na abundância relativa do Filo Firmicutes, e uma associação negativa na abundância relativa do Filo Proteobacteria na presença de Covid-19 (O'DWYER *et al*, 2019).

Outro estudo com 30 pacientes com Covid-19 encontrou uma abundância relativa significativamente maior dos filos Actinobacteria e Firmicutes em comparação com 24 pacientes com infecção por influenza H1N128 (GU *et al*, 2020). No presente estudo podemos observar que a presença de um percentual maior do filo Firmicutes está presente nos resultados das amostras dos pacientes com idade maior (LV2; GV2; CT2), enquanto os pacientes mais novos possuem percentuais menores da presença deste filo. Tanto para o filo Firmicutes quanto para os outros filos apresentados, não foi possível traçar um parâmetro específico que evidencie grandes mudanças pela presença da Covid-19 devido ao baixo número de pacientes.

Na categoria de gênero foram identificados 25 tipos diferentes de gêneros (Figura 16). Houve um percentual considerável de gêneros que não foram identificados através das metodologias adotadas neste estudo, sobretudo nas amostras dos pacientes controle, chegando próximo a 25% dos microrganismos.

Figura 16. Abundância de gêneros encontrados nas amostras



Fonte: Do autor, 2023.

**Legenda:** A e B representação percentual dos gêneros na microbiota dos pacientes; LV1 e LV2 Paciente com sintomas leves; GV1 e GV2 Pacientes com sintomas graves; CT1 e CT2 Grupo controle, sem a presença da doença.

O microbioma dos pacientes com Covid-19 tem menos biodiversidade do que o das pessoas saudáveis, e o microbioma das pessoas saudáveis é muito mais rico do que o dos pacientes com Covid-19 (MADDAH *et al*, 2023). Estudos recentes em pequenos grupos de pacientes com Covid-19 identificaram uma grande disbiose do microbioma intestinal, com enriquecimento por bactérias oportunistas (*Coprobacillus*, e espécies de *Clostridium*) e esgotamento de simbiontes benéficos (*Faecalibacterium*) que são correlacionada positivamente e inversamente com a gravidade da Covid-19 (SCALDAFERRI *et*, 2020). Esta correlação pode ser observada no presente estudo, uma vez que os pacientes com sintomas graves (GV1 e GV2) possuem valores diminuídos de *Faecalibacterium* (0,6% GV1 e 0,1% GV2) quando comparados aos demais pacientes, níveis de 17,5% de *Faecalibacterium* foram constatados no paciente LV1, destacando a discrepância entre os valores encontrados nas diferentes amostras.

Uma das bactérias prevalentes e dominantes na microbiota intestinal de pessoas saudáveis é a *F. prausnitzii*, considerada um indicador de saúde gastrointestinal (MIQUEL *et al*, 2013). Com base nas evidências, um desequilíbrio na composição desta espécie bacteriana está correlacionado com diversas doenças; ainda, descobriram que havia uma correlação negativa entre a abundância de *F. prausnitzii* e a gravidade de Covid-19 (HE *et al*, 2021). Além disso, Zuo *et al*, (2020), relataram que *F. prausnitzii* foi uma das espécies bacterianas mais importantes que mostrou uma associação inversa com a gravidade do Covid-19 (HE *et al*, 2021; ZUO *et al*, 2020).

Em outro estudo, foi observada uma correlação inversa entre a abundância de Bacteroides e a carga de SARS-Co-V2 no material fecal durante o curso da hospitalização de pacientes. Recentemente, houve relatos de partículas virais viáveis nas fezes, embora o significado e o impacto destas partículas virais no microbioma intestinal e na transmissão da infecção não sejam conhecidos (BRETT FINLAY *et al*, 2021). A presença de Bacteroidetes também foi encontrada reduzida nos pacientes GV1 e GV2 (0,2% e 0,4% respectivamente) desta pesquisa.

Através do gráfico pode-se observar que o paciente grave (GV2) apresentou um percentual elevado de *amplicons* pertencentes ao gênero *Blautia*, chegando a quase o dobro da quantidade que os demais pacientes apresentaram. Ambos pacientes graves (GV1 e GV2) tiveram valores percentuais de bacteroides diminuídos quando comparados aos demais pacientes.

Li *et al*, (2021) relataram que *Bifidobacterium* sp. diminuiu significativamente nas amostras fecais de pacientes com Covid-19. Eles confirmaram que as respostas imunológicas do paciente Covid-19 ao SARS-CoV-2 foram melhoradas com o aumento do nível desta bactéria e de seu metabólito inosina. Este estudo ilustrou a relação entre o microbioma intestinal e o Covid-19. Consequentemente, considerando o papel crítico do microbioma intestinal no sistema imunológico e

na saúde humana, estudos e ensaios clínicos utilizando probióticos benéficos como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* para enriquecer e reforçar a composição do microbioma intestinal podem ser avaliados para a prevenção e tratamento de Covid-19 pacientes (LI *et al*, 2021).

#### 4.3. Perfil funcional da comunidade microbiana associada aos pacientes com Covid-19

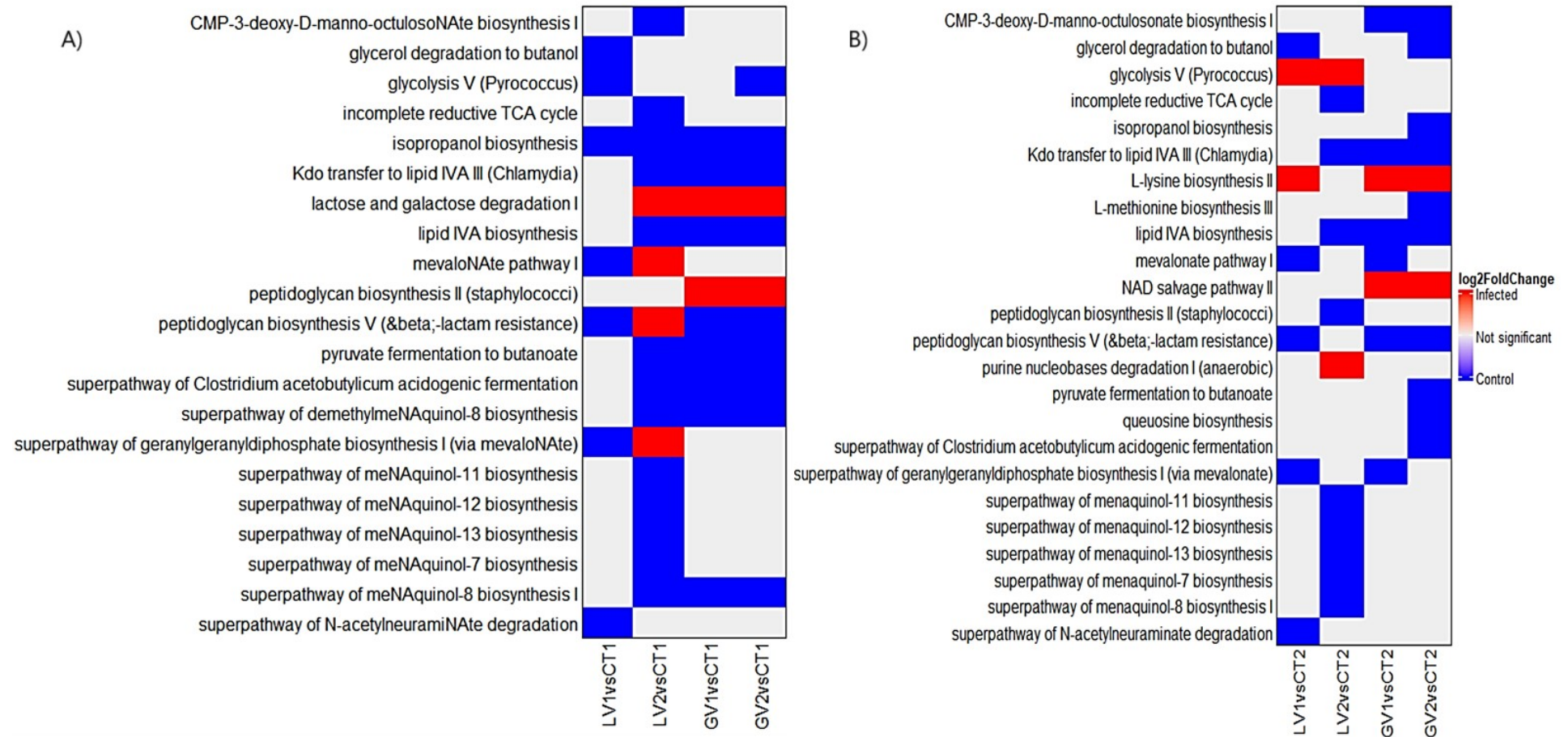
Através dos dados alcançados pelo *Metabarcoding*, pode ser realizado uma análise das vias funcionais relacionadas aos grupos de microbianos identificados. Através da ferramenta Picrust2 pôde-se identificar e correlacionar diversas enzimas e suas possíveis funções e alterações no organismo.

Os seguintes dados foram obtidos a partir do Picrust2: Kegg function, Ec function e MetaCyc function (contém vias envolvidas no metabolismo primário e secundário, bem como metabólitos, reações, enzimas e genes associados).

Foi relatado que a composição da microbiota do hospedeiro reflete a gravidade da doença e as respostas imunes disfuncionais em pacientes com Covid-19, e que os microrganismos intestinais estão provavelmente envolvidos na modulação das respostas inflamatórias do hospedeiro (HAIMINEN *et al*, 2021).

A análise das principais vias metabólicas (Figura 17) demonstrou uma produção mais atenuada da L-isoleucina (PWY-5103) pelo paciente com sintomas graves da Covid-19 (GV2 36515,60 sequências) em relação aos demais pacientes analisados (LV1 32393,99 sequências e CT1 32343,29 sequências). Já as vias Glutaryl-CoA degradation (PWY-3001) e D-galacturonate degradation I (GALACTUROCAT-PWY), responsáveis pela síntese do butirato, demonstraram valores baixos nas amostras do paciente com Covid-19 grave (GV2: 22,05 e 7385,05, sequências respectivamente).

**Figura 17.** Vias microbianas correlacionadas com a gravidade da Covid-19



Fonte: Do autor, 2023.

**Legenda:** A) Comparação entre os pacientes com sintomas Leves e Controle 1 (LV1 vs CT1) (LV2 vs CT1); Pacientes com sintomas graves e o Controle (GV1 vs CT1) (GV2 vs CT1).; B) Comparação entre os pacientes com sintomas Leves e Controle 2 (LV1 vs CT2) (LV2 vs CT2); Pacientes com sintomas graves e o Controle (GV1 vs CT2) (GV2 vs CT2).

Ácidos graxos de cadeia curta são produtos da fermentação anaeróbica de fibras alimentares e estão envolvidos na prevenção e tratamento de doenças intestinais. Alguns desses produtos, incluindo butirato, juntamente com propionato e acetato, podem exercer efeitos anti-inflamatórios por meio da ativação de células imunológicas anti-inflamatórias e inibição de vias de sinalização inflamatória (YAO *et al*, 2022). Além disso, butirato pode manter a integridade da barreira intestinal para evitar translocações e circulação intestinal endotoxinas e bactérias, reduzindo assim as respostas inflamatórias sistêmicas (GEIRNAERT *et al*, 2017).

Outros fatores predominantemente diminuídos nas amostras do paciente grave GV2 foram as vias relacionadas a PWY-1269 CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate biosynthesis I (GV2 343,94 sequências) e PWY-7220 adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II (GV2 21844,85 sequências), vias cuja subclasse corresponde a Sugar nucleotide biosynthesis. Além disso, a via PWY-4984 urea cycle (GV2 23,73 sequências) cuja subclasse corresponde a Nitrogen compound metabolismo.

Recentemente, descobriu-se que o butirato protege o hospedeiro da infecção viral por meio de genes reguladores negativos essenciais para a infecção por SARS-CoV-2, como a enzima conversora de angiotensina (BRUCHEZ *et al*, 2020). Existem quatro vias principais conhecidas para a produção de butirato, as vias de acetil-CoA, glutarato, 4-aminobutirato e lisina (VITAL *et al*, 2014).

As análises das vias Glutaryl-CoA degradation (PWY-3001) e D-galacturonate degradation I (GALACTUROCAT-PWY), responsáveis pela síntese do butirato, demonstraram valores baixos nas amostras do paciente com Covid-19 grave (PAC3 22,05 e 7385,05, respectivamente) quando comparados aos valores encontrados para os demais pacientes.

Zhang *et al*, (2022) reforçaram evidências da diminuição das vias de produção de ácidos graxos de cadeia curta associada a Covid-19 em pacientes graves, além da diminuição dos níveis de butirato fecal e aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL10 e quimiocina CXCL-10, o que destaca a importância da via dos ácidos graxos de cadeia curta na patogênese da Covid-19 e na gravidade da doença.

Estudos recentes mostraram que a L-isoleucina pode induzir a expressão de peptídeos de defesa do hospedeiro (ou seja, b-defensinas) que podem regular a imunidade inata e adaptativa do hospedeiro e aliviar os efeitos prejudiciais de patógenos em humanos e animais (MAO *et al*, 2018). No presente estudo, pode-se constatar uma produção mais atenuada da L-isoleucina (PWY-5103) pelo paciente com sintomas graves da Covid-19 (PAC3 36515,60) em relação aos demais pacientes analisados.



Esses resultados denotam que a L-isoleucina produzida pela microbiota intestinal pode aliviar a gravidade do Covid-19 modulando a resposta imune do hospedeiro à infecção por SARS-COV-2) (ABUMOH'D *et al*, 2020). Além disso, a L-isoleucina é um dos aminoácidos de cadeia ramificada considerado um suplemento nutricional para melhorar a fadiga central e muscular, aumentando a concentração sérica de substâncias fatigantes (lactato, amônia e 5-HT), metabólitos energéticos (glicose e ácidos graxos livres) e substâncias para dor muscular (LDH e creatina quinase) (HORMOZNEJAD *et al*, 2019).

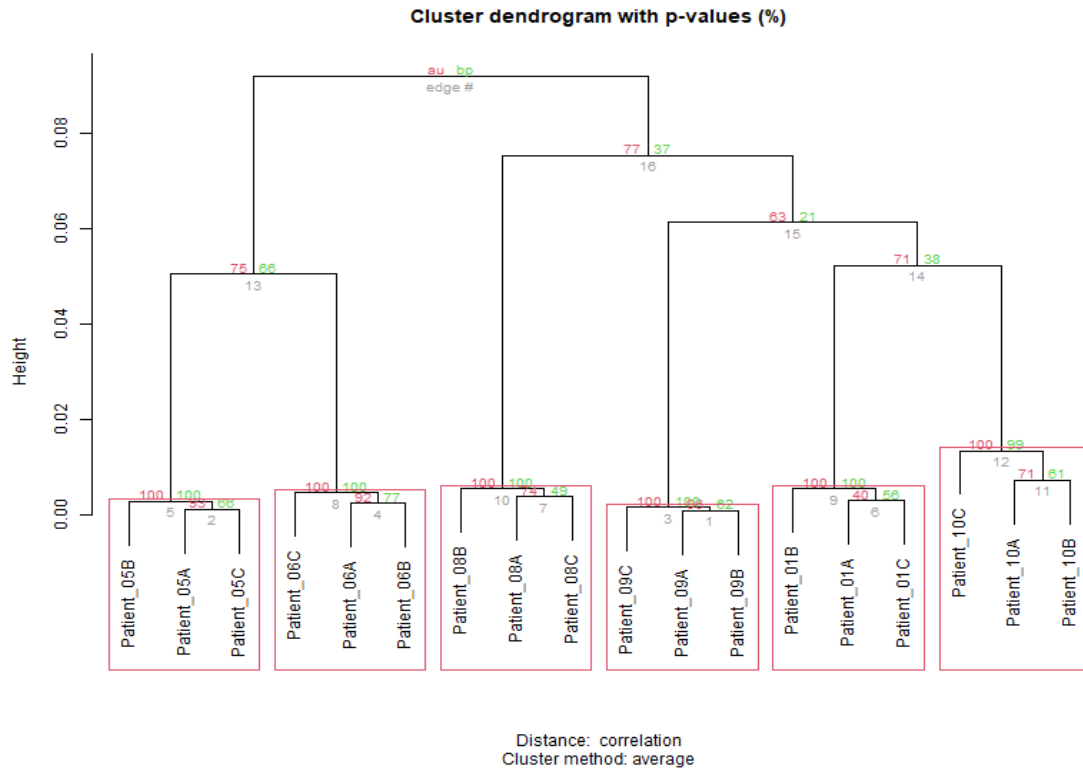
A depleção da *Faecalibacterium prausnitzii*, uma das bactérias anaeróbias mais abundantes na microbiota intestinal humana, contribuiu principalmente para a capacidade prejudicada da biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta e L-isoleucina em pacientes com Covid-19, o que contribui para a progressão da doença e ressalta o importante papel dessa bactéria no Covid-19 (PARSAEI *et al*, 2021; ZHANG *et al*, 2022).

Outros fatores predominantemente diminuídos nas amostras do paciente GV2 foram as vias relacionadas a PWY-1269 CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate biosynthesis I (343,94 sequências) e PWY-7220 adenosine deoxyribonucleotides de novo biosynthesis II (21844,85 sequências), vias cuja subclasse corresponde a Sugar nucleotide biosynthesis. Além disso, a via PWY-4984 urea cycle cuja subclasse corresponde a Nitrogen compound metabolismo, também foram encontradas em níveis mais baixos nos pacientes com sintomas graves da Covid-19.

A composição da microbiota intestinal foi correlacionada com as concentrações plasmáticas de citocinas inflamatórias e parâmetros sanguíneos, como PCR, lactato desidrogenase, aspartato aminotransferase e gama-glutamil transferase (YEOH *et al*, 2021). Estes dados em conjunto sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 pode causar alterações imunofisiopatológicas no hospedeiro humano, incluindo o intestino, resultando em mudanças graduais na ecologia microbiana intestinal em relação à gravidade da doença (ZUO *et al*, 2021).

Através da figura 18 podemos observar a correlação entre os pacientes graves da doença e suas respectivas floras funcionais detectadas, neles podemos encontrar mais divergências quando comparados aos demais pacientes, pertencendo a um grupo separado. Os pacientes com sintomas leves e os pacientes controle, sem Covid-19, apresentaram maior similaridade, destacando que os pacientes mais velhos (LV2 e CT2) ficaram mais próximos, enquanto os pacientes mais jovens (LV1 e CT2) pertenceram a um grupo isolado com suas próprias características funcionais.

**Figura 18. Clusterização dos dados obtidos com a atividade funcional**



**Fonte:** Do autor, 2023.

**Legenda:** Patient 5 (GV1); Patient 6 (GV2); Patient 8 (LV2); Patient 9 (CT2); Patient 1 (LV1); Patient 10 (CT1).

A clusterização dos resultados obtidos nos permite observar o quão distante os pacientes graves ficaram em relação aos demais. Ainda não está claro qual o papel que o microbioma intestinal desempenha na regulação da gravidade da Covid-19 em pacientes hospitalizados e quais mecanismos específicos mediados pelos micro-organismos podem estar subjacentes a esta relação. (NGUYEN *et al*, 2023). Os agrupamentos formados pela clusterização enfatizam a necessidade de entender mais a fundo as mudanças na microbiota fecal.

## 5. CONCLUSÃO

As análises documentadas neste estudo revelam a diferença de diversidade microbiana nos pacientes com e sem COVID-19. Além dos representantes doentes de diferentes faixas etárias, os pacientes apresentavam diferentes gravidades em relação à doença. Com a ferramenta do *Metabarcoding*, foi possível evidenciar como a Covid de fato impacta negativamente na diversidade da microbiota intestinal, através da análise de amostras de fezes.

As pesquisas nos bancos de dados da literatura revelaram uma certa complexidade para encontrar correlação das arqueias com doenças infecciosas, especialmente as de origem viral. Este estudo apresenta uma diferença notável entre a presença de arqueias nos diferentes pacientes, enfatizando sua correlação com aspectos da doença que devem ser investigados mais a fundo, tendo em vista que ainda se sabe muito pouco sobre o papel exercido das arqueias nas doenças, como é o caso da Covid-19.

Este estudo apresenta diversas limitações que devem ser levadas em consideração na interpretação dos resultados. Em primeiro lugar, o tamanho da amostra de 4 pacientes com Covid-19 e 2 pacientes controle é pequeno e não pode ser representativo da população em geral. Além disso, o estudo utilizou apenas as amostras das fezes de pacientes para analisar as alterações da microbiota intestinal, que pode não capturar todos os táxons bacterianos presentes no intestino. O fato do grupo controle também incluir pacientes sob internação, ainda que não seja por COVID-19, colabora para alterações detectadas neste estudo que não puderam ser totalmente elucidadas. Portanto, estudos futuros com amostras maiores, grupos controle totalmente saudáveis, e utilizando técnicas mais avançadas, como estudos de metagenômica associado a proteômica, são necessários para confirmar esses achados e investigar os mecanismos subjacentes às associações da microbiota funcional observadas.

## 6. REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ABOUSHANAB, A. A.. *A predictive model for geographical location using microbiome composition and Covid-19 based analysis*. Dissertação (Mestrado) - AUC (American University in Cairo), Cairo/Egito, 2022. Disponível em: <<https://fount.aucegypt.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=2907&context=etds>>. Acesso em: 05 mar. 2023.

ABUMOH'D, M. F.; MATALQAH, L.; AL-ABDULLA, Z.. *Effects of Oral Branched-Chain Amino Acids (BCAAs) intake on muscular and central fatigue during an incremental exercise*. *Journal of Human Kinetics*, v. 72, n. 01, p. 69-78, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7126259/>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

AHN, D. G.; SHIN, H. J.; KIM, M. H.; LEE, S.; KIM, H. S.; MYOUNG, J.; KIM, B. T.; KIM, S. J. *Current status of epidemiology, diagnosis, therapeutics, and vaccines for novel coronavirus disease 2019 (Covid-19)*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 30, n. 03, p. 313-324, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32238757/>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

ALSOBAIE, S.. *Understanding the molecular biology of SARS-CoV-2 and the Covid-19 pandemic: a review*. *Infection and Drug Resistance*, vol. Volume 14, p. 2259-2268, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8215902/>>. Acesso em: 15 set. 2023.

AMICO, F. D.; BAUMGART, D. C.; DANESE, S.; PEYRIN-BIROULET, L.. *Diarrhea During Covid-19 Infection: Pathogenesis*. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, n. may, p. 01-10, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32278065/>>. Acesso em: 15 set. 2023.

ARAOS, R.; D'AGATA, E. M. C.. *The human microbiota and infection prevention*. *Infection Control and Hospital Epidemiology*, v. 40, n. 05, p. 585-589, 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30777586/>>. Acesso em: 15 jun. 2023.

ARDISSONE, A. N.; DE LA CRUZ, D. M.; DAVIS-RICHARDSON, A. G.; REHCIGL, K. T.; LI, N.; DREW, J. C.; MURGAS-TORRAZZA, R.; SHARMA, R.; HUDAK, M. L.; TRIPLETT, E. W.; NEU, J.. *Meconium microbiome analysis identifies bacteria correlated with premature birth*. *PLoS ONE*, v. 09, n. 03, p. 01-08, 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24614698/>>. Acesso em: 15 set. 2023.

ARON, J.; MUELLBAUER, J.; GIATTINO, C.; RITCHIE, H.. *A pandemic primer on excess mortality statistics and their comparability across countries*. [s.l.]: OurWorldInData.org, 2021. Disponível em: <<https://ourworldindata.org/covid-excess-mortality>> Disponível em: <<https://ourworldindata.org/Covid-vaccinations>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

BELINGHERI, M.; PALADINO, M. E.; RIVA, M. A.. *Covid-19: Health prevention and control in non-healthcare settings*. *Occupational Medicine*, v. 70, n. 02, p. 82-83, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32311040/>>. Acesso em: 15 set. 2023.

BILEZIKIAN, J. P.; BINKLEY, N.; DE LUCA, H. F.; FASSIO, A.; FORMENTI, A. M.; FULEIHAN, G. E. H.; HEIJBOER, A. C.; GIUSTINA, A.. *Consensus and controversial aspects of vitamin D and Covid-19. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, v. 108, n. 05, p. 1034-1042, 2023. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36477486/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

BLUMENTHAL, K. G.; GREENHAWT, M.; PHILLIPS, E. J.; AGMON-LEVIN, N.; GOLDEN, D. B. K.; SHAKER, M.. *An update in Covid-19 vaccine reactions in 2023: progress and understanding. Journal of Allergy and Clinical Immunology: in Practice*, v. 11, n. 11, p. 3305-3318, 2023. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37414339/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

BRANN, D. H.; TSUKAHARA, T.; WEINREB, C.; LIPOVSEK, M.; VAN DEN BERGE, K.; GONG, B.; CHANCE, R.; MACAULAY, I. C.; CHOU, H. J.; FLETCHER, R. B.; DAS, D.; STREET, K.; DE BEZIEUX, H. R.; CHOI, Y. G.; RISSO, D.; DUDOIT, S.; PURDOM, E.; MILL, J.; HACHEM, R. A.; DATTA, S. R.. *Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying Covid-19-associated anosmia. Science Advances*, v. 06, n. 31, p. 01-29, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32937591/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Covid-19, vacinação e doses aplicadas**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: < [https://qsprod.saude.gov.br/extensions/DEMAS\\_C19Vacina/DEMAS\\_C19Vacina.html](https://qsprod.saude.gov.br/extensions/DEMAS_C19Vacina/DEMAS_C19Vacina.html) >. Acesso em: 29 jul. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Governo do Estado do Paraná. Vacinômetro Paraná – COBERTURA VACINAL - Covid-19**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2021. Disponível em: < <http://bi.pr.gov.br/Covid/index.html> >. Acesso em: 30 jul. 2021.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Painel de casos de doença pelo coronavírus 2019 (Covid-19) no Brasil pelo Ministério da Saúde**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: < <https://Covid.saude.gov.br> >. Acesso em: 16 nov. 2023.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Nota Técnica nº. 06/2023-CGVDI/DIMU/SVSA/MS**. Brasília/DF: Ministério da Saúde, 2023. Disponível em: < <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/coronavirus/notas-tecnicas/2023/nota-tecnica-no-6-2023-cgvdi-dimu-svsa-ms/view> >. Acesso em: 14 fev. 2023.

BRETT FINLAY, B.; AMATO, K. R.; AZAD, M.; BLASER, M. J.; BOSCH, T. C. G.; CHU, H.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; EHRLICH, S. D.; ELINAV, E.; GEVA-ZATORSKY, N.; GROS, P.; GUILLEMIN, K.; KECK, F.; KOREM, T.; MCFALL-NGAI, M. J.; MELBY, M. K.; NICTER, M.; PETTERSSON, S.; POINAR, H.; ... GILES-VERNICK, T.. *The hygiene hypothesis, the Covid pandemic, and consequences for the human microbiome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 118, n. 06, p. 01-09, 2021. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-1039673> >. Acesso em: 15 set. 2023.

BROWN, S. P.; CORNFORTH, D. M.; MIDEO, N.. *Evolution of virulence in opportunistic pathogens: Generalism, plasticity, and control. Trends in Microbiology*, v. 20, n. 07, p. 336-342, 2012. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22564248/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

BRUCHEZ, A.; SHA, K.; JOHNSON, J.; CHEN, L.; STEFANI, C.; MCCONNELL, H.; GAUCHERAND, L.; PRINS, R.; MATREYEK, K. A.; HUME, A. J.; MÜHLBERGER, E.; SCHMIDT, E. V.; OLINGER, G. G.; STUART, L. M.; LACY-HULBERT, A.. *MHC class II transactivator CIITA induces cell resistance to ebola virus and SARS-like coronaviruses. Science*, v. 370, n. 6513, p. 241-247, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7665841/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

BURKI, T.. *No end in sight for the Brazilian Covid-19 crisis. The Lancet Microbe*, v. 02, n. 05, p. e180, 2021. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8096319/>>. Acesso em: 08 nov. 2023.

BUSH, A.; COMPSON, Z. G.; MONK, W. A.; PORTER, T. M.; STEEVES, R.; EMILSON, E.; GAGNE, N.; HAJIBABAEI, M.; ROY, M.; BAIRD, D. J.. *Studying ecosystems with DNA metabarcoding: lessons from biomonitoring of aquatic macroinvertebrates. Frontiers in Ecology and Evolution*, v. 07, n. november, p. 01-12, 2019. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2019.00434/full>>. Acesso em: 05 dez. 2023.

BUSH, A.; SOLLMANN, R.; WILTING, A.; BOHMANN, K.; COLE, B.; BALZTER, H.; MARTIUS, C.; ZLINSZKY, A.; CALVIGNAC-SPENCER, S.; COBBOLD, C. A.; DAWSON, T. P.; EMERSON, B. C.; FERRIER, S.; GILBERT, M. T. P.; HEROLD, M.; JONES, L.; LEENDERTZ, F. H.; MATTHEWS, L.; MILLINGTON, J. D. A.; YU, D. W.. *Connecting Earth observation to high-throughput biodiversity data. Nature Ecology and Evolution*, v. 01, n. 07, p. 01-09, 2017. Disponível em: <<https://research-portal.uea.ac.uk/en/publications/connecting-earth-observation-to-high-throughput-biodiversity-data>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

CHAN, J. F. W.; YUAN, S.; KOK, K. H.; TO, K. K. W.; CHU, H.; YANG, J.; XING, F.; LIU, J.; YIP, C. C. Y.; POON, R. W. S.; TSOI, H. W.; LO, S. K. F.; CHAN, K. H.; POON, V. K. M.; CHAN, W. M.; IP, J. D.; CAI, J. P.; CHENG, V. C. C.; CHEN, H.; YUEN, K. Y.. *A familial cluster of pneumonia associated with the 2019 novel coronavirus indicating person-to-person transmission: a study of a family cluster. The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 514-523, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31986261/>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

CHENG, X.; ZHANG, Y.; LI, Y.; WU, Q.; WU, J.; PARK, S.-K.; GUO, C.; LU, J.. *Meta-analysis of 16S rRNA microbial data identified alterations of the gut microbiota in Covid-19 patients during the acute and recovery phases. BMC Microbiology*, v. 22, n. 01, p. 01-13, 2022. Disponível em: <<https://bmcmicrobiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12866-022-02686-9>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

CHEONG, K.; CHEN, S.; TENG, B.; VEERAPERUMAL, S.; ZHONG, S.; TAN, K.. *Oligosaccharides as potential regulators of gut microbiota and intestinal health in post-Covid-19 management. Pharmaceuticals (Basel)*, n. 09, v. 16, suppl. 06, p. 860, jun., 2023. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375807/>>. Acesso em: 08 nov. 2023.

CHHIBBER-GOEL, J.; GOPINATHAN, S.; SHARMA, A.. *Interplay between severities of Covid-19 and the gut microbiome: implications of bacterial co-infections?*. **Gut Pathogens**, v. 13, n. 01, p. 01-06, 2021. Disponível em: <<https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-1105734>>. Acesso em: 10 out. 2023.

DE MARTINO, S. J.; MAHOUDEAU, I.; BRETTESS, J. P.; PIEMONT, Y.; MONTEIL, H.; JAULHAC, B.. *Peripartum bacteremias due to Leptotrichia amnionii and Sneathia sanguinegens, rare causes of fever during and after delivery*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 12, p. 5940-5943, 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15583348/>>. Acesso em: 08 nov. 2023.

DEBOURDEAU, A.; VITTON, V.; BARTHET, M. A.; GONZALEZ, J. M.. *If pneumatic dilation is not enough efficient for post fundoplication dysphagia, is per Oral Endoscopic Myotomy a good answer to manage it?*. **Gut**, v. 71, n. 01, p. 221-222, 2022. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33785553/>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

DEL RIO, C.; MALANI, P. N.. *Covid-19 - new insights on a rapidly changing epidemic*. **Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 14, p. 1339-1340, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32108857/>>. Acesso em: 10 out. 2023.

DHAR, D.; MOHANTY, A.. *Gut microbiota and Covid-19- possible link and implications*. **Virus Research**, v. 285, n. may, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32430279/>>. Acesso em: 22 nov. 2022.

DOUGLAS GM, MAFFEI VJ, ZANEVELD JR, YURGEL SN, BROWN JR, TAYLOR CM, HUTTENHOWER, C.; LANGILLE, M. G. I.. *PICRUSt2 for prediction of metagenome functions*. **Nat. Biotechnol.**, n. 38, v. 06, pp. 685-688, jun., 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32483366/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

FOZ DO IGUAÇU. **Painel coronavírus: vigilância epidemiológica de Foz do Iguaçu**. Foz do Iguaçu: PMFI, 2023. Disponível em: <<https://datastudio.google.com/u/0/reporting/9c4e18e4-68c3-425c-a656-20fe415adeea/page/2CmaB>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

GEIRNAERT, A.; CALATAYUD, M.; GROOTAERT, C.; LAUKENS, D.; DEVRIESE, S.; SMAGGHE, G.; DE VOS, M.; BOON, N.; VAN DE WIELE, T.. *Butyrate-producing bacteria supplemented in vitro to Crohn's disease patient microbiota increased butyrate production and enhanced intestinal epithelial barrier integrity*. **Scientific Reports**, v. 07, n. 01, p. 01-14, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28904372/>>. Acesso em: 08 jul. 2023.

GROVES, H. T.; HIGHAM, S. L.; MOFFATT, M. F.; COX, M. J.; TREGONING, J. S.. *Respiratory viral infection alters the gut microbiota by inducing inappetence*. **mBio**, v. 11, n. 01, p. 01-17, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32071269/>>. Acesso em: 05 dez. 2023.

GU, S.; CHEN, Y.; WU, Z.; CHEN, Y.; GAO, H.; LV, L.; GUO, F.; ZHANG, X.; LUO, R.; HUANG, C.; LU, H.; ZHENG, B.; ZHANG, J.; YAN, R.; ZHANG, H.; JIANG, H.; XU, Q.; GUO,

J.; GONG, Y.; LI, L.. *Alterations of the gut microbiota in patients with coronavirus disease 2019 or H1N1 influenza. Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 10, p. 2669-2678, 2020. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-526923> >. Acesso em: 02 out. 2022.

HAIMINEN, N.; UTRO, F.; SEABOLT, E.; PARIDA, L.. *Functional profiling of Covid-19 respiratory tract microbiomes. Scientific Reports*, v. 11, n. 01, p. 01-08, 2021. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/s41598-021-85750-0> >. Acesso em: 10 out. 2023.

HALL, A. B.; TOLONEN, A. C.; XAVIER, R. J.. *Human genetic variation and the gut microbiome in disease. Nature Reviews Genetics*, v. 18, n. 11, p. 690-699, 2017. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28824167/> >. Acesso em: 02 out. 2022.

HAMAD, I.; SOKHNA, C.; RAOULT, D.; BITTAR, F.. *Molecular detection of eukaryotes in a single human stool sample from senegal. PLoS ONE*, v. 07, n. 07, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22808282/> >. Acesso em: 10 fev. 2023.

HE, X.; ZHAO, S.; LI, Y.. *Faecalibacterium prausnitzii: a next-generation probiotic in gut disease improvement. Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, v. 2021, 2021. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/349852136\\_Faecalibacterium\\_prausnitzii\\_A\\_Next-Generation\\_Probiotic\\_in\\_Gut\\_Disease\\_Improvement](https://www.researchgate.net/publication/349852136_Faecalibacterium_prausnitzii_A_Next-Generation_Probiotic_in_Gut_Disease_Improvement) >. Acesso em: 02 out. 2022.

HERNÁNDEZ PRADA, J. A.; FERREIRA, A. J.; KATOVICH, M. J.; SHENOY, V.; QI, Y.; SANTOS, R. A. S.; CASTELLANO, R. K.; LAMPKINS, A. J.; GUBALA, V.; OSTROV, D. A.; RAIZADA, M. K.. *Structure-based identification of small-molecule angiotensin-converting enzyme 2 activators as novel antihypertensive agents. Hypertension*, v. 51, n. 05, p. 1312-1317, 2008. Disponível em: < <https://kar.kent.ac.uk/45247/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

HOEGENAUER, C., HAMMER, H.F., MAHNERT, A.; *et al.* *Methanogenic archaea in the human gastrointestinal tract. Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, n. 19, p. 805-813, 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36050385/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

HOFFMANN, C.; DOLLIVE, S.; GRUNBERG, S.; CHEN, J.; LI, H.; WU, G. D.; LEWIS, J. D.; BUSHMAN, F. D.. *Archaea and fungi of the human gut microbiome: correlations with diet and bacterial residents. PLoS ONE*, v. 08, n. 06, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23799070/> >. Acesso em: 10 fev. 2023.

HOQUE, M. N.; RAHMAN, M. S.; AHMED, R.; HOSSAIN, M. S.; ISLAM, M. S.; ISLAM, T.; HOSSAIN, M. A.; SIDDIKI, A. Z.. *Diversity and genomic determinants of the microbiomes associated with Covid-19 and non-Covid respiratory diseases. Gene Reports*, v. 23, n. may, p. 101200, 2021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8102076/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

HORMOZNEJAD, R.; ZARE JAVID, A.; MANSOORI, A.. *Effect of BCAA supplementation on central fatigue, energy metabolism substrate and muscle damage to the exercise: a systematic*



review with meta-analysis. *Sport Sciences for Health*, v. 15, n. 02, p. 265-279, 2019. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11332-019-00542-4> >. Acesso em: 10 fev. 2023.

HU, B.; GUO, H.; ZHOU, P.; SHI, Z. L.. *Characteristics of SARS-CoV-2 and Covid-19. Nature Reviews Microbiology*, v. 19, n. 03, p. 141-154, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33024307/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; REN, L.; ZHAO, J.; HU, Y.; ZHANG, L.; FAN, G.; XU, J.; GU, X.; CHENG, Z.; YU, T.; XIA, J.; WEI, Y.; WU, W.; XIE, X.; YIN, W.; LI, H.; LIU, M.; CAO, B.. *Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497-506, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7159299/> >. Acesso em: 10 fev. 2023.

HUFESKY, F.; LAMKIEWICZ, K.; ALMEIDA, A.; AOUACHERIA, A.; ARIGHI, C.; BATEMAN, A.; BAUMBACH, J.; BEERENWINKEL, N.; BRANDT, C.; CACCIABUE, M.; CHUGURANSKY, S.; DRECHSEL, O.; FINN, R. D.; FRITZ, A.; FUCHS, S.; HATTAB, G.; HAUSCHILD, A. C.; HEIDER, D.; HOFFMANN, M.; MARZ, M.. *Computational strategies to combat Covid-19: useful tools to accelerate SARS-CoV-2 and coronavirus research. Briefings in Bioinformatics*, v. 22, n. 02, p. 642-663, 2021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7665365/> >. Acesso em: 02 out. 2022.

HUTTENHOWER, C.; GEVERS, D.; KNIGHT, R.; ABUBUCKER, S.; BADGER, J. H.; CHINWALLA, A. T.; CREASY, H. H.; EARL, A. M.; FITZGERALD, M. G.; FULTON, R. S.; GIGLIO, M. G.; HALLSWORTH-PEPIN, K.; LOBOS, E. A.; MADUPU, R.; MAGRINI, V.; MARTIN, J. C.; MITREVA, M.; MUZNY, D. M.; SODERGREN, E. J.; WHITE, O.. *Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. Nature*, v. 486, n. 7402, p. 207-214, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22699609/> >. Acesso em: 08 mai. 2023.

JABARIS S, S. L.; ANANTHALAKSHMI, V.. *The current situation of Covid-19 in India. Brain, Behavior, & Immunity - Health*, v. 11, n. december 2020, p. 100200, 2021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7834126/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

JIA, W.; XIE, G.; JIA, W.. *Bile acid–microbiota crosstalk in gastrointestinal inflammation and carcinogenesis. Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology*, v. 15, n. 02, p. 111-128, 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29018272/> >. Acesso em: 08 mai. 2023.

KABAT, A. M.; SRINIVASAN, N.; MALOY, K. J.. *Modulation of immune development and function by intestinal microbiota. Trends in Immunology*, v. 35, n. 11, p. 507-517, 2014. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25172617/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

KUMAR, S. U.; KUMAR, D. T.; CHRISTOPHER, B. P.; DOSS, C. G. P.. *The rise and impact of Covid-19 in India. Frontiers in Medicine*, v. 07, n. may, p. 01-07, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32574338/> >. Acesso em: 02 fev. 2023.

LAKE, M. A.. *What we know so far: Covid-19 current clinical knowledge and research. Clinical Medicine, Journal of the Royal College of Physicians of London*, v. 20, n. 02, p. 124-127, 2020.

Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7081812/> >. Acesso em: 02 fev. 2023.

LAMERS, M. M.; BEUMER, J.; VAART, J. Van Der; KNOOPS, K.; PUSCHHOF, J.; BREUGEM, T. I.; RAVELLI, R. B. G.; SCHAYCK, J. P. Van; MYKYTYN, A. Z.; DUIMEL, H. Q.; DONSELAAR, E. Van; RIESEBOSCH, S.; KUIJPERS, H. J. H.; SCHIPPER, D.; WETERING, W. J. V. De; GRAAF, M. De; KOOPMANS, M.; CUPPEN, E.; PETERS, P. J.; CLEVERS, H.. *SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. Science*, v. 369, n. 6499, p. 50-54, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32358202/> >. Acesso em: 29 jul. 2023.

LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; WANG, X.; ZHOU, L.; TONG, Y.; REN, R.; LEUNG, K. S. M.; LAU, E. H. Y.; WONG, J. Y.; XING, X.; XIANG, N.; WU, Y.; LI, C.; CHEN, Q.; LI, D.; LIU, T.; ZHAO, J.; LIU, M.; FENG, Z.. *Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. New England Journal of Medicine*, v. 382, n. 13, p. 1199-1207, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31995857/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

LI, S.; YANG, S.; ZHOU, Y.; DISOMA, C.; DONG, Z.; DU, A.; ZHANG, Y.; CHEN, Y.; HUANG, W.; CHEN, J.; SONG, D.; CHEN, Z.; LIU, P.; LI, S.; ZHENG, R.; LIU, S.; RAZZAQ, A.; CHEN, X.; TAO, S.; XIA, Z.. *Microbiome profiling using shotgun metagenomic sequencing identified unique microorganisms in Covid-19 patients with altered gut microbiota. Frontiers in Microbiology*, v. 12, n. october, 2021. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-1497098> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

LI, Y.; TENCHOV, R.; SMOOT, J.; LIU, C.; WATKINS, S.; ZHOU, Q.. *A comprehensive review of the global efforts on Covid-19 vaccine development. ACS Central Science*, v. 07, n. 04, p. 512-533, 2021. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8029445/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

LIMA, C. M. A.. *Information about the new coronavirus disease (Covid-19). Radiologia Brasileira*, v. 53, n. 02, p. v-vi, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32336833/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

LINK-GELLES, R.; CIESLA, A. A.; FLEMING-DUTRA, K. E.; SMITH, Z. R.; BRITTON, A.; WIEGAND, R. E.; MILLER, J. D.; ACCORSI, E. K.; SCHRAG, S. J.; VERANI, J. R.; SHANG, N.; DERADO, G.; PILISHVILI, T.. *Effectiveness of bivalent mRNA vaccines in preventing symptomatic SARS-CoV-2 infection — increasing community access to testing program, United States, september–november 2022. MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 71, n. 48, p. 1526-1530, 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36454688/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

LIU, M.; CLARKE, L. J.; BAKER, S. C.; JORDAN, G. J.; BURRIDGE, C. P.. *A practical guide to DNA metabarcoding for entomological ecologists. Ecological Entomology*, v. 45, n. 03, p. 373-385, 2020. Disponível em: < [https://www.researchgate.net/publication/338237419\\_A\\_practical\\_guide\\_to\\_DNA\\_metabarcoding\\_for\\_entomological\\_ecologists](https://www.researchgate.net/publication/338237419_A_practical_guide_to_DNA_metabarcoding_for_entomological_ecologists) >. Acesso em: 29 jul. 2023.

LYNCH, J. B.; HSIAO, E. Y.. *Microbiomes as sources of emergent host phenotypes*. **Science**, v. 365, n. 6460, p. 1405-1409, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31604267/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

MADDAH, R.; GOODARZI, V.; ASADI-YOUSEFABAD, S. L.; ABBASLUO, M.; SHARIATI, P.; SHAFIEI KAFRAJ, A.. *Evaluation of the gut microbiome associated with Covid-19*. **Informatics in Medicine Unlocked**, v. 38, n. march, 2023. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37033411/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

MAEDA, H.; HIRAI, K.; MINESHIBA, J.; YAMAMOTO, T.; KOKEGUCHI, S.; TAKASHIBA, S.. *Medical microbiological approach to Archaea in oral infectious diseases*. **Japanese Dental Science Review**, v. 49, n. 02, p. 72-78, 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1882761613000033> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

MAO, X.; GU, C.; REN, M.; CHEN, D.; YU, B.; HE, J.; YU, J.; ZHENG, P.; LUO, J.; LUO, Y.; WANG, J.; TIAN, G.; YANG, Q.. *L-isoleucine administration alleviates rotavirus infection and immune response in the weaned piglet model*. **Frontiers in Immunology**, v. 09, n. july, p. 01-12, 2018. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30061901/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

MARINHO, F.; DE AZEREDO PASSOS, V. M.; CARVALHO MALTA, D.; BARBOZA FRANÇA, E.; ABREU, D. M. X.; ARAÚJO, V. E. M.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; CAMARGOS, P. A. M.; DA CUNHA, C. C.; DUNCAN, B. B.; FELISBINO-MENDES, M. S.; GUERRA, M. R.; GUIMARAES, M. D. C.; LOTUFO, P. A.; MARCENES, W.; OLIVEIRA, P. P. V.; DE MOARES PEDROSO, M.; RIBEIRO, A. L.; SCHMIDT, M. I.; NAGHAVI, M.. *Burden of disease in Brazil, 1990–2016: a systematic subnational analysis for the Global Burden of Disease Study 2016*. **The Lancet**, v. 392, n. 10149, p. 760-775, 2018. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31221-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31221-2) >. Acesso em: 11 jun. 2023.

MASSONNAUD, C. R.; ROUX, J.; COLIZZA, V.; CRÉPEY, P.. *Evaluating Covid-19 booster vaccination strategies in a partially vaccinated population: a modeling study*. **Vaccines**, v. 10, n. 03, 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35335111/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

MATARAZZO, F.; RIBEIRO, A. C.; FAVERI, M.; TADDEI, C.; MARTINEZ, M. B.; MAYER, M. P. A.. *The domain Archaea in human mucosal surfaces*. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 09, p. 834-840, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22827611/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

MATHIEU, E., RITCHIE, H., ORTIZ-OSPINA, E. *et al.*. *A global database of COVID-19 vaccinations*. **Nat Hum Behav**, n. 05, pp. 947-953, 2021. Disponível em: < <https://ourworldindata.org/Covid-vaccinations> >. Acesso em: 16 nov. 2023.

MEHTA, N. S.; MYTTON, O. T.; MULLINS, E. W. S.; FOWLER, T. A.; FALCONER, C. L.; MURPHY, O. B.; LANGENBERG, C.; JAYATUNGA, W. J. P.; EDDY, D. H.; NGUYEN-VAN-TAM, J. S.. *SARS-CoV-2 (Covid-19): what do we know about children? A systematic review*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 09, p. 2469-2479, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32392337/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

MEHTA, P.; MCAULEY, D. F.; BROWN, M.; SANCHEZ, E.; TATTERSALL, R. S.; MANSON, J. J.. *Covid-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression*. **Lancet**, n. 395, p. 1033-1034, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32192578/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

MIQUEL, S.; MARTÍN, R.; ROSSI, O.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L. G.; CHATEL, J. M.; SOKOL, H.; THOMAS, M.; WELLS, J. M.; LANGELLA, P.. *Faecalibacterium prausnitzii and human intestinal health*. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 03, p. 255-261, 2013. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23831042/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

MIZRAHI, B.; LOTAN, R.; KALKSTEIN, N.; PERETZ, A.; PEREZ, G.; BEN-TOV, A.; CHODICK, G.; GAZIT, S.; PATALON, T.. *Correlation of SARS-CoV-2-breakthrough infections to time-from-vaccine*. **Nature Communications**, v. 12, n. 01, p. 01-05, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34737312/> >. Acesso em: 29 jul. 2023.

MOEIN, S. T.; HASHEMIAN, S. M. R.; MANSOURAFSHAR, B.; KHORRAM-TOUSI, A.; TABARSI, P.; DOTY, R. L.. *Smell dysfunction: a biomarker for Covid-19*. **International Forum of Allergy and Rhinology**, v. 10, n. 08, p. 944-950, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32301284/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

MOENS, E.; VELDHOEN, M.. *Epithelial barrier biology: Good fences make good neighbours*. **Immunology**, v. 135, n. 01, p. 01-08, 2012. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22044254/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

NAGPAL, R.; MAINALI, R.; AHMADI, S.; WANG, S.; SINGH, R.; KAVANAGH, K.; KITZMAN, D. W.; KUSHUGULOVA, A.; MAROTTA, F.; YADAV, H.. *Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights*. **Nutrition and Healthy Aging**, v. 04, n. 04, p. 267-285, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6004897/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

NAKANISHI, Y.; SATO, T.; OHTEKI, T.. *Commensal Gram-positive bacteria initiates colitis by inducing monocyte/macrophage mobilization*. **Mucosal Immunology**, v. 08, n. 01, p. 152-160, 2015. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24938744/> >. Acesso em: 29 jul. 2023.

NEGI, S.; DAS, D. K.; PAHARI, S.; NADEEM, S.; AGREWALA, J. N.. *Potential role of gut microbiota in induction and regulation of innate immune memory*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. october, p. 01-12, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749793/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

NEGI, S.; PAHARI, S.; BASHIR, H.; AGREWALA, J. N.. *Gut microbiota regulates mincle mediated activation of lung dendritic cells to protect against mycobacterium tuberculosis*. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. may, p. 01-14, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31749793/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

NEISH, A. S.. *Microbes in Gastrointestinal Health and Disease.. Gastroenterology*, v. 136, n. 01, p. 65-80, 2009. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19026645/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

NGUYEN, L. H.; OKIN, D.; DREW, D. A.; BATTISTA, V. M.; JESUDASEN, S. J.; KUNTZ, T. M.; BHOSLE, A.; THOMPSON, K. N.; REINICKE, T.; LO, C. H.; WOO, J. E.; CARABALLO, A.; BERRA, L.; VIEIRA, J.; HUANG, C. Y.; DAS ADHIKARI, U.; KIM, M.; SUI, H. Y.; MAGICHEVA-GUPTA, M.; LAI, P. S.. *Metagenomic assessment of gut microbial communities and risk of severe Covid-19. Genome Medicine*, v. 15, n. 01, p. 01-14, 2023. Disponível em: < <https://inha.elsevierpure.com/en/publications/metagenomic-assessment-of-gut-microbial-communities-and-risk-of-s> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

O'DWYER, D. N.; ASHLEY, S. L.; GURCZYNSKI, S. J.; XIA, M.; WILKE, C.; FALKOWSKI, N. R.; NORMAN, K. C.; ARNOLD, K. B.; HUFFNAGLE, G. B.; SALISBURY, M. L.; HAN, M. L. K.; FLAHERTY, K. R.; WHITE, E. S.; MARTINEZ, F. J.; ERB-DOWNWARD, J. R.; MURRAY, S.; MOORE, B. B.; DICKSON, R. P.. *Lung microbiota contribute to pulmonary inflammation and disease progression in pulmonary fibrosis. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, v. 199, n. 09, p. 1127-1138, 2019. Disponível em: < <https://www.atsjournals.org/doi/full/10.1164/rccm.201809-1650OC> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

OKBA, N. M.; MÜLLER, M. A.; LI, W.; WANG, C.; GEURTS, C. H.; CORMAN, V. M.. *Severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2: specific antibody responses in Coronavirus disease 2019 patients. Emerg Infect Dis.*, n. 26, v. 07, pp. 1478-1488, jul., 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32267220/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

OLIVEIRA, B. A.; DE OLIVEIRA, L. C.; SABINO, E. C.; OKAY, T. S.. *SARS-CoV-2 and the Covid-19 disease: a mini review on diagnostic methods. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, v. 62, n. may, p. 01-08, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32609256/> >. Acesso em: 05 abr 2023.

OLIVEIRA, L. P.; GUIMARÃES, V. H. D.; OLIVEIRA, J. R.; GUIMARÃES, A. L. S.; DE PAULA, A. M. B.; BADER, M.; SANTOS, R. A. S. dos; SANTOS, S. H. S.. *Genetic deletion of the angiotensin-(1-7) receptor Mas leads to alterations in gut villi length modulating TLR4/PI3K/AKT and produces microbiome dysbiosis. Neuropeptides*, v. 82, p. 102056, 2020. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S014341792030069X> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

PAN, Y.; LI, X.; YANG, G.; FAN, J.; TANG, Y.; ZHAO, J.; LONG, X.; GUO, S.; ZHAO, Z.; LIU, Y.; HU, H.; XUE, H.; LI, Y.. *Serological immunochromatographic approach in diagnosis with SARS-CoV-2 infected Covid-19 patients. Journal of Infection*, n. 81, v. 2020, p. e28-e32, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7195339/> >. Acesso em: 08 nov 2023.

PARSAEI, M.; SARAFRAZ, N.; MOADDAB, S. Y.; EBRAHIMZADEH LEYLABADLO, H.. *The importance of Faecalibacterium prausnitzii in human health and diseases. New Microbes and New Infections*, v. 43, p. 100928, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34430035/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

PASSARINI, M. R. Z.; MOREIRA, J. V. F.; GOMEZ, J. A. M.; SANTOS, R. C. B.. *DNA metabarcoding of the leachate microbiota from sanitary landfill: potential for bioremediation process. Archives of Microbiology*, n. 0123456789, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34228134/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

QIN, J.; LI, R.; RAES, J.; ARUMUGAM, M.; BURGDORF, K. S.; MANICHANH, C.; NIELSEN, T.; PONS, N.; LEVENEZ, F.; YAMADA, T.; MENDE, D. R.; LI, J.; XU, J.; LI, S.; LI, D.; CAO, J.; WANG, B.; LIANG, H.; ZHENG, H.; ZOETENDAL, E.. *A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. Nature*, v. 464, n. 7285, p. 59-65, 2010. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20203603/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

RANZANI, O. T.; BASTOS, L. S. L.; GELLI, J. G. M.; MARCHESI, J. F.; BAIÃO, F.; HAMACHER, S.; BOZZA, F. A.. *Characterisation of the first 250 000 hospital admissions for Covid-19 in Brazil: a retrospective analysis of nationwide data. The Lancet Respiratory Medicine*, v. 09, n. 04, p. 407-418, 2021. Disponível em: < [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30560-9](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30560-9) >. Acesso em: 11 jun. 2023.

REESE, A. T.; KARTZINEL, T. R.; PETRONE, B. L.; TURNBAUGH, P. J.; PRINGLE, R. M.; DAVID, L. A.. *Using DNA metabarcoding to evaluate the plant component of human diets: a proof of concept. mSystems*, v. 04, n. 05, 2019. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31594830/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

ROOKS, M. G.; GARRETT, W. S.. *Gut microbiota, metabolites and host immunity. Nature Reviews Immunology*, v. 16, n. 06, p. 341-352, 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27231050/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S.. *The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (Covid-19) outbreak. J Autoimmun*, n. 109, v. 102433, mai., 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32113704/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

SANYAOLU, A.; OKORIE, C.; HOSEIN, Z.; PATIDAR, R.; DESAI, P.; PRAKASH, S.; JAFERI, U.; MANGAT, J.; MARINKOVIC, A.. *Global pandemicity of Covid-19: situation report as of june 9, 2020. Infectious Diseases: Research and Treatment*, v. 14, p. 117863372199126, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33597811/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

SCALDAFERRI, F.; IANIRO, G.; PRIVITERA, G.; LOPETUSO, L. R.; VETRONE, L. M.; PETITO, V.; PUGLIESE, D.; NERI, M.; CAMMAROTA, G.; RINGEL, Y.; COSTAMAGNA, G.; GASBARRINI, A.; BOSKOSKI, I.; ARMUZZI, A.. *The thrilling journey of sars-cov-2 into the intestine: from pathogenesis to future clinical implications. Inflammatory Bowel Diseases*, v. 26, n. 09, p. 1306-1314, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32720978/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

SCHIRMER, M.; SMEEKENS, S. P.; VLAMAKIS, H.; JAEGER, M.; OOSTING, M.; FRANZOSA, E. A.; HORST, R. ter; JANSEN, T.; JACOBS, L.; BONDER, M. J.; KURILSHIKOV, A.; FU, J.; JOOSTEN, L. A. B.; ZHERNAKOVA, A.; HUTTENHOWER, C.; WIJMENGA, C.; NETEA, M. G.; XAVIER, R. J.. *Linking the human gut microbiome to*

*inflammatory cytokine production capacity*. **Cell**, v. 167, n. 07, p. 1897, 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27984736/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

SINGHAL, T.. *A review of coronavirus disease-2019 (Covid-19)*. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 87, n. 04, p. 281-286, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32166607/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

SONNENBURG, J. L.; BÄCKHED, F.. *Diet-microbiota interactions as moderators of human metabolism*. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 56-64, 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27383980/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

SUHAIL, S.; ZAJAC, J.; FOSSUM, C.; LOWATER, H.; MCCRACKEN, C.; SEVERSON, N.; LAATSCH, B.; NARKIEWICZ-JODKO, A.; JOHNSON, B.; LIEBAU, J.; BHATTACHARYYA, S.; HATI, S.. *Role of oxidative stress on SARS-CoV (SARS) and SARS-CoV-2 (Covid-19) infection: a review*. **Protein Journal**, v. 39, n. 06, p. 644-656, 2020. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/fr/covidwho-1196608> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

SZWARCWALD, C. L.; SOUZA JÚNIOR, P. R. B. de; MARQUES, A. P.; ALMEIDA, W. D. S. de; MONTILLA, D. E. R.. *Inequalities in healthy life expectancy by brazilian geographic regions: findings from the National Health Survey, 2013*. **International Journal for Equity in Health**, v. 15, n. 01, p. 1–9, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5112675/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

THAISS, C. A.; ZMORA, N.; LEVY, M.; ELINAV, E.. *The microbiome and innate immunity*. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 65-74, 2016. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27383981/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

TUDDENHAM, S. A.; KOAY, W. L. A.; ZHAO, N.; WHITE, J. R.; GHANEM, K. G.; SEARS, C. L.; DILLON, S.; WILSON, C.; LOZUPONE, C.; WARD, H.; WANKE, C.; DUBOURG, G.; RAOULT, D.; PALMER, B.; MONACO, C.; KWON, D.; MUTLU, E.; LANDAY, A.; PAREDES, R.; ... GOEDERT, J. J.. *The impact of human immunodeficiency virus infection on gut microbiota  $\alpha$ -diversity: an individual-level meta-analysis*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 70, n. 04, p. 615-627, 2020. Disponível em: < <https://pure.johnshopkins.edu/en/publications/the-impact-of-human-immunodeficiency-virus-infection-on-gut-micro> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

VAIRA, L. A.; SALZANO, G.; DEIANA, G.; DE RIU, G.. *Anosmia and ageusia: common findings in Covid-19 patients*. **Laryngoscope**, v. 130, n. 07, p. 1787, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7228304/> >. Acesso em: 10 jul. 2023.

VILLANUEVA-MILLÁN, M. J.; PÉREZ-MATUTE, P.; OTEO, J. A.. *Gut microbiota: a key player in health and disease. a review focused on obesity*. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 71, n. 03, p. 509-525, 2015. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25749935/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

VITAL, M.; HOWE, A. C.; TIEDJE, J. M.. *Revealing the bacterial butyrate synthesis pathways by analyzing (meta)genomic data.* **mBio**, v. 05, n. 02, p. 01-11, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3994512/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

WANG, C.; HORBY, P. W.; HAYDEN, F. G.; GAO, G. F.. *A novel coronavirus outbreak of global health concern.* **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 470-473, 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7135038/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

WANG, H.; HOU, X.; WU, X.; LIANG, T.; ZHANG, X.; WANG, D.. *SARSCoV-2 proteome microarray for mapping Covid-19 antibody interactions at amino acid resolution.* **BioRxiv**. 2020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7586461/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Coronavirus (Covid-19) Dashboard**. Genebra, Suíça: WHO, 2021. Disponível em: < <https://Covid-19.who.int/> > e < <https://Covid-19.who.int/region/amro/country/br> >. Acesso em: 29 jul. 2021.

WÖLFEL, R.; CORMAN, V. M.; GUGGEMOS, W.; SEILMAIER, M.; ZANGE, S.; MÜLLER, M. A.; NIEMEYER, D.; JONES, T. C.; VOLLMAR, P.; ROTHE, C.; HOELSCHER, M.; BLEICKER, T.; BRÜNINK, S.; SCHNEIDER, J.; EHMANN, R.; ZWIRGLMAIER, K.; DROSTEN, C.; WENDTNER, C.. *Virological assessment of hospitalized patients with Covid-2019.* **Nature**, v. 581, n. 7809, p. 465-469, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32235945/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

WU, J. T.; LEUNG, K.; LEUNG, G. M.. *Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study.* **Lancet**, n. 395, p. 689-697, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32014114/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

WU, Y.; GUO, C.; TANG, L.; HONG, Z.; ZHOU, J.; DONG, X.; YIN, H.; XIAO, Q.; TANG, Y.; QU, X.; KUANG, L.; FANG, X.; MISHRA, N.; LU, J.; SHAN, H.; JIANG, G.; HUANG, X.. *Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples.* **The Lancet Gastroenterology and Hepatology**, v. 05, n. 05, p. 434-435, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32199469/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

XU, R.; LU, R.; ZHANG, T.; WU, Q.; CAI, W.; HAN, X.; WAN, Z.; JIN, X.; ZHANG, Z.; ZHANG, C.. *Temporal association between human upper respiratory and gut bacterial microbiomes during the course of Covid-19 in adults.* **Communications Biology**, v. 04, n. 01, p. 01-11, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33603076/> >. Acesso em: 18 out. 2023.

XU, Y.; LI, X.; ZHU, B.; LIANG, H.; FANG, C.; GONG, Y.; GUO, Q.; SUN, X.; ZHAO, D.; SHEN, J.; ZHANG, H.; LIU, H.; XIA, H.; TANG, J.; ZHANG, K.; GONG, S.. *Characteristics of pediatric SARS-CoV-2 infection and potential evidence for persistent fecal viral shedding.* **Nature Medicine**, v. 26, n. 04, p. 502-505, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32284613/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.



YAMAMOTO, S.; SAITO, M.; TAMURA, A.; PRAWISUDA, D.; MIZUTANI, T.; YOTSUYANAGI, H.. *The human microbiome and Covid-19: a systematic review*. **PLoS ONE**, v. 16, n. 06, jun., p. 01-13, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34161373/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

YAO, Y.; CAI, X.; FEI, W.; YE, Y.; ZHAO, M.; ZHENG, C.. *The role of short-chain fatty acids in immunity, inflammation and metabolism*. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 01, p. 01-12, 2022. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33261516/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

YEOH, Y. K.; ZUO, T.; LUI, G. C. Y.; ZHANG, F.; LIU, Q.; LI, A. Y. L.; CHUNG, A. C. K.; CHEUNG, C. P.; TSO, E. Y. K.; FUNG, K. S. C.; CHAN, V.; LING, L.; JOYNT, G.; HUI, D. S. C.; CHOW, K. M.; NG, S. S. S.; LI, T. C. M.; NG, R. W. Y.; YIP, T. C. F.; NG, S. C.. *Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with Covid-19*. **Gut**, v. 70, n. 04, p. 698-706, 2021. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33431578/> >. Acesso em: 08 nov. 2023.

YU, D. W.; JI, Y.; EMERSON, B. C.; WANG, X.; YE, C.; YANG, C.; DING, Z.. *Biodiversity soup: Metabarcoding of arthropods for rapid biodiversity assessment and biomonitoring*. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 03, n. 04, p. 613-623, 2012. Disponível em: < <https://besjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.2041-210X.2012.00198.x> >. Acesso em: 15 set. 2023.

YUEN, K. S.; YE, Z. W.; FUNG, S. Y.; CHAN, C. P.; JIN, D. Y.. *SARS-CoV-2 and Covid-19: The most important research questions*. **Cell and Bioscience**, v. 10, n. 01, p. 01-05, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32190290/> >. Acesso em: 05 abr. 2023.

ZHANG, D.; LI, S.; WANG, N.; TAN, H. Y.; ZHANG, Z.; FENG, Y.. *The Cross-Talk Between Gut Microbiota and Lungs in Common Lung Diseases*. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32158441/> >. Acesso em: 11 jun. 2023.

ZHANG, F.; WAN, Y.; ZUO, T.; YEOH, Y. K.; LIU, Q.; ZHANG, L.; ZHAN, H.; LU, W.; XU, W.; LUI, G. C. Y.; LI, A. Y. L.; CHEUNG, C. P.; WONG, C. K.; CHAN, P. K. S.; CHAN, F. K. L.; NG, S. C.. *Prolonged impairment of short-chain fatty acid and l-isoleucine biosynthesis in gut microbiome in patients with Covid-19*. **Gastroenterology**, v. 162, n. 02, p. 548-561, 2022. Disponível em: < <https://pesquisa.bvsalud.org/global-literature-on-novel-coronavirus-2019-ncov/resource/pt/covidwho-1475507> >. Acesso em: 15 set. 2023.

ZHANG, H.; AI, J.-W.; YANG, W.; ZHOU, X.; HE, F.; XIE, S.; ZENG, W.; LI, Y.; YU, Y.; GOU, X.; LI, Y.; WANG, X.; SU, H.; ZHU, Z.; XU, T.; ZHANG, W.. *Metatranscriptomic characterization of coronavirus disease 2019 identified a host transcriptional classifier associated with immune signaling*. **Clinical Infectious Diseases**, n. 73, v. 03, p. 376-385, 2020. Disponível em: < <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32463434/> >. Acesso em: 15 set. 2023.

ZHANG, Z.; ZHANG, L.; ZHU, A.; WANG, Y.; GUAN, W.; ZENG, Z.; SUN, J.; LI, F.; ZHAO, J.; YANG, Z.; ZHAO, J.; ZHONG, N.. *Narrative review of the novel coronavirus SARS-CoV-2: Update on genomic characteristics, transmissions and animal model*. **Journal of Thoracic Disease**,

v. 12, n. 12, p. 7454-7466, 2020. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7797876/>>. Acesso em: 18 out. 2023.

ZHENG, D.; LIWINSKI, T.; ELINAV, E.. *Interaction between microbiota and immunity in health and disease*. **Cell Research**, v. 30, n. 06, p. 492-506, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32433595/>>. Acesso em: 08 nov. 2023.

ZHOU, M.; DONG, X.; QU, J.; GONG, F.; HAN, Y.; QIU, Y.; WANG, J.; LIU, Y.; WEI, Y.; XIA, J.; YU, T.; ZHANG, X.; ZHANG, L.. *Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study*. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507-513, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32007143/>>. Acesso em: 05 dez. 2023.

ZUO, T.; LIU, Q.; ZHANG, F.; LUI, G. C. Y.; TSO, E. Y. K.; YEOH, Y. K.; CHEN, Z.; BOON, S. S.; CHAN, F. K. L.; CHAN, P. K. S.; NG, S. C.. *Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with Covid-19*. **Gut**, v. 70, n. 02, p. 276-284, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32690600/>>. Acesso em: 05 abr. 2023.

ZUO, T.; WU, X.; WEN, W.; LAN, P.. *Gut microbiome alterations in Covid-19*. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 19, n. 05, p. 679-688, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34560321/>>. Acesso em: 11 jun. 2023.

ZUO, T.; ZHAN, H.; ZHANG, F.; LIU, Q.; TSO, E. Y. K.; LUI, G. C. Y.; CHEN, N.; LI, A.; LU, W.; CHAN, F. K. L.; CHAN, P. K. S.; NG, S. C.. *Alterations in fecal fungal microbiome of patients with Covid-19 during time of hospitalization until discharge*. **Gastroenterology**, v. 159, n. 04, p. 1302-1310, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32598884/>>. Acesso em: 08 nov. 2023.

ZUO, T.; ZHANG, F.; LUI, G. C. Y.; YEOH, Y. K.; LI, A. Y. L.; ZHAN, H.; WAN, Y.; CHUNG, A. C. K.; CHEUNG, C. P.; CHEN, N.; LAI, C. K. C.; CHEN, Z.; TSO, E. Y. K.; FUNG, K. S. C.; CHAN, V.; LING, L.; JOYNT, G.; HUI, D. S. C.; CHAN, F. K. L.; NG, S. C.. *Alterations in Gut Microbiota of Patients With Covid-19 During Time of Hospitalization*. **Gastroenterology**, v. 159, n. jan., p. 944-955, 2020. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32442562/>>. Acesso em: 05 abr. 2023.