



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

PATRÍCIA BRITO RODRIGUES

PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA INFECÇÃO POR  
SARS-CoV-2

THE GUT MICROBIOTA ROLE IN SARS-CoV-2 INFECTION

CAMPINAS

2023

**PATRÍCIA BRITO RODRIGUES**

**PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA INFECÇÃO POR  
SARS-CoV-2**

**THE GUT MICROBIOTA ROLE IN SARS-CoV-2 INFECTION**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Genética e Biologia Molecular na Área de Imunologia.*

*Thesis presented to the Institute of Biology of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetic and Molecular Biology, in the area of Immunology.*

*Supervisor/Orientador: Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo*

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA PATRÍCIA BRITO RODRIGUES E ORIENTADA PELO PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO

**CAMPINAS**

**2023**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R618p Rodrigues, Patricia Brito, 1991-  
Papel da microbiota intestinal na infecção por SARS-CoV-2 / Patricia Brito Rodrigues. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marco Aurélio Ramirez Vinolo.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Microbioma gastrointestinal. 2. Ácidos graxos de cadeia curta. 3. SARS-CoV-2. 4. Camundongos transgênicos. 5. Vírus - Variação. I. Vinolo, Marco Aurélio Ramirez, 1982-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

**Título em outro idioma:** The gut microbiota role in SARS-CoV-2 infection

**Palavras-chave em inglês:**

Gastrointestinal microbiome

Short chain fatty acids

SARS-CoV-2

Mice, Transgenic

Viruses - Variation

**Área de concentração:** Imunologia

**Titulação:** Doutora em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Marco Aurélio Ramirez Vinolo [Orientador]

Carmen Veríssima Ferreira Halder

Renata Sesti Costa

Juliana Terzi Maricato

Jaqueline Goes de Jesus

**Data de defesa:** 11-08-2023

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-1687-7742>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/3039145507021875>

Campinas, 11 de agosto de 2023.

## **COMISSÃO EXAMINADORA**

### **Membros Titulares**

Prof. Dr. Marco Aurelio Ramirez Vinolo (IB/ Unicamp) [Orientador]

Profa. Dra. Carmen Veríssima Ferreira Halder (IB/ Unicamp)

Dra. Renata Sesti Costa (Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp)

Dra. Jaqueline Goes de Jesus (USP - Universidade de São Paulo)

Dra. Juliana Terzi Maricato (Universidade Federal de São Paulo)

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade Instituto de Biologia.

## DEDICATÓRIA

Em memória das vítimas de COVID-19 que tiveram seu tempo de estadia aqui na Terra roubado, principalmente as do Brasil, quando poderiam ter mais chances de sobreviver não fosse o desrespeito com a vida promovido pelo governo genocida daquela época.

Aos pacientes, profissionais de saúde e cientistas que, mais do que nunca, estão trabalhando juntos para alcançar respostas e soluções para esta doença.

À minha mãe, Eliane de Oliveira Brito, que sempre me apoiou neste árduo caminho da ciência, mesmo parecendo um mundo tão distante do seu entendimento, ela me deu forças para não desistir e lutar como mulher, a mesma força que recebeu em 3 gerações de mulheres da nossa família que lutaram por seus lugares. Te amo.

Dedico também a mim, por cada minuto aplicado ao estudo, experimentos e escrita. Que todo esse investimento sirva para eu não me esquecer, que enquanto eu for exceção entre os meus, a favela ainda não venceu e precisarei continuar trabalhando para que isso mude.

## AGRADECIMENTOS

Os meus sinceros agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo, primeiramente por me dar a oportunidade de descobrir e criar ciência, me orientando mais do que em uma tese, mas em como me tornar uma pesquisadora melhor e humana todos os dias. Segundo, por ter aceitado o desafio de adentrar no mundo da virologia.

Aos Professores Dr. Thiago Mattar Cunha e Dr. José Carlos Farias Alves Filho, pela parceria que foi crucial para o desenvolvimento dos experimentos *in vivo*.

Ao Dr. Giovanni Freitas Gomes, que foi meu braço direito na execução dos experimentos com animais, e me proporcionou muitas discussões científicas e políticas que contribuíram para aprimorar meu criticismo, importante para os cientistas.

Aos colegas do laboratório pelo companheirismo nas inúmeras análises e discussões de resultados, em especial: Vinícius Rodovalho, Arilson Bernardo, Monara Kaelle, Renan Corrêa e Pollyana.

Ao Prof. Dr. José Luiz Proença Módena e sua equipe, em especial Gabriela Souza, Stefanie Muraro, Pierina e Daniel Teixeira por me suportarem nos ensaios de infecção, carga viral e nos esclarecimentos das minhas infinitas dúvidas sobre virologia.

Aos professores do departamento Dr. Henrique Marques, Dr. Pedro Manoel, Dr. Marcelo Mori, Dr. Alessandro Faria, Dr. Daniel Martins-de-Souza e Dra. Catarina Raposo Dias Carneiro, pelo companheirismo ao compartilharem seja algum equipamento, estrutura ou reagente, tornando possível estender nossas possibilidades para muito além do que poderíamos se fizessemos sozinhos.

Aos amigos e amigas que sustentaram a minha sanidade nos momentos difíceis, através de abraços ou conversas longas, Felipe Mousovich Neto, Felipe Cezar Pinheiro, José Luiz Fachi, Arilson Bernardo e Jackeline de Freitas Cipriano.

Aos amigos que conheci pela Força Tarefa Contra a COVID-19, em especial Luana Nunes.

Ao Dr. François Trottein por ter me dado tantas oportunidades que não tenho palavras para agradecer. Pude conhecer outros países, outras culturas, aprender outra língua e mergulhei dentro de mim, no processo de autoconhecimento. No campo da Ciência, foi igualmente incrível tudo que vivi e aprendi. *Merci beaucoup pour toute!*

Agradeço ao time FT, Lucie, Cyril, Séverine, Loic, Gemma, Lou, Ozmen e Fabiola que ao contrário da fama de que os europeus são frios e distantes no ambiente de trabalho, vocês foram minha família e meu apoio para todos os momentos.

Em especial, agradeço a Fabíola e ao Ozmen pelo afeto sem medidas. Vocês serão para sempre meus irmãos da Ciência e da Vida.

Agradeço minha família, pela compreensão de minha ausência mesmo antes do isolamento social, em especial minha irmã Érika Cristina, sobrinhos João Francisco e Laura Cristina, tia Ana Cláudia Rodrigues da Silva e primos Itauane, Isabella, João e Davi Luca.

Ao meu amor Maxime Idkowiak, agradeço pelo carinho e respeito dados a mim em todos os momentos que precisei estar longe para me dedicar ao trabalho.

Ao Instituto de Biologia, incluindo todos os colaboradores das secretarias e direção, docentes da pós-graduação que contribuíram para minha formação, alunos da graduação que durante o estágio de docência foram essenciais para meu desenvolvimento.

À Unicamp, por todo apoio e gestão durante o trabalho desenvolvido em meio à pandemia, com diversos recursos de acompanhamento da saúde de alunos e funcionários.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio das bolsas de doutorado processo n° 2019/14342-7) e bolsa de estágio de pesquisa no exterior processo n° 2022/02058-5, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

**“É necessário acreditar que o sonho é possível, que o céu é o limite e você é imbatível”.**

Racionais Mc's

## RESUMO

Pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentam alterações significantes na composição e funcionalidade da microbiota, quadro esse chamado de disbiose associada a COVID-19. Essas alterações têm sido associadas com menores concentrações de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs), metabólitos microbianos que atuam na comunicação entre a microbiota e as células do hospedeiro, incluindo os componentes do sistema imunológico do hospedeiro. No entanto, a relevância da microbiota intestinal bem como de seus compostos imunomoduladores frente à infecção pelo SARS-CoV-2 ainda não está bem estabelecida. Desta forma, a proposta do trabalho foi investigar o efeito do tratamento com AGCCs e o impacto da redução da carga microbiana intestinal durante a infecção por SARS-CoV-2. Para isso, utilizamos modelo *in vitro* com biópsias intestinais e linhagem de células epiteliais intestinais humanas para avaliar o efeito dos AGCCs na infecção por SARS-CoV-2. Em seguida, analisamos *in vivo*, com camundongos K18-hACE2, a relevância da depleção da microbiota após o tratamento com antimicrobianos em respostas clínicas e imunológicas à infecção por SARS-CoV-2. Além disso, comparamos os efeitos da infecção pela variante gama (P.1) *versus* à infecção por SARS-CoV-2 ancestral (B.1) nas alterações da microbiota intestinal. Nossos resultados indicaram que os AGCCs, quando adicionados *in vitro*, apesar de reduzirem a expressão de proteínas importantes para a entrada e reconhecimento do vírus na célula hospedeira como TMPRSS2 e DDX58, respectivamente, não impactaram na carga viral em células epiteliais ou biópsias intestinais. No modelo animal de infecção por SARS-CoV-2 demonstramos que a depleção da microbiota intestinal por tratamento agudo com antimicrobianos orais de amplo espectro não alterou a sobrevivência pós-infecção e teve apenas efeitos pontuais na resposta imune ao SARS-CoV-2 indicando que, nestas condições, a alteração da microbiota pelos antimicrobianos não interfere no desenvolvimento da doença. Por fim, observamos que a infecção pela variante gama em K18-hACE2 induziu alterações em componentes da barreira intestinal e na composição da microbiota que são mais evidentes do que no caso da infecção pela cepa ancestral. Nós hipotetizamos que estas alterações tenham relação com a gravidade e infecção do sistema nervoso pelo vírus. Em suma, neste trabalho mostramos que, nas condições testadas, alterações agudas da microbiota intestinal ou suplementação *in vitro* com metabólitos da microbiota, AGCCs, não alteraram a resposta à infecção por SARS-CoV-2. Também mostramos dados que indicam que as diferentes linhagens de SARS-CoV-2 impactam de modo diferente a microbiota intestinal e aspectos relacionados à função de barreira do intestino, o que pode ser relevante para as diferenças clínicas entre as mesmas.

**Palavras-chave:** Microbiota intestinal; Ácidos graxos de cadeia curta; SARS-CoV-2; K18-hACE2; Variante Gama.

## ABSTRACT

Patients infected with SARS-CoV-2 show significant changes in the composition and functionality of the microbiota, a condition called COVID-19 associated dysbiosis. These alterations have been associated with lower concentrations of short-chain fatty acids (SCFAs), metabolites that are a link between the microbiota and host cells, including components of the host's immune system. However, the relevance of the intestinal microbiota and its immunomodulatory compounds against SARS-CoV-2 infection is not well established. Thus, the aim of this work was to investigate the effect of treatment with SCFAs and the impact of reducing the intestinal microbial load during SARS-CoV-2 infection. For this, we used an *in vitro* model with intestinal biopsies and human intestinal epithelial cell lineage to evaluate the effect of SCFAs on SARS-CoV-2 infection. We then analyzed *in vivo*, with K18-hACE2 mice, the impact of microbiota depletion after antimicrobial treatment on clinical and immunological responses to SARS-CoV-2 infection. Furthermore, we compared the effects of gamma variant infection (P.1) versus ancestral SARS-CoV-2 infection (B.1) on gut microbiota composition. Our results indicated that SCFAs, when added *in vitro*, despite reducing the expression of important proteins for virus entry and recognition in the host cell, such as TMPRSS2 and DDX58, respectively, did not impact the viral load in epithelial cells or intestinal biopsies. In the animal model of SARS-CoV-2 infection, we demonstrated that depletion of the intestinal microbiota by acute treatment with oral broad-spectrum antimicrobials does not alter post-infection survival and has only punctual effects on the immune response to SARS-CoV-2 indicating that under these conditions the alteration of the microbiota by antimicrobials does not interfere with the development of the disease. Finally, we observed that infection by the gamma variant in K18-hACE2 induced changes in components of the intestinal barrier and in the composition of the microbiota that are more evident than in the case of infection by the ancestral strain. We hypothesized that these changes are related to the severity and virus infection of the nervous system. Briefly, in this work we show that, under the conditions tested, acute changes in the intestinal microbiota or *in vitro* supplementation with microbial metabolites, SCFAs, did not alter the response to SARS-CoV-2 infection. We also show data that indicate that different strains of SARS-CoV-2 have a different impact on the gut microbiota and aspects related to the gut barrier function, which may be relevant to the clinical differences between them.

**Keywords:** Gut microbiota; Short chain fatty acids; SARS-CoV-2; K18-hACE2; Gamma variant.

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
1.1. Características da microbiota intestinal e sua relação com o hospedeiro.....	14
1.2. COVID-19 e o SARS-CoV-2.....	20
1.3. Manifestações clínicas e resposta inflamatória na infecção por SARS-CoV-2.....	27
1.4. Variantes, classificações e definições após três anos do surgimento do SARS CoV-2..	30
1.5. Surgimento da variante gama (P.1) e epidemiologia.....	36
1.6. Principais mutações presentes na variante P.1.....	38
1.7 Atualização sobre aspectos patogênicos da infecção pela variante gama (P.1).....	40
1.8 Sintomas gastrointestinais associados a COVID-19.....	41
1.9 Modelos experimentais para infecção por SARS-CoV-2 e o papel da microbiota intestinal	43
1.10 Tratamento de doenças respiratórias infecciosas com manejo da microbiota intestinal e seus metabólitos.....	45
<b>CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS.....</b>	<b>48</b>
2.1. Objetivo I.....	48
2.2. Objetivo II.....	48
2.3. Objetivo III.....	48
<b>CAPÍTULO 3 – ARTIGO ORIGINAL 1.....</b>	<b>49</b>
Ácidos graxos de cadeia curta derivados da microbiota não interferem na infecção por SARS-CoV-2 em biópsias de cólon humano.....	49
<b>CAPÍTULO 4 – ARTIGO ORIGINAL 2.....</b>	<b>59</b>
Impacto da depleção da microbiota por antimicrobianos orais na resposta clínica e imunológica de camundongos K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2.....	59
<b>CAPÍTULO 5 – RESULTADOS ADICIONAIS.....</b>	<b>79</b>
Comparação dos efeitos da infecção pela variante gama e pelo SARS-CoV-2 original na clínica e composição da microbiota intestinal de camundongos K18-hACE2.....	79
5.1. Introdução.....	80
5.2. Objetivos.....	80
5.3. Materiais e métodos.....	80
5.4. Resultados.....	89
5.5. Discussão.....	107
5.6. Conclusão.....	111
A infecção com a variante gama em camundongos K18-hACE2 induziu alterações em componentes da barreira intestinal e na composição da microbiota que podem estar relacionadas com a maior letalidade observada durante a infecção em comparação com a cepa original B.1.....	111
<b>CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS.....</b>	<b>112</b>
6.1. Qual a relevância dos ácidos graxos de cadeia curta durante a infecção por SARS-Cov-2?.....	112
6.2. Impacto da microbiota intestinal na patogênese da COVID-19: quais modelos experimentais utilizar?.....	114

6.3. Conclusão.....	116
<b>PRODUÇÕES DURANTE O DOUTORADO.....</b>	<b>117</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>131</b>
Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP.....	131
Declaração de direitos autorais.....	133
Laudo necropsia animais K18-hACE 2 infectados pela variante P.1.....	134
Autorização das editoras.....	138

## CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO

### Resumo

Quando o assunto é intestino e COVID-19 uma das primeiras perguntas a ser feita é “o vírus pode alterar a composição da microbiota?” E a resposta é sim, a infecção pelo vírus SARS-CoV-2 pode alterar tanto a microbiota intestinal quanto a dos pulmões. Pacientes com casos mais graves da COVID-19 podem ter alterações mais acentuadas na microbiota devido ao uso de antimicrobianos, e isso tem sido investigado para melhorar as abordagens terapêuticas nesses casos. O impacto da COVID-19 na microbiota intestinal pode ser avaliado inclusive sob um olhar cultural e de mudanças de hábitos. A presença de disbiose, caracterizada por um perfil potencialmente mais inflamatório e com alterações na resposta imunológica, é uma condição presente em indivíduos com obesidade, diabetes ou que estão na fase de envelhecimento. Antes do surgimento da pandemia do SARS-CoV-2 já havia estudos indicando que indivíduos com obesidade ou senis apresentavam maior gravidade e ocorrência de infecções bacterianas oportunistas durante infecções pelo vírus da Influenza. Com a COVID-19 parece que o desequilíbrio da microbiota pode também trazer prejuízos adicionais. Países com maior prevalência de obesidade são os que apresentam também maior taxa de mortalidade pela COVID-19. Durante os primeiros meses de pandemia, países com maior população idosa foram os que apresentaram maior taxa de mortalidade. Importante ressaltar que esses indivíduos apresentam outras características que também prejudicam o funcionamento do sistema imunológico e sua ação na eliminação do vírus, como doenças crônicas e o próprio envelhecimento das células imunes. Entretanto, em estudos prévios envolvendo idosos, o uso de probióticos (alimentos que contém bactérias vivas e benéficas para saúde) e prebióticos (alimentos que possuem nutrientes que são consumidos pelas bactérias intestinais, como as fibras e ajudam a aumentar a quantidade ou a atividade de bactérias benéficas) apresentou muitos benefícios para a resposta imunológica e aumento da eficácia de vacinas para diferentes tipos de vírus da gripe. Portanto, apesar da existência de alterações na microbiota que ocorrem naturalmente durante o processo de envelhecimento e dos desafios no controle da obesidade, estudos envolvendo as abordagens terapêuticas para o melhoramento da composição e atividade da microbiota durante a COVID-19 podem contribuir na redução da mortalidade e melhora da qualidade de vida dessa população.

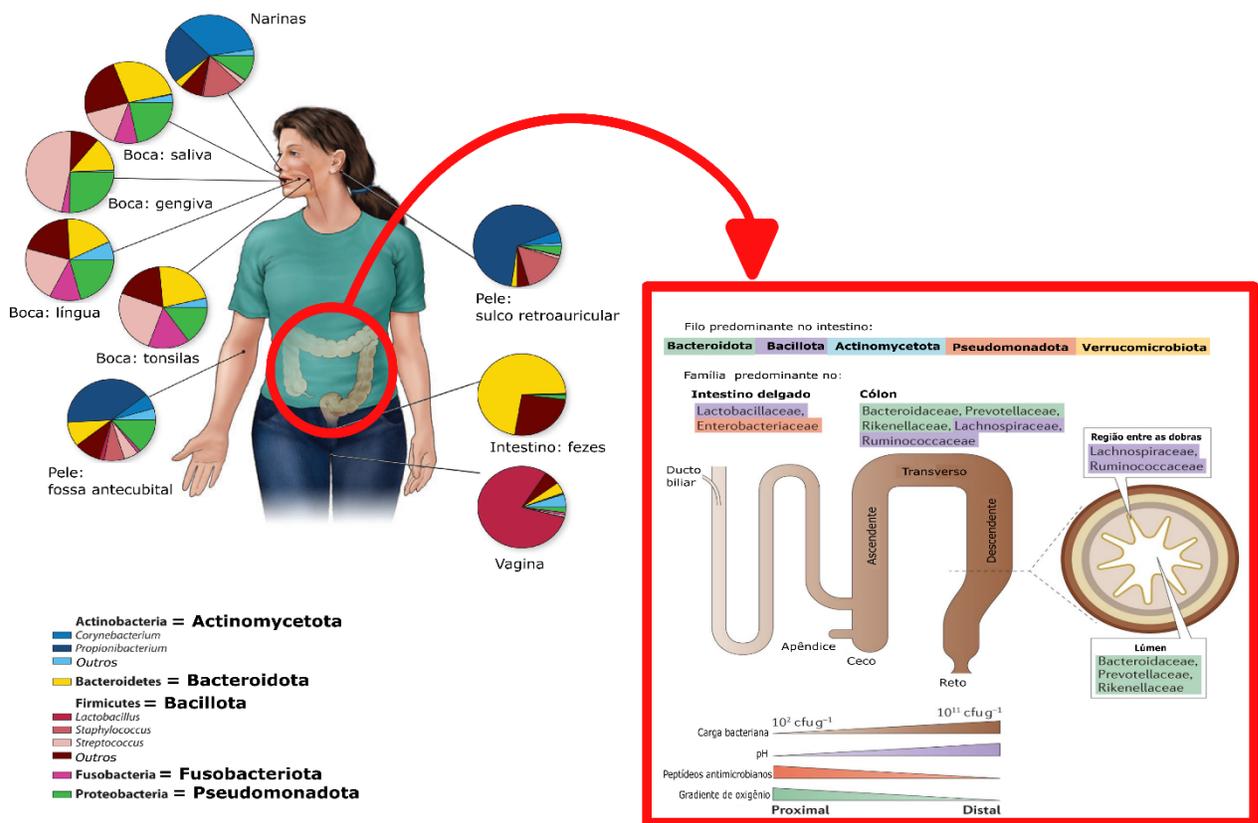
### 1.1. Características da microbiota intestinal e sua relação com o hospedeiro

A origem da palavra Microbiota é Grega e quer dizer “micro” pequeno e “biota” conjunto de organismos que vivem em uma determinada área, formando um ecossistema. Desde o desenvolvimento dos primeiros microscópios, os microrganismos que habitam o interior do trato gastrointestinal começaram a ser propostos como sendo importantes para a manutenção da saúde ou surgimento de doenças no hospedeiro (Author & Leidy, 1914). São mais de 66 mil artigos científicos encontrados na plataforma de busca Pubmed, publicados de 1977 a 2023, se usado o termo em inglês “*gut microbiota*”. A explosão no número de publicações envolvendo microbiota ocorreu principalmente a partir dos anos 2000 com a difusão da Metagenômica. Essa tecnologia de sequenciamento do DNA é capaz de identificar milhares de microrganismos em uma mesma amostra. Com as melhorias tecnológicas foi possível então, avançar nas respostas à questão “quem são?”, e passar a responder “o que são capazes de produzir?” através das “ômicas”, como metagenômica, metabolômica, transcriptômica e proteômica (BERG et al., 2020).

A microbiota está presente em diferentes locais do corpo humano, como pele, boca e órgãos genitais. Cada região apresenta uma composição de microbiota característica, como por exemplo, maior proporção de *Lactobacillus* na vagina, enquanto no intestino, quando analisado via amostras de fezes, os filos *Bacteroidota* (antigo *Bacteroidetes*) e *Bacillota* (antigo *Firmicutes*) são os dominantes (GRICE; SEGRE, 2012) (Figura 1). A microbiota intestinal tem sido considerada como o “segundo cérebro”, devido às suas características e sua relação com vários sistemas e tecidos do corpo. Isso fica evidente quando vemos que a carga de genes presentes na microbiota pode ser até 150 vezes maior do que a quantidade de genes humanos do hospedeiro. Em sua composição a microbiota intestinal inclui bactérias, arqueas, vírus e protozoários, que evoluíram com o hospedeiro (KODIO; MENU; RANQUE, 2020).

De maneira geral, dos 100 trilhões de microrganismos presentes na microbiota intestinal, além dos filos predominantes, *Bacillota* e *Bacteroidota*, há também outros filos incluindo *Actinomycetota* (antigo *Actinobacteria*), *Pseudomonadota* (antigo *Proteobacteria*) e *Verrucomicrobiota* (*Verrucomicrobia*) (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015; OREN; GARRITY, 2021). No entanto, se olharmos mais a fundo dentro de cada filo, a composição de gêneros e espécies que os compõem pode variar de acordo com a porção do intestino tanto horizontal quanto verticalmente e por questões interindividuais. No intestino delgado, a carga bacteriana é menor comparada a do cólon, o que decorre das condições fisiológicas desafiadoras encontradas nesse tecido como pH ácido, fluxo curto e rápido, além de maiores

quantidades de peptídeos antimicrobianos, oxigênio e ácidos biliares. As famílias predominantes nesta região são *Lactobacillaceae* e *Enterobacteriaceae* (DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015). No cólon, o fluxo é mais lento, com pH neutro e menor quantidade de oxigênio, o que garante a prevalência de espécies anaeróbicas. As cinco famílias predominantes nesta região também assumem uma distribuição espacial característica, sendo que na região luminal há maior presença de *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae* e *Rikenellaceae*, enquanto no espaço entre as dobras do epitélio se localizam as *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (Figure 1)(DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015; RINNINELLA et al., 2019).



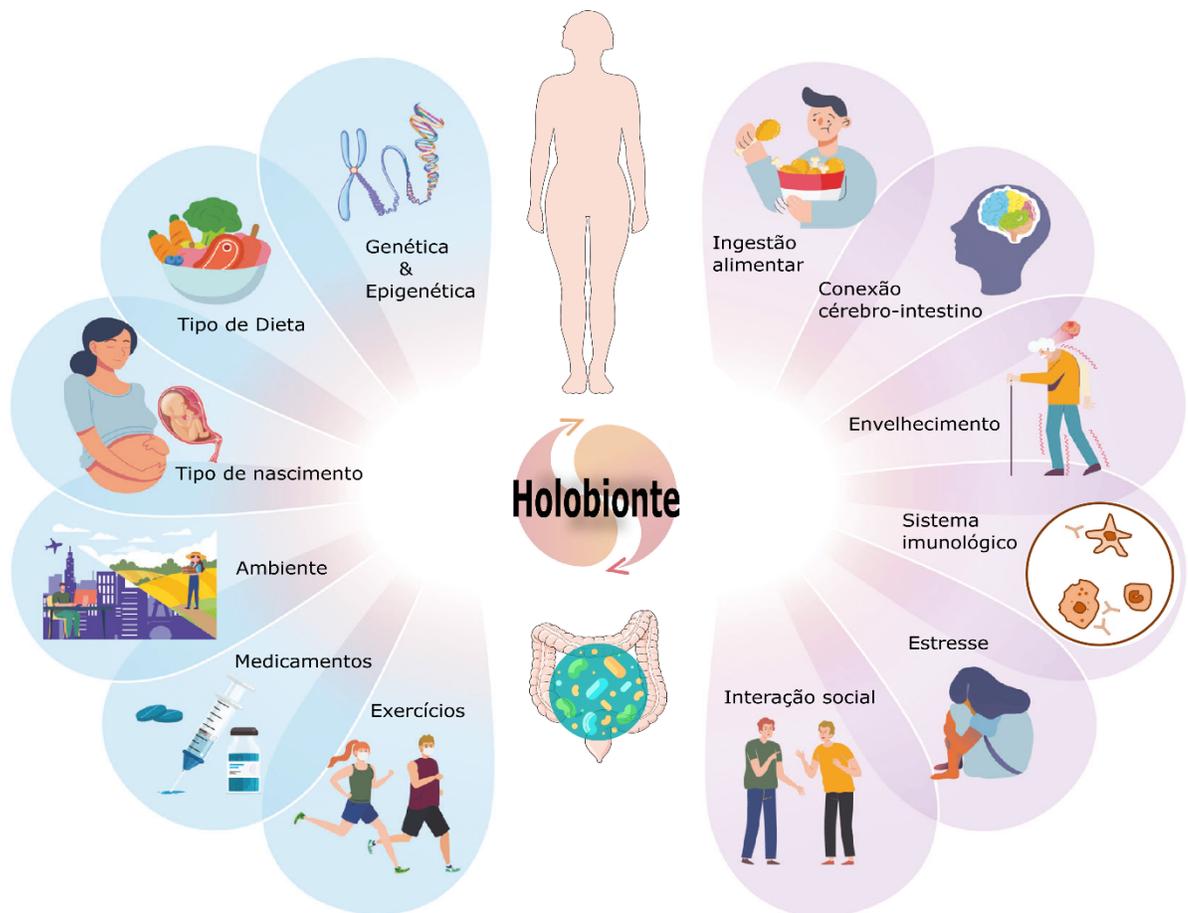
**Figura 1. Composição da microbiota em diferentes regiões do corpo e ao longo do intestino.**

À esquerda, representação da composição da microbiota presente na boca (saliva, gengiva, língua e tonsilas), narinas, pele (fossa ante cubital e sulco retroauricular), vagina e intestino. À direita, representação gráfica da composição da microbiota intestinal de acordo com a região do intestino (intestino delgado ou cólon) e as condições fisiológicas que influenciam na carga e no tipo de comunidade bacteriana da microbiota. Imagem modificada de DONALDSON; LEE; MAZMANIAN, 2015; GRICE; SEGRE, 2012.

A variabilidade interpessoal da microbiota intestinal está relacionada aos fatores intrínsecos e extrínsecos do hospedeiro, como por exemplo, genética, sistema imunológico (intrínsecos), ingestão alimentar, hábitos de vida e geografia (extrínsecos) (HOU et al., 2022; RINNINELLA et al., 2019). As fases da vida como infância, adolescência, vida adulta e velhice também são determinantes para o perfil da composição da microbiota e seu funcionamento (SALAZAR et al., 2019; THRIENE; MICHELS, 2023). O estado nutricional e a gravidez também podem alterar a microbiota intestinal (YANG et al., 2023). Todos esses fatores tornam a relação microbiota-hospedeiro complexa. Vale ressaltar que as interações entre a microbiota e o hospedeiro são bidirecionais, ou seja, tanto fatores do hospedeiro modulam a composição e funcionamento da microbiota, quanto a microbiota é capaz de regular o desenvolvimento e funcionamento das células do hospedeiro (Figura 2). A integração entre as comunidades microbianas e seu hospedeiro eucarionte, e a influência que os fatores externos exercem sobre ela tem sido descrita como a teoria do “Holobionte” (do grego “*holo*” todo, e “*bio*” vida) (SCHNEIDER, 2021). Evidências científicas suportam a idéia de que o holobiome deve ser levado em consideração em estudos sobre a fisiologia do hospedeiro para que haja uma melhor compreensão do funcionamento dos mecanismos (BYNDLOSS; BÄUMLER, 2018; LOW et al., 2021; SIMON et al., 2019). Sendo assim, se a microbiota apresenta equilíbrio em sua estrutura e funcionamento, estado intitulado “eubiose”, ou se está em desequilíbrio “disbiose”, isso poderá corroborar para manutenção da homeostase ou o surgimento de doenças, respectivamente. Em eubiose, a microbiota gera compostos, como por exemplo os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que auxiliam na regulação do metabolismo, do sistema nervoso central e sistema imunológico do hospedeiro (CAMPBELL et al., 2023)

No contexto metabólico, sabe-se que doenças como diabetes, obesidade ou mesmo a síndrome metabólica (surgimento de várias desordens metabólicas em conjunto, por exemplo, obesidade centralizada, hipertensão arterial e dislipidemias, todas relacionadas com a resistência à insulina) estão associadas com um perfil disbiótico da microbiota (EVERARD; CANI, 2013; PINART et al., 2022). Indivíduos com obesidade apresentam uma maior relação de *Bacillota/Bacteroidota*, com aumento principalmente de *Fusobacteria*, *Proteobacteria* e *Lactobacillus (reuteri)*, além de redução em *Verrucomicrobiota (Akkermansia muciniphila)*, *Faecalibacterium (prausnitzii)* e *Lactobacillus plantarum* e *L. paracasei* (EVERARD; CANI, 2013; LIU et al., 2021). Intervenções terapêuticas usadas no tratamento da obesidade que buscam restabelecer o equilíbrio da microbiota, como o consumo de prebióticos (substrato metabolizado

unicamente por microrganismos, gerando metabólitos que conferem benefícios ao hospedeiro), probióticos tradicionais (cepas de microrganismos vivos, normalmente utilizados na fermentação de alimentos, e quando ingeridos em quantidade adequada conferem benefícios à saúde) ou de última geração (espécies de microrganismos recém isolados, por exemplo da própria microbiota intestinal, e que possuem propriedades funcionais) têm sido amplamente testadas em estudos pré-clínicos e clínicos (CANI; DE VOS, 2017; SWANSON et al., 2020; YANG et al., 2021). Em geral, os efeitos positivos desses tratamentos na redução do peso corporal têm sido associados à promoção de melhor controle de barreira da intestinal, o que por sua vez, reflete no controle da inflamação sistêmica de baixo grau e, conseqüentemente, na melhora da sinalização da insulina (CANI; DE VOS, 2017; SALMAN; MAURIELLO, 2023).



**Figura 2. Interação entre o genoma do hospedeiro (fixo) e o microbioma (dinâmico) - conceito de holobionte.**

Fatores interindividuais como forma de nascimento, geografia, hábitos alimentares e de vida, podem determinar a atividade genômica e transcricional da microbiota, promovendo efeitos no hospedeiro humano. Imagem modificada de HOU et al., 2022; LOW et al., 2021, com partes da figura desenhadas usando imagens da Servier Medical Art., licenciada sob “Creative Commons Attribution 3.0 Unported (<https://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>)”.

A conexão existente entre microbiota e a imunidade da mucosa apresenta extensões que vão além do tecido em que está localizada, promovendo interações bidirecionais entre órgãos localizados em diferentes regiões anatômicas do corpo humano, como o intestino e o pulmão (ANAND; MANDE, 2018; BUDDEN et al., 2017; DANG; MARSLAND, 2019; MARSLAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015). Alterações na composição da microbiota intestinal têm sido identificadas em diferentes tipos de infecções respiratórias virais, nas quais podem contribuir para a resposta imunológica do hospedeiro (ANTUNES et al., 2019; ICHINOHE et al., 2011). Ichinohe e colegas utilizando abordagem de depleção da microbiota intestinal através do uso de antimicrobianos em camundongos, verificaram que as alterações provocadas na composição da microbiota intestinal prejudicaram a resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e células B no pulmão durante infecção pelo vírus da influenza A (ICHINOHE et al., 2011).

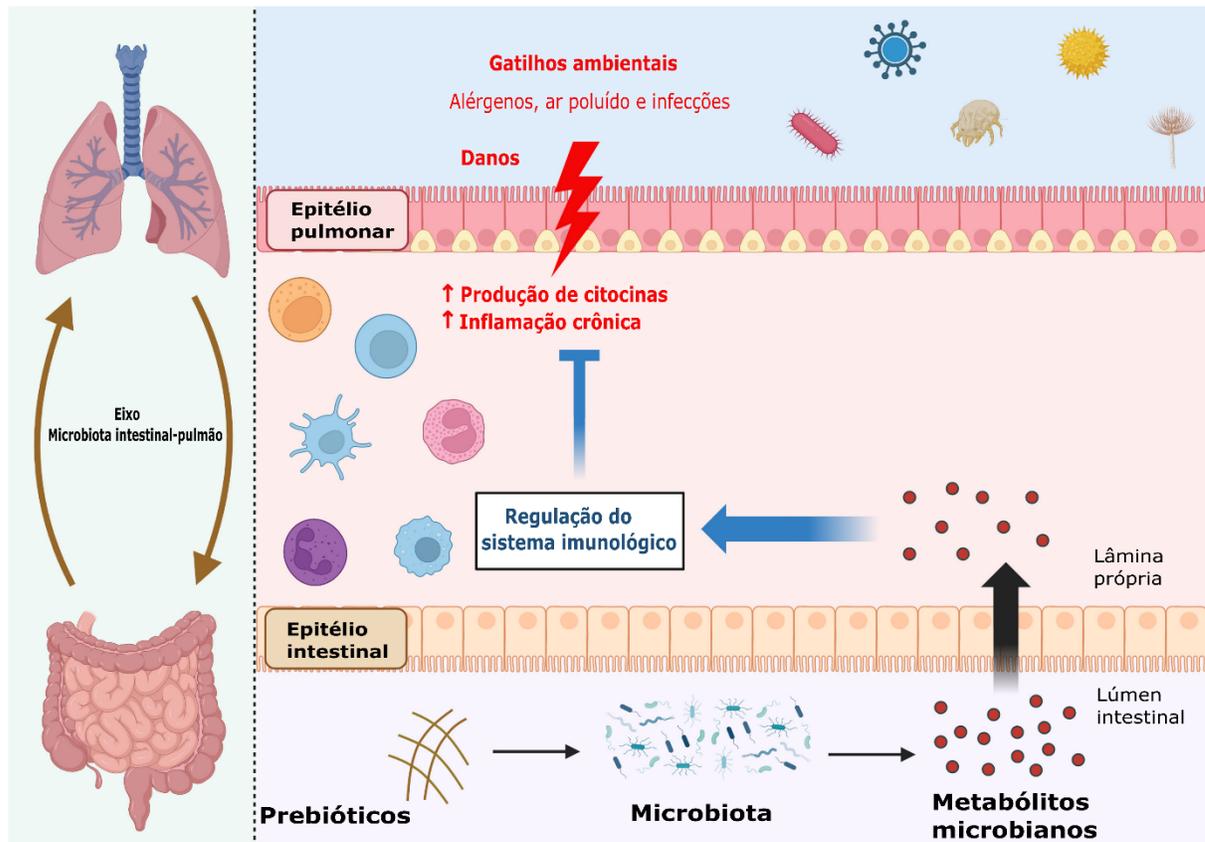
Outras estratégias experimentais permitem verificar o papel da microbiota na regulação do sistema imunológico durante doenças respiratórias, como a terapia com probióticos (GARCIA-CASTILLO et al., 2020; HU et al., 2021a; SAGAR et al., 2014), transplante de microbiota intestinal (JANG et al., 2020), uso de prebióticos (JANG et al., 2021; TROMPETTE et al., 2018) ou através da suplementação com compostos do metabolismo de bactérias, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (ANTUNES et al., 2019; JANG et al., 2020; TROMPETTE et al., 2018).

Os AGCC são ácidos carboxílicos com cauda alifática curta de até 6 carbonos, os principais são acetato (C2), propionato (C3) e butirato (C4). A produção dos AGCC ocorre pelo metabolismo de fibras alimentares por bactérias, principalmente pelos filos *Bacteroidota* (gram-negativas) e *Bacillota* (gram-positivas) (PARADA VENEGAS et al., 2019). As fibras alimentares são carboidratos que não são digeridos pelas enzimas digestivas humanas, isso porque ao contrário do genoma de bactérias, em mamíferos há um limitado número de genes que codificam enzimas responsáveis pela quebra dessas moléculas, garantindo a chegada das fibras praticamente intactas no cólon, onde são utilizadas pela microbiota (FLINT et al., 2012). Atualmente são consideradas fibras alimentares tanto as encontradas naturalmente em alimentos fontes, como grãos inteiros, leguminosas, frutas e vegetais, como também as fibras

que são isoladas de alimentos ou sintetizadas (JONES, 2014). A classificação mais utilizada para as fibras é segundo sua característica de solubilidade em água, em solúvel e não solúvel. As fibras solúveis são as que apresentam maior capacidade de gerar AGCCs por serem altamente fermentáveis (VAN DER HEE; WELLS, 2021). Cada tipo de fibra pode gerar um tipo de AGCC, e estes também apresentam diversos efeitos benéficos à fisiologia do hospedeiro dependendo do tipo celular envolvido.

As concentrações de AGCC totais em humanos são mais elevadas no cólon, entre 70 e 140 mM na região proximal e em geral apresentam a proporção de acetato, butirato e propionato de 60:20:20 (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2016; VENEGAS et al., 2019). No fígado e no sangue periférico as concentrações são de 0,148 mM e 0,079 mM, no entanto os efeitos metabólicos e de modulação do sistema imunológico sistemicamente são apontados em inúmeros trabalhos (CORRÊA-OLIVEIRA et al., 2016; VAN DER HEE; WELLS, 2021; VENEGAS et al., 2019).

Apesar das evidências sobre o papel do eixo microbiota intestinal-pulmão durante a resposta imunológica contra infecções do sistema respiratório (Figura 3) (CORRÊA et al., 2022; MARS LAND; TROMPETTE; GOLLWITZER, 2015; SENCIO; MACHADO; TROTTEIN, 2021; TROMPETTE et al., 2018), ainda há lacunas a serem preenchidas, principalmente no que concerne aos mecanismos envolvidos. Portanto, são necessários mais estudos envolvendo a microbiota e seus metabólitos que caracterizem não apenas o efeito do microbioma sobre o hospedeiro, mas também, em tempos pós pandêmicos de COVID-19, se tornou extremamente importante entender qual o impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre a microbiota intestinal.



**Figura 3. Eixo microbiota intestinal-pulmão na regulação da resposta imunológica no pulmão durante infecções ou alergias.**

A comunicação entre a microbiota intestinal e os pulmões pode ocorrer via moléculas produzidas pelo metabolismo microbiano, de modo que o consumo de prebióticos pode regular a resposta imunológica das vias aéreas e promover controle da inflamação crônica. Figura adaptada de (CORRÊA et al., 2022)

## 1.2. COVID-19 e o SARS-CoV-2

A doença causada pelo coronavírus de 2019 (COVID-19) surge em decorrência da infecção pelo vírus SARS-CoV-2, em inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*. Os primeiros relatos da COVID-19 surgiram em dezembro de 2019 em Wuhan (China) e os casos dessa doença posteriormente se espalharam pelo mundo gerando uma crise global na saúde pública e na economia (WHOa, 2021). Doenças infecciosas causadas por coronavírus em humanos, como a SARS-CoV e a MERS-CoV, sigla para o termo inglês "*Middle East respiratory syndrome coronavirus*", anteriormente já haviam impactado milhares de pessoas, apresentando taxa de mortalidade em torno de 9,5% e 35%, respectivamente (ARABI et al.,

2017; PEIRIS; GUAN; YUEN, 2004). Diferentemente de outros 6 tipos de coronavírus cuja infecção apresenta sintomas mais leves, a infecção pelo SARS-CoV-2 pode apresentar sintomas leves, moderados, graves e até fatais. Mundialmente, foram reportados à Organização Mundial da Saúde, até o dia 10 de maio de 2023, mais de 765 milhões de casos confirmados de COVID-19, incluindo a morte de quase 7 milhões de pessoas (WHO, 2021).

Inicialmente, em janeiro de 2020, o vírus causador da COVID-19 foi nomeado como “novo coronavírus” pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e foi postulada a hipótese de que seu surgimento poderia ter ocorrido por zoonose com transmissão de morcegos para humanos. Apesar de especulações de que o vírus tenha sido criado em laboratório, estudos genéticos e de evolução do vírus apontam como improvável a hipótese de manipulação humana, e direcionam para duas possíveis vias associadas ao surgimento do SARS-CoV-2: 1) seleção natural em um hospedeiro animal intermediário, antes da zoonose, ou 2) seleção natural diretamente em humanos após a transmissão pelo agente zoonótico (ALWINE et al., 2023)

Nos primeiros meses de pandemia, o que se observou nos dados epidemiológicos, ainda na China, foi que 81% dos casos apresentavam sintomas leves, enquanto 14% eram graves e 5% eram casos críticos, além de mortalidade de 2,3%. Países com maior proporção de população idosa, como a Itália, neste mesmo período, apresentaram mortalidade superior a 7% nos casos de COVID-19 (DHAR CHOWDHURY; OOMMEN, 2020). No Brasil, já no início da pandemia em fevereiro de 2020, decretou-se estado de emergência. Contudo, o vírus se espalhou rapidamente e de modo muito amplo no país, sendo que em julho deste ano a epidemia de COVID-19 no Brasil tinha mais de 1,8 milhões de casos confirmados, ou seja mais da metade dos casos na América Latina, além de 72.100 casos de mortes (DE SOUZA et al., 2020). Em comunicado feito pela CDC (“*Center for Diseases Control and Prevention*”) em maio de 2021 sobre as principais formas de transmissão do SARS-CoV-2 cientificamente comprovadas foram destacadas três rotas de transmissão: (1) inalação de gotículas ou aerossóis contaminados com o vírus, em que a carga viral exposta, está relacionada à fatores como: maior proximidade ao vetor e condição do ambiente, como calor e umidade; (2) Deposição do vírus em gotículas, através de tosse ou espirros, nas mucosas expostas como boca, nariz e olhos; (3) Toque em mucosas por mãos contaminadas por fluídos contendo o vírus (por exemplo, por gotículas expelidas por uma pessoa com COVID-19) ou por tocar anteriormente em superfície contendo secreções contaminadas. O CDC orienta que as medidas de boas práticas de higiene das mãos, uso de máscara e o distanciamento social sigam sendo

aplicadas por apresentarem eficácia na prevenção do contágio independente da rota de transmissão (CDC, 2021).

Após um ano de pandemia de COVID-19, mesmo depois de iniciada a vacinação em larga escala em diversas partes do mundo, o número de mortes ainda crescia em regiões em que havia novas variantes do SARS-CoV-2, como no caso do continente africano, onde o aumento do número de casos e mortes pode ser explicado pela baixa cobertura vacinal (WHOc, 2021).

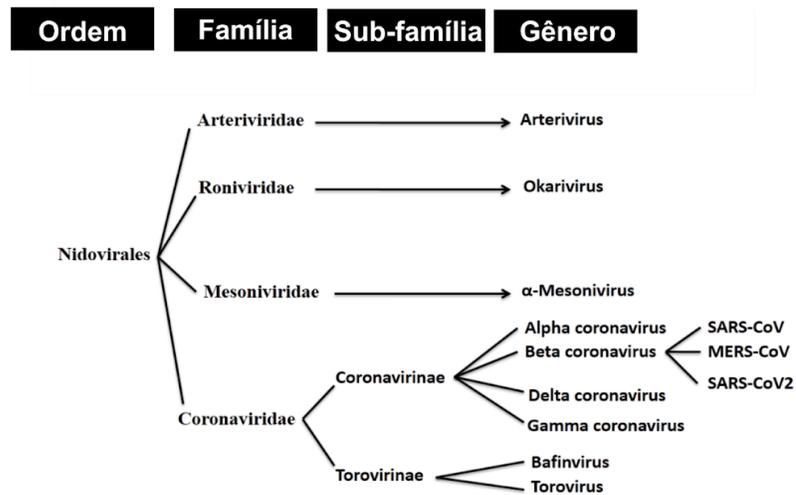
O cenário de pandemia promoveu revoluções científicas e políticas em todo mundo, por exemplo ao romper barreiras no processo de elaboração de vacinas em um tempo recorde, além de estreitar a distância entre a comunidade e a academia científica, tornando público o interesse por assuntos técnicos, como metodologias para desenvolvimento de vacinas, bem como seus mecanismos de ação no corpo (EURIDES; MARQUES, 2020; KIM; DEMA; REYES-SANDOVAL, 2020; NEVES et al., 2021). No entanto, características do SARS-CoV-2 como fácil transmissão e desenvolvimento de mutações, fizeram com que outros assuntos ademais aos relacionados à tecnologia científica de combate ao vírus, se tornassem também primordiais para o controle da doença. Questões como a distribuição desigual das vacinas para países pobres ou em desenvolvimento, desigualdade no acesso à educação, e fenômenos como a polarização política, teorias da conspiração e desinformação sobre a COVID-19, além do crescimento de anti-intelectualismo, prejudicaram o debate público, a compreensão e a adoção de políticas protetoras no contexto da pandemia (BERGEN et al., 2023; FARHART et al., 2022). Portanto, se fazem necessários tanto o contínuo avanço em pesquisas científicas de base, relacionadas ao vírus propriamente dito, como também avanço e maior interdisciplinaridade em pesquisas políticas e sociais (ALBRECHT, 2022).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de fita simples com polaridade positiva, o que o diferencia de outros vírus de RNA de fita simples pela especificidade de sua RNA-polimerase, o que impacta no desenvolvimento, especificidade e mecanismos de ação de antivirais que bloqueiam essa enzima. Por serem vírus com genoma de RNA de fita simples, os coronavírus são classificados como ordem *Nidovirales*, depois família *Coronaviridae*, subfamília *Orthocoronavirinae* ou *Coronavirinae* e então, dentro desta subfamília são divididos em gêneros alfa, beta, delta e gama (Figura 4a). O SARS-CoV-2 foi classificado como beta-coronavírus, assim como outras duas linhagens associadas à uma origem zoonótica e causadoras de doenças fatais, o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o Coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (REHMAN et al., 2020).

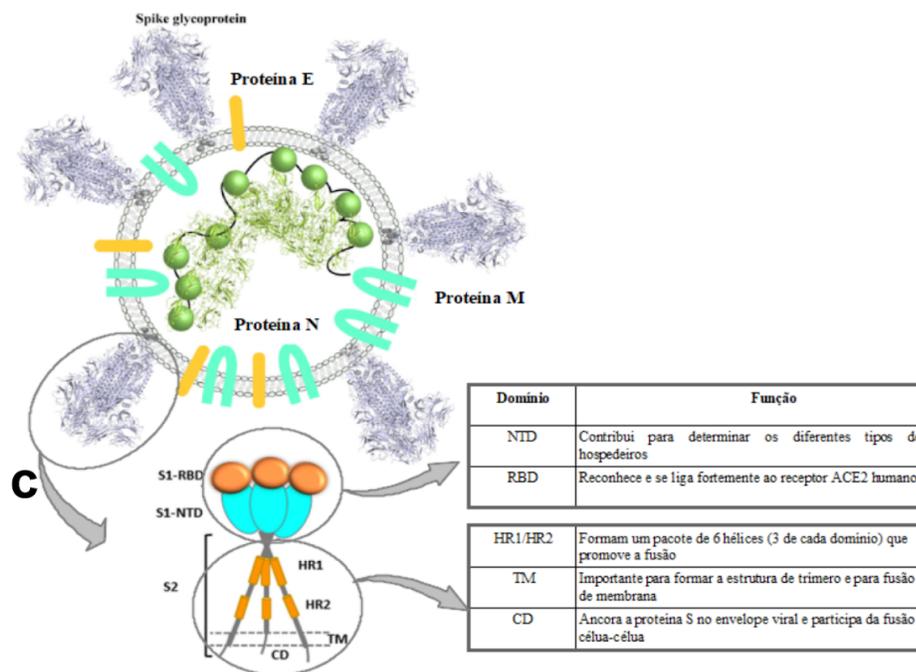
O vírus apresenta quatro proteínas estruturais importantes para suas funções de ligação e invasão de células do hospedeiro: Spike (S), proteínas de envelope (E), de membrana (M) e do nucleocapsídeo (N). As proteínas S, E e M estão localizadas na parte externa e juntamente com a bicamada fosfolipídica formam o envelope viral. Enquanto a proteína N apresenta formato helicoidal e está localizada na parte interna, ligada ao RNA viral (Figura 4b). A proteína S distribuída ao longo de todo envelope viral, confere um aspecto de pequenas coroas à superfície do vírus pois apresenta uma estrutura composta por uma cabeça com três partes S1 e uma porção trimérica composta pela S2 que forma o “talo”, ou região transmembrana da glicoproteína S (Figura 4c) (AKRAM; MANNAN, 2020; MARIANO et al., 2020).

Existem outras 16 proteínas não estruturais, em inglês *non-structural proteins* (Nsp), que compõem o SARS-CoV-2, e apresentam funções relacionadas ao ciclo de replicação viral, além de 9 proteínas acessórias (Orf3a, Orf3b, Orf6, Orf7a, Orf7b, Orf8, Orf9b, Orf9c e Orf10) (LAN et al., 2022; PRATES et al., 2020). Algumas dessas proteínas podem atuar também como bloqueadores do sistema imunológico, por exemplo Nsp1, Nsp3, Orf3b e Orf6, bloqueiam a sinalização intracelular que promove o reconhecimento do vírus pelos sensores citosólicos RIG-I e MDA-5 relacionados à produção dos IFN tipo I e III (PARK e IWASAKI, 2020).

a



b



**Figura 4 . Filogenia e esquema gráfico da estrutura completa (Virion) do SARS CoV-2.**

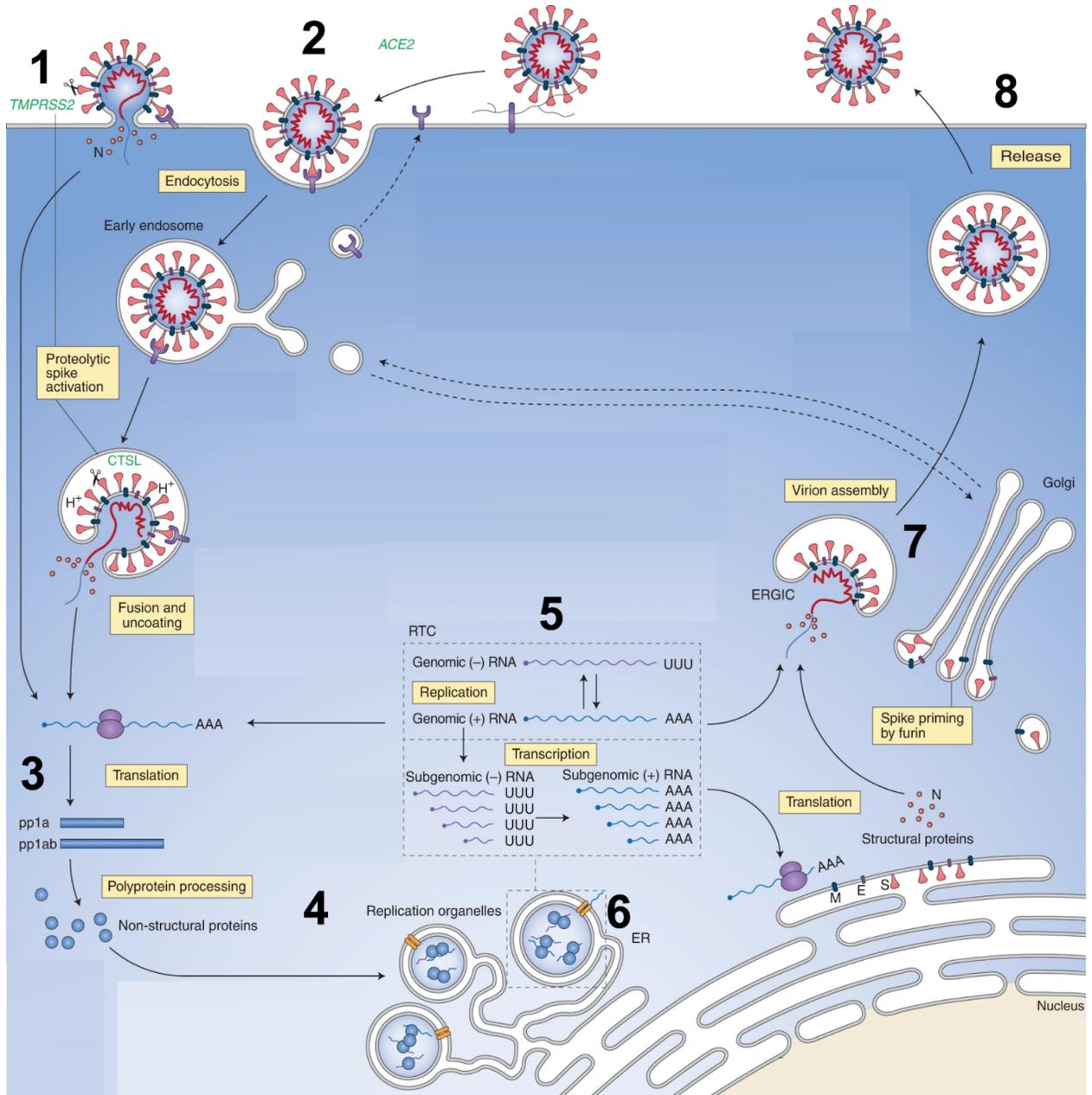
Virion do SARS CoV-2 que possui cerca de 120 nanômetros de diâmetro e detalhes da glicoproteína Spike. **a)** Filogenia dos CoV, mostrando a classificação taxonômica do SARS-CoV-2 no gênero dos Beta-coronavírus. Adaptada de Rehman, Saif Ur et al.(Pathogens., 2020). **b)** Representação composta pela estrutura molecular da proteína Spike (S) (PDBID: 6VXX), disposta ao redor da parte externa da bicamada lipídica, juntamente com as representações coloridas da proteína de Membrana (M) (em azul) e a proteína Envelope (E) (em amarelo). No interior da bicamada lipídica, a estrutura molecular da porção n-terminal da proteína do Nucleocapsídeo (N) (PDBID: 6M3M) e sua porção c-terminal representada por círculos (em verde). Seu tamanho relativamente grande e a composição fosfolipídica do envelope tornam

possível a aplicação de diferentes estratégias de inativação por rompimento desse envelope, como por exemplo, uso de agentes químicos solventes detergentes, aplicação de calor ou incubação em solução de pH baixo. Adaptado de Mariano, G. et al. (Front. Mol. Biosci., 2020). **c)** Desenho tridimensional da proteína Spike com detalhes de suas subunidades e respectivos domínios. A subunidade S1, forma o que seria a “cabeça” da proteína S e contém os domínios C-terminal, nos quais está localizada a região RBD que apresenta forte atração de ligação ao receptor ACE2, e o domínio N-terminal, onde está localizada a região NTD possivelmente associada a gama de hospedeiros. A subunidade S2 forma o “talo”, que de maneira geral apresenta importante papel para a fusão da vesícula viral com a membrana da célula hospedeira. Os domínios HR1 e HR2 (do inglês “*heptad-repeat domain*”) formam a região do núcleo de fusão, pois quando interagem entre si formam uma nova estrutura facilitando a interação entre a região hidrofóbica do envelope dentro da membrana plasmática da célula hospedeira, promovendo a fusão entre as membranas viral e do hospedeiro e então ocorre a liberação do RNA viral no citoplasma da célula. Adaptado de Zhu, C. et al. (J. Med Virol, 2021).

O mecanismo de entrada na célula do hospedeiro humano ocorre pela ligação do vírus ao receptor ACE2 (em inglês “*Angiotensin Converting Enzyme 2*”) presente na superfície da célula alvo. Em seguida ocorre clivagem da proteína S por meio da atividade de proteases de membrana, como a TMPRSS2 (em inglês “*Transmembrane Protease Serine 2*”) ou outras enzimas, como a TMPRSS4 e a HAT (do inglês “*Human Airway Trypsin-like*”), que torna possível a fusão entre a membrana do envelope viral e a membrana da célula, e consequentemente, a liberação do material genético viral no interior da célula hospedeira (MURGOLO et al., 2021) (Figura 5). Além disso, foi visto que muitos tecidos infectados apresentam pouca expressão de ACE2 e/ou nenhuma expressão de TMPRSS2 (ZHOU et al., 2020). Nesse caso a infecção ocorre, sendo essa a via clássica e ancestral de entrada do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro. A entrada via TMPRSS2, foi um ganho de função viral evidenciando a adaptabilidade desse vírus nos mamíferos, em especial, em humanos. A via clássica de entrada do vírus ocorre por via endocítica, envolvendo compartimento endossomal e lisossomal, além da protease lisossomal catepsina, sendo a catepsina L específicas em humanos, como enzima para processamento e ativação da proteína S (MURGOLO et al., 2021). No entanto, ainda há muitas lacunas para o entendimento de como ocorre a ativação da proteína Spike dentro da vesícula endossomal, visto que a posição de clivagem pela catepsina é em uma região diferente da de clivagem por TMPRSS2 (MURGOLO et al., 2021).

Após a entrada do vírus na célula hospedeira, independente se por fusão com a membrana ou endocitose, o RNA viral atinge o citoplasma e inicia-se o processo de replicação

viral que envolve as etapas de transcrição, tradução, montagem e liberação de novos vírions (Figura 5).



**Figura 5. Esquema gráfico do processo de entrada, replicação e liberação do SARS-CoV-2 na célula hospedeira.** 1) O vírus tem acesso ao citoplasma da célula por fusão entre seu envelope e a membrana plasmática, via ligação ao receptor ACE2 seguida da ativação da proteína viral Spike pela proteína TMPRSS2 ou outras proteases que clivam em regiões específicas da subunidade S2, promovendo assim a ligação entre as bicamadas fosfolipídicas do vírus e da célula. 2) A entrada do SARS-CoV-2 também pode ocorrer via endocitose, pela ligação com receptor ACE2 seguida da formação do endossoma que sofre fusão com vesícula de lisossoma e possibilita ativação da proteína S2 via

clivagem pela cathepsina, promovendo a abertura do envelope viral e liberação do RNA no citoplasma. **3)** O processo de replicação viral inicia-se pela tradução das poliproteínas pp1a e pp1ab. **4)** Essas proteínas são processadas autocataliticamente nas proteínas não estruturais nsp1-16, que estabelecem a formação de um complexo de transcrição e replicação (RTCs) e remodelam as membranas celulares para formar organelas de replicação. Essas organelas são contínuas com o retículo endoplasmático (ER) e fornecem um ambiente ideal para a replicação do RNA viral, que ocorre principalmente dentro de vesículas de membrana dupla (DMVs). **5)** A replicação do genoma começa com a síntese de uma cópia de fita negativa (-) que funciona como modelo para a síntese de novos genomas de RNA de fita positiva, que podem entrar em mais rodadas de tradução ou serem incorporados em novos vírions. A transcrição descontínua do RNA genômico de fita positiva produz RNAs subgenômicos de fita negativa, que funcionam como modelos para a síntese de RNAs subgenômicos de fita positiva que codificam proteínas estruturais e acessórias. **6)** RNAs virais nascentes saem das DMVs através de um poro transmembrana para alcançar locais de tradução ou montagem de virions. **7)** O RNA genômico de fita positiva, encapsulado por proteínas N, bem como as proteínas estruturais S, M e E, reúnem-se no compartimento intermediário do retículo endoplasmático rugoso (ERGIC), no qual novos vírions se formam. **8)** Então os vírions são liberados por exocitose das células hospedeiras. Adaptado de Baggen, Jim et al. (Nature microbiology, 2021).

### **1.3. Manifestações clínicas e resposta inflamatória na infecção por SARS-CoV-2**

Segundo a Organização Mundial da Saúde, o período de incubação (tempo que leva para surgirem os sintomas após infecção) do SARS-CoV-2 é em média 5 dias, podendo se estender em até 14 dias. Os sintomas mais comuns são febre, tosse seca e fadiga. No entanto, os sintomas podem variar muito podendo incluir perda do paladar, dor de cabeça, dor de garganta, conjuntivite, náusea ou vômito, diarreia, calafrios ou tonturas. Durante a COVID-19 grave, os sintomas mais comuns podem incluir perda do apetite, dor persistente ou pressão no peito, febre alta (>38°C), déficit respiratório e baixa na saturação de oxigênio (WHOe, 2020).

A classificação do nível da COVID-19 observados sob os aspectos clínicos, segundo as Diretrizes de tratamento da doença por coronavírus 2019 (COVID-19), criado pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH), pode ser: Leve (febre, tosse, dor de garganta, mal-estar, dor de cabeça, dor muscular, náusea, vômito, diarreia, perda de paladar e olfato), mas sem dificuldade em respirar ou imagens torácicas anormais; moderada (problemas respiratórios inferiores observados em avaliação clínica ou imagem, e uma saturação de oxigênio de 94% ou superior no ar ambiente ao nível do mar); grave (saturação de oxigênio

abaixo de 94% no ar ambiente ao nível do mar, baixa proporção de oxigênio no sangue em relação ao oxigênio inalado, frequência respiratória elevada ou infiltrados pulmonares significativos); crítica (insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos) (NIH, 2023).

As características clínicas associadas à resposta imunológica e carga viral de pacientes hospitalizados por COVID-19 podem variar ao longo do tempo e influenciar o desenvolvimento da doença e evolução dos pacientes (LUCAS et al., 2020). Durante a COVID-19 também podem ocorrer manifestações extrapulmonares, como lesão em tecido renal, cardíaco e nervoso, além de complicações dermatológicas, hepáticas e gastrointestinais (GUPTA et al., 2020). As alterações laboratoriais mais comuns verificadas em sangue periférico durante a COVID-19 incluem elevação de proteína C reativa e da enzima lactato desidrogenase, além de redução no número de plaquetas (trombocitopenia) e linfócitos (linfopenia) (FUZIO et al., 2023).

São vários os mecanismos propostos para explicar como a infecção por SARS-CoV-2 pode causar tantas complicações, mas em resumo destacam-se quatro: (1) dano celular causado diretamente pelo vírus; (2) desregulação do sistema renina angiotensina com redução da angiotensina I e II, em decorrência da redução da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2 ou ACE2 sigla em inglês) relacionada à entrada do vírus; (3) lesão endotelial e trombo-inflamação e (4) desregulação da resposta imune e hiper-inflamação (GUPTA et al., 2020).

Quando células do epitélio pulmonar são infectadas, liberam citocinas inflamatórias que ativam células imunes residentes do tecido, como as células linfóides inatas (ILC), macrófagos intersticiais, linfócitos, fibroblastos, células dendríticas, além de pericitos localizados em vasos sanguíneos próximos (ALON et al., 2021). Essas citocinas podem atingir a medula óssea pela circulação sanguínea e aumentar a produção de leucócitos importantes para resposta imune inata e remoção de células infectadas, como neutrófilos, monócitos e células Natural killers (ALON et al., 2021).

A primeira etapa envolvida na ativação do sistema imune inato na infecção por SARS-CoV-2 é o reconhecimento do RNA viral por receptores citosólicos de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PRR), como os "*Toll-Like Receptors*". Os receptores TLRs quando ativados podem induzir a produção de citocinas inflamatórias, via ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B, IRF (*IFN regulatory factors*) e AP-1 (*Activator protein 1*) (OECKINGHAUS, A., Hayden, M. & Ghosh, S., 2011). Estudos têm demonstrado que os receptores MAVs, da sigla em inglês "*mitochondrial antiviral-signaling protein*", os TLR2, 3, 4 e 7 apresentam papel importante na produção de citocinas durante infecção pelo SARS-CoV-2 (PARK e IWASAKI, 2020; YAMADA, T., Takaoka, A., 2023). De maneira geral,

durante a COVID-19 há o aumento exacerbado da produção de citocinas inflamatórias como interleucina (IL)-1, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, interferon (IFN)- $\gamma$ , CXCL10 e CCL2, processo chamado de “tempestade de citocinas” (SCHIRMER et al., 2016). Em relação à produção pulmonar de IL-1 $\beta$  e IL-6 durante a COVID-19 as principais células envolvidas são macrófagos e células epiteliais, respectivamente, enquanto a expressão de IFN do tipo I é abundante em diferentes tipos celulares incluindo células epiteliais alveolares do tipo II (AT2), monócitos e macrófagos (MELMS, 2021). Outro importante PRR ativado durante infecções por vírus de RNA é o RIG-1, sigla do inglês “*Retinoic Acid-Inducible Gene 1*”. Após o reconhecimento, este receptor ativa a via de sinalização do fator de transcrição IRF3/7 (do inglês “*Interferon regulatory factors*”) responsável pela ativação de transcrição de IFN do tipo I, que induzirá a resposta antiviral via células Th1 e outros tipos celulares (YAMADA et al., 2021). Apesar de haver estudos relacionando possível bloqueio da resposta antiviral pelo SARS-CoV-2 por interferência na sinalização de RIG-1 e, conseqüentemente, repercutindo em menores concentrações de IFN- $\beta$ , os mecanismos ainda não foram elucidados (CHEN et al., 2021; YAP; MORIYAMA; IWASAKI, 2020).

O recrutamento de células imunes para o pulmão durante a COVID-19 está associado com a progressão da infecção: diferentes perfis de produção de quimiocinas são observados dependendo do grau da doença, se leve, moderado ou grave (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021). As principais quimiocinas induzidas durante a infecção com SARS-CoV-2 atuam na atração de monócitos, CCL8 e CXCL10; macrófago, CCL2; neutrófilos, CXCL8 e CXCL2; células NK, CXCL9 e linfócitos T como a CXCL16, sendo que em pacientes com quadro grave há um aumento expressivo de CCL2, CXCL8 e CXCL10 (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021).

A resposta imune adaptativa é essencial durante infecções virais, pois abrange aspectos essenciais no combate ao patógeno, como por exemplo a eliminação de células infectadas para conter a replicação do vírus, além da neutralização de vírus já liberados por meio da atividade humoral (TAVARES, 2020). A eliminação de células infectadas é feita por linfócitos T CD8<sup>+</sup> através da indução de apoptose via ação de granzimas e perforinas. A produção efetiva de anticorpos pelas células B depende da cooperação com linfócitos T CD4<sup>+</sup>, pois é através dessa interação que ocorrem sinais de indução para que a célula B se torne de vida longa (célula B de memória) e produza anticorpos com maior avidéz (AZKUR et al., 2020).

Pacientes com COVID-19 apresentam linfopenia com reduções de populações de LT CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, sendo que os casos que necessitam de cuidado em terapia intensiva (UTI) possuem maiores reduções comparados aos moderados (DIAO et al., 2020). Além disso, a

exaustão funcional de células citotóxicas tem sido associada à infecção por SARS-CoV-2 (ALON et al., 2021; AZKUR et al., 2020; DIAO et al., 2020; TAVARES, 2020).

Ainda são necessários mais estudos para aprofundar o conhecimento a respeito dos mecanismos implicados na patogenicidade da COVID-19, visto que além da variedade de fatores inerentes ao indivíduo, como por exemplo comorbidades que podem modificar a forma como o sistema imunológico irá responder ao SARS-CoV-2, também há a variedade do próprio vírus que sofre mutações e pode apresentar diferenças na capacidade de infectar ou de escapar dos mecanismos de defesa do hospedeiro.

#### **1.4. Variantes, classificações e definições após três anos do surgimento do SARS CoV-2**

O descontrole na circulação de um vírus de fácil transmissão favorece o surgimento de novas variantes. As variantes são originadas de alterações no material genético (mutações) que propiciam ao vírus algum tipo de vantagem para sua sobrevivência em mecanismos relacionados à sua replicação, transmissão ou escape do sistema imunológico, tornando-se dominante em relação às outras linhagens (GÓMEZ; PERDIGUERO; ESTEBAN, 2021). O compartilhamento de mutações entre variantes originárias de diferentes regiões do planeta pode ser um sinal de alerta ao descontrole nos níveis de transmissão. Termos como mutação, linhagem, sublinhagem, variantes (e suas classificações), e recombinação são chaves para acompanhar a literatura epidemiológica relacionada ao SARS-CoV-2. O conceito desses termos é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1.** Termos chaves no contexto de variantes do SARS-CoV-2

<b>Termo</b>	<b>Definição</b>
Mutação	Uma mutação refere-se a uma única alteração no genoma de um vírus (código genético). As mutações ocorrem com frequência, mas apenas algumas vezes alteram as características do vírus.
Linhagem	Uma linhagem é um grupo de vírus intimamente relacionados com um ancestral comum. O SARS-CoV-2 tem muitas linhagens; todos causam COVID-19.
Sublinhagem	Um termo usado para definir uma linhagem no que se refere a ser um descendente direto de uma linhagem parental. Por exemplo, BA.2.75 é uma sublinhagem de BA.2.
Variantes	Uma variante é um genoma viral (código genético) que pode conter uma ou mais mutações. Em alguns casos, uma linhagem ou grupo de linhagens com alterações genéticas semelhantes pode ser designada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ou pelo Grupo Interagência SARS-CoV-2 dos EUA (SIG) como Variante de Interesse (VOI), Variante de Preocupação (VOC), Variante de Alta Consequência (VOHC) ou Variante Sendo Monitorada (VBM) devido a atributos e características compartilhadas que podem exigir ação de saúde pública.
Recombinação	Um processo no qual os genomas de duas variantes do SARS-CoV-2 se combinam durante o processo de replicação viral para formar uma nova variante diferente de ambas as linhagens parentais. Isso pode ocorrer quando uma pessoa está infectada com duas variantes ao mesmo tempo. A linhagem que resulta da recombinação é chamada de “recombinante”.

CDC. *Center for Disease Control and Prevention – CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People. SARS-CoV-2 Variant Classification and Definitions.* Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#>>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

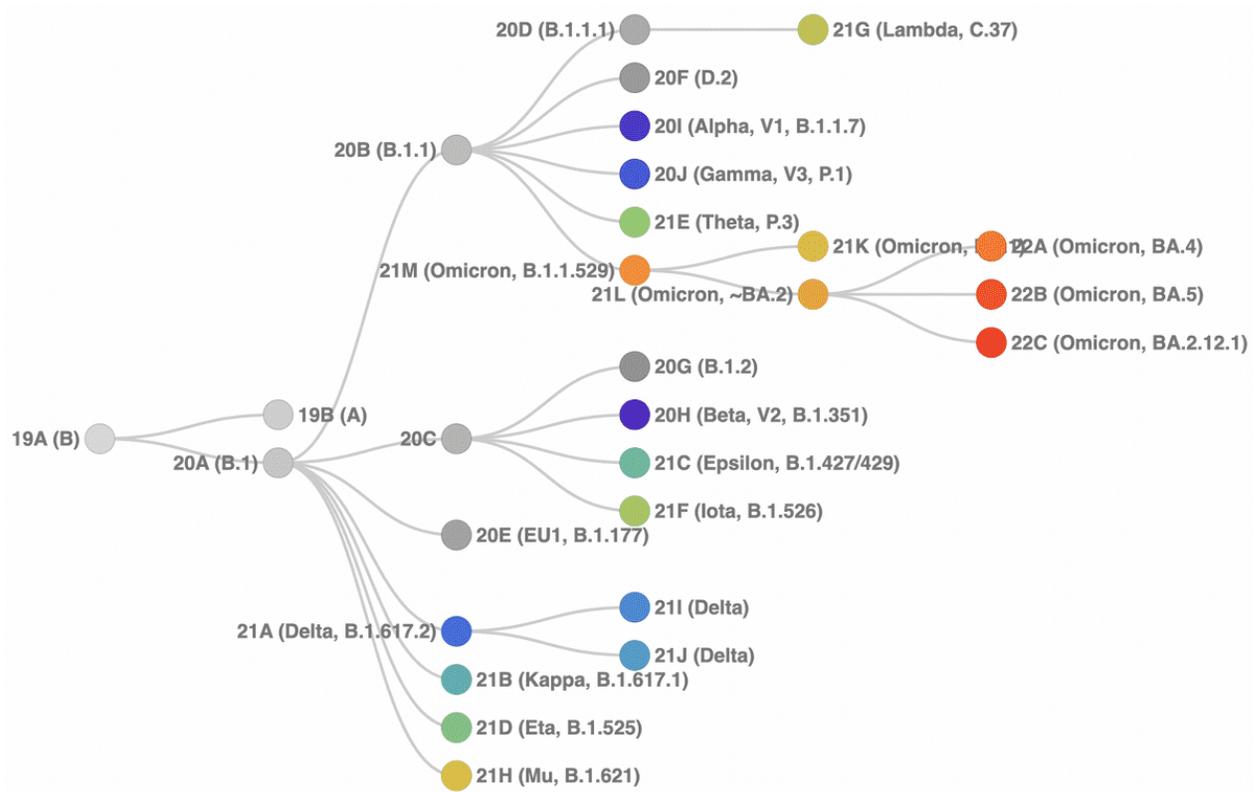
Para ser considerada uma VOC, a linhagem mutada deve apresentar algum impacto em parâmetros clínicos e de saúde pública o que pode decorrer de alterações em sua transmissibilidade, virulência, na efetividade das vacinas e/ou dos testes usados no diagnóstico. Na classificação de uma VOI, a variante pode apresentar semelhanças em sua estrutura molecular com alguma VOC, porém, devido a necessidade de mais estudos de avaliação até o momento de sua classificação, esta não é considerada uma VOC (PHO, 2021). São consideradas VOHC, variantes que impactam nas medidas médicas de contenção, como por exemplo, falha nos testes de diagnóstico, redução significativa na eficácia da vacina, aumento desproporcional no número de casos, além de doença clínica grave e aumento das hospitalizações (CDC, 2023). As variantes classificadas como VBM são linhagens cujos dados indicam que há um impacto potencial ou claro nas medidas médicas de contenção, e que causam doença grave, porém que não estão mais em circulação. Outra característica que permite classificar variantes anteriormente VOI, VOC ou VOHC como uma VBM, é estarem circulando em níveis muito baixos nos Estados Unidos e não representarem um risco significativo e iminente para a saúde pública (CDC, 2023). São apresentadas na tabela 2 a atualização de maio de 2023 para a classificação das variantes.

O time de Bedford e Neher propuseram em 2022 uma maneira simplificada para nomear as linhagens e sublinhagens do SARS-CoV-2 para facilitar o rastreamento e permitir uma designação mais flexível e rápida de clados à medida que novas variantes aparecem e se espalham (Nextstrain, 2022). A nomenclatura consiste no uso do ano de surgimento e letra para ordenar a sequência desses surgimentos, tornando os nomes curtos, claros e fáceis para pronunciar e representar nos clados filogenéticos (Figura 6) (Tabela 3). Com a nomenclatura simplificada permitiu-se representar as diferenças na biologia ou na circulação, e então receber uma classificação pela OMS.

**Tabela 2.** Lista de variantes do SARS-CoV-2

<b>Nome da variante</b>	<b>Linhagem (Pango)</b>	<b>Classificação atual</b>	<b>Histórico de classificações</b>
Alfa	B.1.1.7 e linhagem Q	VBM	VOC: Dezembro 29, 2020 VBM: Setembro 21, 2021
Beta	B.1.351 e linhagens descendentes	VBM	VOC: Dezembro 29, 2020 VBM: Setembro 21, 2021
Gama	P.1 e linhagens descendentes	VBM	VOC: Dezembro 29, 2020 VBM: Setembro 21, 2021
Delta	B.1.617.2 e linhagens descendentes	VBM	VOC: Junho 15, 2021 VBM: Abril 14, 2022
Epsilon	B.1.427 e B.1.429	VBM	VOC: Março 19, 2021 VOI: Fevereiro 26, 2021 VOI: Junho 29, 2021 VBM: Setembro 21, 2021
Eta	B.1.525	VBM	VOI: Fevereiro 26, 2021 VBM: Setembro 21, 2021
Iota	B.1.526	VBM	VOI: Fevereiro 26, 2021 VBM: Setembro 21, 2021
Kappa	B.1.617.1	VBM	VOI: Maio 7, 2021 VBM: Setembro 21, 2021
N/A	B.1.617.3	VBM	VOI: Maio 7, 2021 VBM: Setembro 21, 2021
Omicron	B.1.1.529 e descendente	VOC	VOC: Novembro 26, 2021

CDC. *Center for Disease Control and Prevention – CDC 24/7: Saving Lives, Protecting People. SARS-CoV-2 Variant Classification and Definitions.* Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/variants/variant-classifications.html#>>. Acesso em: 29 de maio de 2023.



**Figura 6. Relações filogenéticas dos clados de SARS-CoV-2 proposto pelo time *Nextstrain*.**

Figura de *Nextstrain* Disponível em: < <https://ncov-clades-schema.vercel.app/>>. Acesso em: 29 de maio de 2023.

Tabela 3. Identificação das linhagens de SARS-CoV-2 segundo Nextstrain, Pango e OMS.

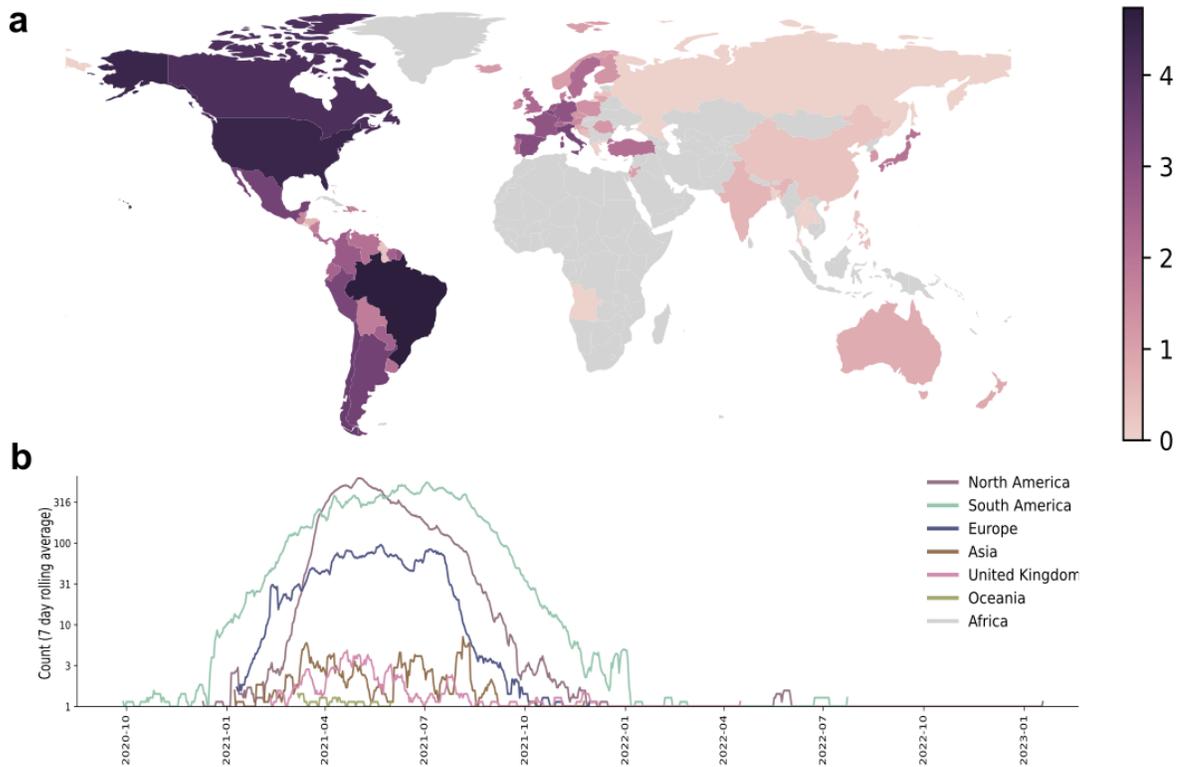
Clado (Nextstrain)	Linhagem (Pango )	Nome (OMS)
20I(Alpha, V1)	B.1.1.7_	αAlpha
20H(Beta, V2)	B.1.351_	βBeta
20J(Gamma, V3)	P.1_	γGamma
21A(Delta)	B.1.617.2_	δDelta
21I(Delta)		δDelta
21J(Delta)		δDelta
21B(Kappa)	B.1.617.1_	κKappa
21C(Epsilon)	B.1.427, B.1.429	εEpsilon
21D(Eta)	B.1.525_	ηEta
21F(Iota)	B.1.526	ιIota
21G(Lambda)	C.37	λLambda
21H(Mu)	B.1.621	μMu
21K(Omicron)	BA.1_	οOmicron
21L(Omicron)	BA.2_	οOmicron
22A(Omicron)	BA.4_	οOmicron
22B(Omicron)	BA.5_	οOmicron
22C(Omicron)	BA.2.12.1_	οOmicron
22D(Omicron)	BA.2.75_	οOmicron
22E(Omicron)	BQ.1_	οOmicron
22F(Omicron)	XBB_	οOmicron
23A(Omicron)	XBB.1.5_	οOmicron
23B(Omicron)	XBB.1.16_	οOmicron
20E (EU1)	B.1.177	
20B/S:732A	B.1.1.519	
20A/S:126A	B.1.620	
20A.EU2	B.1.160	
20A/S:439K	B.1.258	
20A/S:98F	B.1.221	
20C/S:80Y	B.1.367	
20B/S:626S	B.1.1.277	
20B/S:1122L	B.1.1.302	

### 1.5. Surgimento da variante gama (P.1) e epidemiologia

A primeira identificação da variante P.1 foi em dezembro de 2020, na qual mutações de importância biológica foram observadas em amostras de pacientes da região amazônica. Neste estudo, a prevalência da nova cepa foi de 42% nas amostras utilizadas, contudo, algumas semanas após a identificação, a frequência da variante atingiu 91% dos casos de COVID-19 em Manaus (FARIA et al., 2021a; FARIA et al., 2021b). Em janeiro de 2021, durante protocolos de controle da COVID-19 em aeroportos do Japão, que incluíam quarentena e testagem com vigilância genética do vírus, a nova cepa foi encontrada em amostras de passageiros vindos de Manaus (FUJINO et al., 2021).

Dados epidemiológicos apontam que a P.1 foi responsável pela segunda onda de casos em Manaus, com mudança no perfil de pacientes hospitalizados por COVID-19, com maior incidência de casos em jovens (20 - 59 anos), além de maior necessidade de internação em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e do número de mortes, comparada à primeira onda de casos (BANHO et al., 2022; FARIA et al., 2021b). Estudos com análise de predição e uso de ferramentas de bioinformática apontam maior taxa de transmissão e maior risco de mortalidade pela infecção com a variante P.1 (HAHN et al., 2021; RENATO et al., 2021). Com relação a epidemiologia dos casos positivos para variante P.1 no estado do Amazonas, durante o mês de janeiro não foram verificadas diferenças quanto a faixa etária e sexo (NAVECA, et al., 2021). Em comparação epidemiológica posterior, confirmou-se a maior taxa de mortalidade entre pacientes hospitalizados por COVID-19 no estado do Amazonas durante a segunda onda de casos, comparado aos casos da primeira onda (RICARDO et al., 2021).

Em fevereiro de 2021, os casos de infecção por P.1 também foram responsáveis pelo aumento expressivo de internações por COVID-19 na cidade de Araraquara no interior de São Paulo (ROMANO et al., 2021). A ocorrência de infecção pela P.1 foi identificada em 62 países, sendo a América do Sul o continente com maior média diária de casos positivos para essa variante durante período de alta ocorrência de COVID-19 em 2021 (Figura 7) (O'TOOLE et al., 2021). Estudo desenvolvido com dados de sete países europeus, mostrou que, apesar da prevalência de P.1 ser menor quando comparada às de outras variantes (alfa, B.1.1.7 e beta B.1.351), foi observada alta prevalência de hospitalização nas infecções por P.1 (FUNK et al., 2021). Os autores do trabalho ressaltam a importância da vacinação para redução da gravidade da doença em casos de infecção pelas variantes para evitar a sobrecarga nos serviços de saúde (FUNK et al., 2021).



**Figura 7. Mapeamento mundial dos registros de identificação da P.1 por país e frequência média diária de P.1 por continente.**

a) Mapa mostrando o número registrado de sequências da variante em cada país. Países com mais sequências são mostrados em cores mais escuras. b) Média móvel de sete dias de frequência de sequências da linhagem de interesse por continente. A frequência é calculada dividindo o número de sequências da linhagem de interesse pelo total de sequências para cada continente para cada dia. Adaptado de “PANGO Lineages: Latest epidemiological lineages of SARS CoV-2”. Disponível online em: [https://cov-lineages.org/global\\_report\\_P.1.html](https://cov-lineages.org/global_report_P.1.html).

## 1.6. Principais mutações presentes na variante P.1

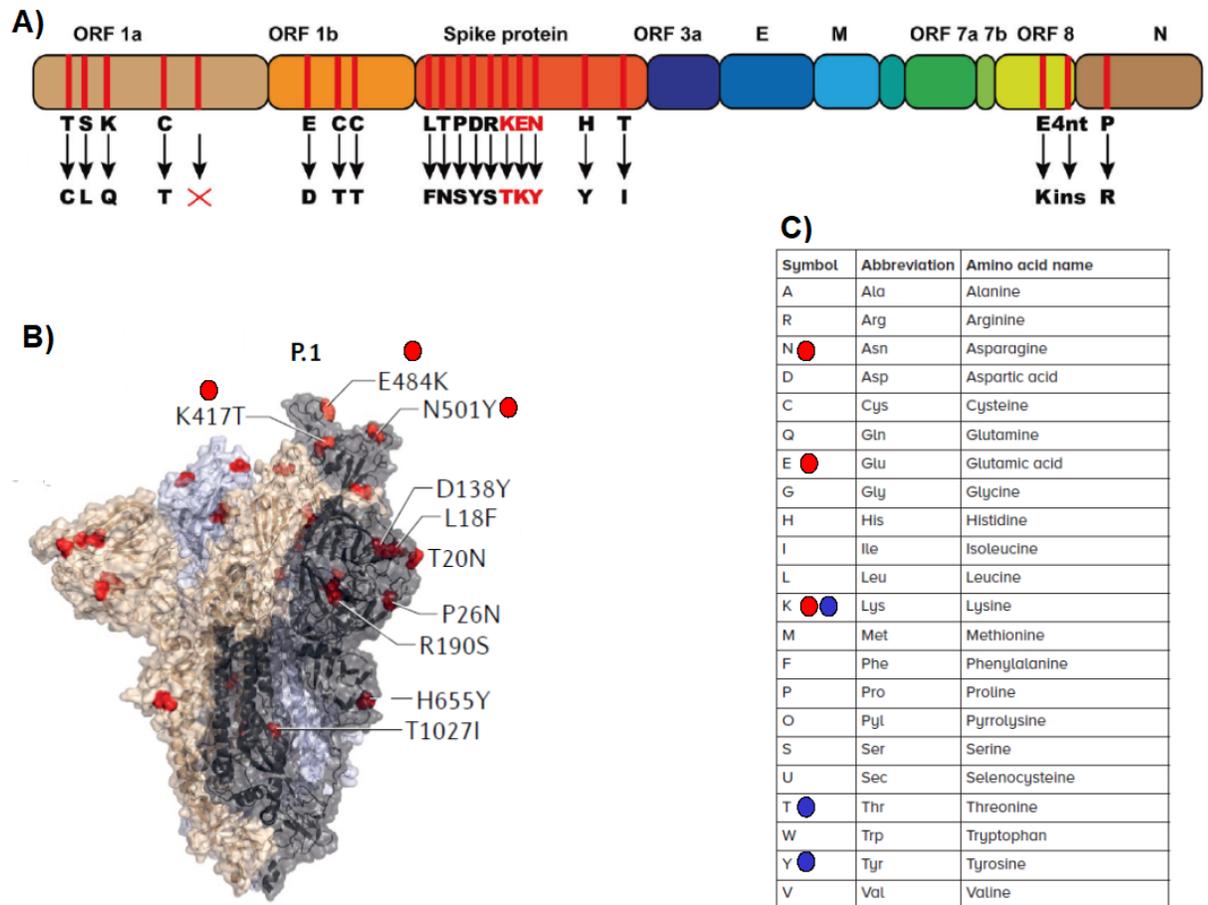
Vírus que estão em alta circulação na população tendem a modificar seu material genético (mutações) em decorrência dos diferentes desafios encontrados entre um hospedeiro e outro. Contudo, a maioria das mutações por troca de aminoácidos na estrutura de proteínas virais são neutras, ou seja, com pouco ou nenhum efeito na patogenicidade, transmissibilidade, infectividade e na capacidade de ser reconhecido pelo sistema imunológico, chamada de antigenicidade (HARVEY et al., 2021).

As glicoproteínas que recobrem o envelope viral são estruturas funções importantes para atividade viral (ligação e invasão da célula hospedeira) e, portanto, estruturas que permanecem nas linhagens, independente do quanto a linhagem se modifica ao longo das mutações. Estas são comumente alvos dos anticorpos. Diferentes estratégias de alterações estruturais dessas glicoproteínas podem ocorrer durante as mutações, como por exemplo, troca, deleção ou adição de aminoácidos, que podem alterar o epítopo ou aumentar a afinidade pelo receptor da célula alvo. Além disso, pode ocorrer troca na posição de glicosilação ou de ligações de dissulfeto, que atrapalham o reconhecimento ou ligação pelo anticorpo (HARVEY et al., 2021).

A variante de preocupação P.1 descende da linhagem B.1.1.28 e comparada à cepa de origem, apresenta 21 mutações compostas por 15 não sinônimas (quando a alteração do nucleotídeo reflete em alteração no tipo de aminoácido da proteína traduzida daquele gene, e pode apresentar alguma vantagem para seleção natural do vírus), 4 mutações sinônimas (quando a alteração do nucleotídeo não reflete alterações na estrutura da proteína, e pode ser considerada uma modificação neutra, pois não altera função. Entretanto, esta pode estar relacionada à velocidade de tradução do RNA mensageiro), 1 inserção e 1 deleção de aminoácido (CHU; WEI, 2019; FARIA et al., 2021a). O gene com maior número de mutação é da proteína Spike, totalizando 10 alterações, sendo 3 destas K417T, E484K e N501Y, implicadas em aumento da transmissibilidade e redução da capacidade neutralizante de alguns anticorpos (SABINO, et al., 2021).

As demais alterações presentes na cepa P.1 estão presentes no maior gene, o ORF1ab, responsável pela codificação das poliproteínas pp1ab e pp1a que após clivagem origina proteínas não estruturais do vírus importantes para o processo de replicação viral, com 3 deleções de nucleotídeos (del11288-11296 (3675-3677 SGF), 3 mutações não sinônimas (S1188L, K1795Q e E5665D) e 4 mutações sinônimas (T733C, C2749T, C12778T e C13860T). No gene da proteína acessória ORF8 também há uma mutação não sinônima (E92K) e adição

de 4 nucleotídeos na posição 28269-28273. Por fim, a última mutação não sinônima está presente no gene da proteína N (P80R) (FARIA, et al., 2021a; (VELAZQUEZ-SALINAS et al., 2020). A esquematização das posições das mutações nos genes da P.1 e a posição das alterações de aminoácidos na proteína S estão representados na figura 8.



**Figura 8. Mutações presentes da variante P.1.**

A) Representação esquemática das posições das mutações no gene da P.1. Os aminoácidos em vermelho destacam as principais mutações presentes na proteína S que apresentam efeitos preocupantes relacionados à capacidade de transmissão e de antigenicidade. B) Estrutura molecular da proteína S em heterotrímero (subunidades representadas nas cores cinza, azul e marrom claro) com destaque em vermelho nas posições com alterações de aminoácidos. Por convenção, as alterações são apresentadas com a letra do aminoácido que foi substituído, seguido da numeração de posição na sequência de aminoácidos e por fim a sigla do aminoácido substituído (K417T; K = Lisina, posição 417 na cadeia de aminoácidos e T = treonina). Os círculos vermelhos apontam as mutações de preocupação. C)

Tabela com a nomenclatura dos aminoácidos. Círculos em vermelho apontam os aminoácidos removidos e em azul os aminoácidos substitutos. Adaptado de Wang e Zhou (*Signal Transduct. Target. Ther.*, 2021) e Harvey et al. (*Nat. Rev. Microbiol.*, 2021).

### **1.7 Atualização sobre aspectos patogênicos da infecção pela variante gama (P.1)**

Em ensaios *in vitro*, a P.1 apresentou maior resistência à neutralização por anticorpos monoclonais e soro tanto de paciente recuperado da COVID-19, quanto de indivíduo vacinado, demonstrando assim a importância das mutações apresentadas pela P.1 em relação a capacidade de escapar do reconhecimento humoral (WANG et al., 2021). É proposto que a P.1 apresente característica antigênica diferenciada frente às demais VOCs, visto que em modelo *in vivo* ao realizar transferência passiva de anticorpos de animais infectados com P.1 para animais infectados com outra cepa de SARS-CoV-2, houve uma resposta atenuada quanto à redução da carga viral (neutralização) comparado aos animais infectados com P.1 (IMAI et al., 2021).

A contínua transmissão da variante gama na região amazônica contribuiu para que a VOC sofresse ainda mais alterações genéticas, surgindo uma segunda geração da variante que apresenta mais duas alterações na proteína S, uma deleção no domínio N-terminal ou trocas de aminoácidos (N679K ou P681H) na região de junção entre as subunidades S1/S2 (GOMES NAVECA et al., 2022). Também foram identificados casos com novas variações na P.1 em outras regiões do Brasil, e apesar de não ter ocorrido uma terceira onda epidêmica até o período em que foi realizado o estudo, é necessário manter a rastreabilidade genética do vírus, além de estimular as políticas de prevenção ao contágio pois é possível que as novas alterações contribuam para uma maior transmissibilidade e escape do sistema imunológico.

## 1.8 Sintomas gastrointestinais associados a COVID-19

Os sintomas gastrointestinais estão presentes entre 12 e 61% dos pacientes com COVID-19 e o tipo de sintoma pode variar muito entre os pacientes. Por exemplo, em estudo majoritariamente realizado com indivíduos chineses foi observado anorexia em 21%, náusea e/ou vômito em 7% e dor abdominal em 3% dos pacientes avaliados, enquanto nos Estados Unidos anorexia, diarreia e náusea foram os sintomas mais prevalentes, com 34,8, 33,7 e 26,4%, respectivamente (GUPTA et al., 2020). Em relação aos pacientes mais graves que necessitam de cuidado em UTI, o sintoma de dor abdominal é mais frequente do que em pacientes com infecção mais leve (JAIN; YUAN, 2020). A região abdominal em que o paciente com COVID-19 apresenta dor também parece ser um fator importante na associação com maior gravidade da doença. Pacientes com dor abdominal superior e dispneia apresentaram resultados bioquímicos alterados e maior risco de pior evolução da COVID-19 quando comparados aos pacientes que tiveram dor abdominal inferior (BALAPHAS et al., 2022).

A causa dos sintomas gastrointestinais é multifatorial e na maioria das vezes hipotetizada, havendo necessidade de mais estudos para determinar a fisiopatologia da infecção por SARS-CoV-2 no sistema gastrointestinal. Quatro hipóteses são levantadas na literatura atual, (1) dano ao epitélio do trato gastrointestinal (TGI) causado diretamente pela infecção com SARS-CoV-2 neste tecido (LAMERS et al., 2020; LIN et al., 2020; XIAO et al., 2020); (2) processo inflamatório intestinal gerado por infiltração de células do sistema imunológico, contribuindo para o aumento de citocinas inflamatórias causando danos teciduais e edema de submucosa (VARGA et al., 2020); (3) disbiose intestinal que pode interferir na regulação de mecanismos de controle de resposta imunológica tanto local e sistêmica (AHLAWAT; ASHA; SHARMA, 2020; ALBERCA et al., 2021; DE OLIVEIRA et al., 2021) e (4) desregulação do sistema renina-angiotensina pela redução de disponibilidade do receptor ACE2, causada durante a entrada do vírus nas células do hospedeiro, o que poderia alterar diferentes mecanismos do TGI como absorção e secreção de moléculas, fluxo sanguíneo, motilidade e inflamação (VIANA; NUNES; REIS, 2020).

O aumento da permeabilidade intestinal é uma alteração que pode estar presente nos quatro processos fisiopatológicos sugeridos como responsáveis por causarem sintomas gastrointestinais durante a COVID-19. A permeabilidade intestinal alterada pode corroborar com a ativação inflamatória sistêmica, chamada de endotoxemia metabólica, condição já observada em diferentes doenças associadas à disbiose intestinal e alterações no perfil de citocinas inflamatórias, como a obesidade e a diabetes (CANI et al., 2012). A disbiose intestinal também

tem sido relacionada com o surgimento de infecções secundárias por bactérias durante infecções respiratórias virais (SENCIO; MACHADO; TROTTEIN, 2021). Em crianças com síndrome inflamatória multissistêmica que tiveram COVID-19, o aumento da permeabilidade intestinal pode ser a principal causa da antigenemia prolongada do SARS-COV-2 (YONKER et al., 2021). Pesquisadores observaram que pacientes que desenvolveram a forma grave da COVID-19 apresentaram aumento de marcadores associados à perda de permeabilidade intestinal no início da doença (OLIVA et al., 2021). Com isso, os autores sugerem o uso desses marcadores para predição de risco (OLIVA et al., 2021).

Com o surgimento das variantes do SARS-CoV-2, que podem apresentar perfis de maior transmissibilidade e gravidade, é importante a investigação também das diferentes linhagens, principalmente as que estão em dominância, quanto aos aspectos gastrointestinais, como a disbiose e controle de barreira intestinal para possibilitar descobertas que permitam o aperfeiçoamento do prognóstico e abordagens terapêuticas. Nesse sentido, o uso de modelos animais que apresentem semelhanças clínicas e imunológicas durante infecção com SARS-Cov-2 comparada a COVID-19 em humanos, é muito útil para investigação da patogênese da doença envolvendo sistemas complexos como o eixo intestino-pulmão, visto as dificuldades em se coletar amostras mais invasivas em humanos, além das questões de variabilidade individual em humanos que dificultam a compreensão dos resultados (SEIBERT et al., 2021).

## 1.9 Modelos experimentais para infecção por SARS-CoV-2 e o papel da microbiota intestinal

Diferentes modelos animais já foram descritos para investigação do SARS-CoV-2, como hamsters, camundongos transfectados com adenovírus para expressar a proteína ACE2 humana, ou vírus geneticamente modificados de modo a possibilitar o desenvolvimento de infecção em camundongos não transgênicos (HASSAN et al., 2020; LUTZ et al., 2020).

Desde 2003, com as primeiras epidemias de SARS causadas por coronavírus, pesquisadores buscaram por modelos que replicassem as características clínicas da infecção em humanos. No entanto a ausência do receptor ACE2 humano impedia a reprodutibilidade da gravidade da doença em animais não primatas (SILVAS et al., 2021). Em 2006, McCray e colaboradores desenvolveram um camundongo transgênico capaz de expressar o receptor humano ACE2 em tecido epitelial, e verificaram que a infecção intranasal com SARS-CoV causava doença similar à de humanos, com aspectos clínicos e inflamatórios mais intensos comparados ao das outras linhagens de camundongos (MCCRAY et al., 2007). As publicações com o camundongo K18-hACE2 passaram de 11 no ano de 2020 para 40 até agosto de 2021 na base de dados Pubmed, inicialmente com abordagens de caracterização da infecção por SARS-CoV-2 ou terapias de imunização, e mais recentemente, com assuntos específicos envolvendo mecanismos do hospedeiro ou análise do papel de moléculas do vírus (IMAI et al., 2021; MAO et al., 2021; MOREAU et al., 2020; SEIBERT et al., 2021; SILVAS et al., 2021; WINKLER et al., 2020; YINDA et al., 2021).

A construção genética do camundongo K18-hACE2 foi realizada para garantir especificidade de expressão do receptor em células epiteliais, o que foi alcançado através do uso do promotor da queratina humana 18 (K18) e expressão intensa do gene, através da inserção de uma sequência intensificadora de tradução (TE) do vírus do mosaico da alfafa localizada logo após o promotor (CHOW et al., 1997; MCCRAY et al., 2007). Em seguida, na sequência genômica mutante foi adicionado o gene de ACE2, os éxons 6 e 7 e a cauda poli A do promotor K18 (MCCRAY, et al., 2007) A linhagem também recebe o nome B6.Cg-Tg(K18-ACE2)2PrImn/J, na qual B6 é a abreviação para C57Black/6J, referente a linhagem utilizada para gerar o camundongo transgênico, Cg-Tg (K18-ACE2) são os genes promotor e o transgênico inseridos no DNA do animal, e 2PrImn refere-se ao cromossomo em que foi inserido o gene transgênico e a sigla do nome do laboratório ou pesquisador responsável que criou a nova linhagem, neste caso Perlman (JAX stock #034860).

A infecção em K18-hACE2 causada pelo SARS-CoV-2 pode ser moderada ou grave dependendo da dose (DONG et al., 2022) ou tipo de cepa utilizada (HORSPOOL et al., 2021). O RNA mensageiro de hACE2 é expresso em grandes quantidades no pulmão, cólon, rim e cérebro (WINKLER, et al., 2020). McCray e colegas também verificaram a expressão do receptor em intestino delgado, fígado, baço e coração (MCCRAY, et al., 2007). O pulmão é o órgão com maior carga viral logo nos primeiros dias da infecção, enquanto o cérebro, em alguns animais pode apresentar aumento da quantidade de RNA viral entre o segundo e o sexto dia após a infecção (ZHENG et al., 2021). Apesar de tecidos extrapulmonares apresentarem carga viral, não foi observado viremia nos camundongos K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2 (Yinda, et al., 2020). A perda de peso dos animais K18-hACE2 quando infectados com SARS-CoV ocorre predominantemente entre os dias 3 e 5, evoluindo com aumento dos sinais clínicos, como letargia, dificuldade para respirar e morte no sétimo dias após infecção (MCCRAY, et al., 2007). A evolução clínica durante a infecção por SARS-CoV-2 pode variar de acordo com a cepa, de modo que animais K18-hACE2 infectados com certas VOCs apresentaram perda de peso e morte mais precoce ou tardios, comparados à cepa ancestral (MAO et al., 2021).

A infecção por SARS-CoV-2 em camundongos K18-hACE2 mimetiza a infecção observada em humanos, apresentando aumento significativo de citocinas inflamatórias e quimiocinas, como “tempestade de citocinas”, além de pneumonia e patologia pulmonar semelhantes ao observado na COVID-19, de modo que diferentes pesquisadores apontam sua aplicação como sendo vantajosa em estudos de patogênese e no desenvolvimento de terapias (ARCE; COSTOYA, 2021; LUTZ et al., 2020; WINKLER et al., 2020; YINDA et al., 2021; ZHENG et al., 2021).

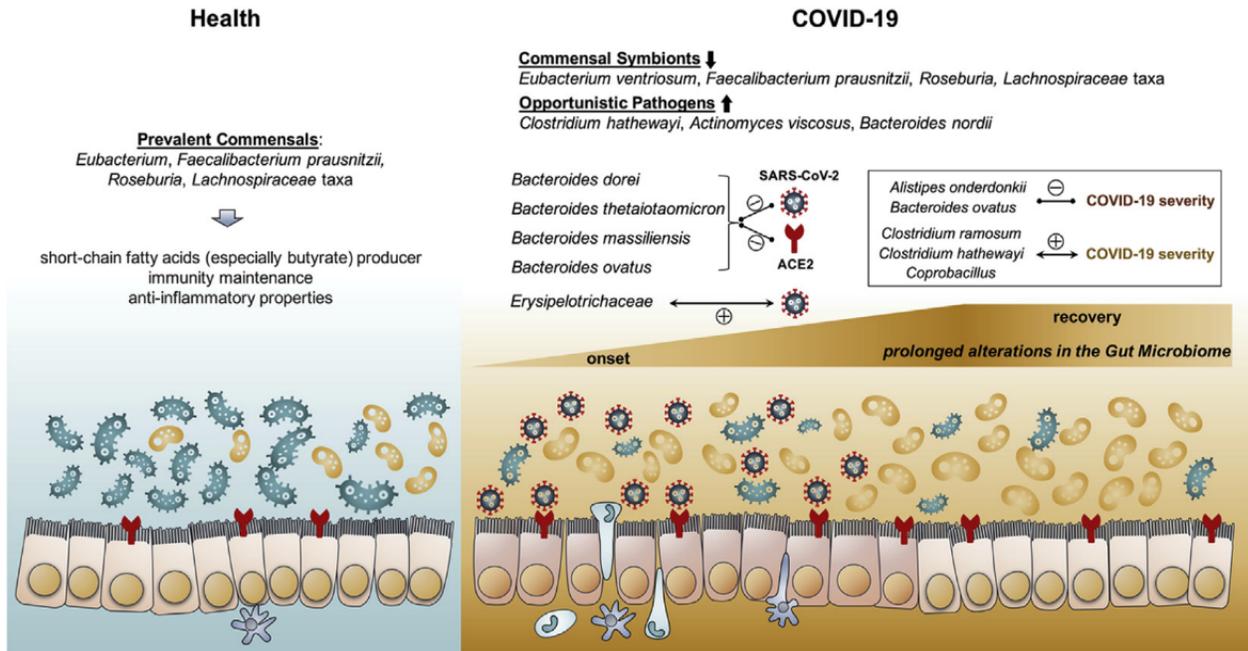
### 1.10 Tratamento de doenças respiratórias infecciosas com manejo da microbiota intestinal e seus metabólitos

Alterações na composição da microbiota intestinal têm sido identificadas em diferentes tipos de infecções respiratórias virais, como responsáveis por comprometer a resposta imunológica do hospedeiro (ANTUNES et al., 2019; ICHINOHE et al., 2014; QIN et al., 2015). Ichinohe e colegas utilizando abordagem de depleção da microbiota intestinal através do uso de antibióticos em camundongos, verificaram que as alterações provocadas na composição da microbiota intestinal prejudicaram resposta de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e células B no pulmão durante infecção pelo vírus da influenza A (ICHINOHE et al., 2011).

Outras estratégias experimentais permitem verificar o papel da microbiota na regulação do sistema imunológico durante doenças respiratórias, como a terapia com probióticos (suplementação de cepas de bactérias vivas) (GARCIA-CASTILLO et al., 2020; HU et al., 2021b; SAGAR et al., 2014), transplante de microbiota intestinal (JANG et al., 2020), uso de prebióticos (fibras alimentares fermentáveis metabolizadas por bactérias, gerando produtos que podem ser utilizados por outros organismos) (JANG et al., 2021; TROMPETTE et al., 2018) ou através da suplementação com compostos do metabolismo de bactérias, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (TROMPETTE, et al., 2018; ANTUNES, et al., 2019; JANG, et al., 2020).

Muitos estudos têm relacionado alterações na composição da microbiota intestinal e nas concentrações dos AGCC durante a COVID-19, como sendo um fator importante na fisiopatogênese da doença (CYPRIAN et al., 2021; LI et al., 2021b). No primeiro semestre da pandemia por SARS-CoV-2, pesquisadores chineses verificaram disbiose intestinal e alguns perfis de resposta imunológica que poderiam predispor os pacientes à forma mais grave da COVID-19 e até a morte (ZUO et al., 2020). Eles observaram que citocinas inflamatórias como IL-6 e IFN- $\gamma$  estavam positivamente relacionadas com os gêneros *Lactobacilli* and *Ruminococci*, enquanto que para o *Clostridiales* a relação foi negativa. Em outro estudo, pacientes com COVID-19, incluindo aqueles cujas amostras foram coletadas até trinta dias da resolução da infecção por SARS-CoV-2, apresentaram disbiose intestinal caracterizada por redução de espécies reconhecidamente benéficas para saúde do hospedeiro incluindo *Faecalibacterium prausnitzii*, *Eubacterium rectale* e bifidobactérias (YEOH et al., 2021). Interessantemente, o mesmo grupo de pesquisa observou em estudo piloto prévio realizado com pacientes hospitalizados, que durante o período de internação, pacientes com COVID-19 apresentaram redução de bactérias benéficas, além de aumento de bactérias patogênicas oportunistas e essa

relação também foi encontrada ao associar a gravidade da COVID-19 (Figura 9) (ZUO, et al., 2020).



**Figura 9. Resumo de alterações na microbiota intestinal de pacientes com COVID-19.**

Indivíduos saudáveis apresentam maiores quantidades de *Eubacterium*, *Faecalibacterium prausnitzii*, *Roseburia*, *Lachnospiraceae* em comparação aos infectados com SARS-CoV-2. Esses comensais são produtores de butirato e podem contribuir com propriedades anti-inflamatórias e imunorreguladoras no intestino. Pacientes com COVID-19 apresentam redução desses comensais simbióticos e aumento de patógenos oportunistas, como *Coprobacillus*, *Clostridium ramosum* e *Clostridium hathewayi* e esse aumento foi positivamente associado com maior gravidade da COVID-19. A espécie *Erysipelotrichaceae bacterium*, comum em condições de inflamação e desordens gastrointestinais, foi positivamente associada com a carga viral fecal de SARS-CoV-2. Quatro membros do filo *Bacteroidetes*, *Bacteroides dorei*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Bacteroides massiliensis* e *Bacteroides ovatus*, conhecidos por reduzirem a expressão de ACE2 em camundongos, apresentaram quantidades inversamente correlacionadas à carga viral fecal de SARS-CoV-2. Figura de ZUO, et al., 2020.

Trompette e colaboradores verificaram que os tratamentos com butirato na água de beber (500 mM) ou com dieta rica em inulina (30%) protegeu camundongos infectados com o vírus da Influenza A dos efeitos deletérios dessa infecção via modulação de respostas de monócitos e células T citotóxicas (TROMPETTE, et al., 2018). O tratamento com dieta rica em fibras apresentou efeito protetor durante infecção pelo vírus sincicial respiratório em camundongos, de maneira dependente da ação da microbiota intestinal e geração de acetato (ANTUNES, et al., 2019). O tratamento com 3 mM de butirato em culturas de organóide intestinal oriundas de animais que expressam maiores quantidades de ACE2 e TMPRSS2 reduziu a expressão destes genes (LI et al., 2021a). Contudo, Chemudupati e colegas verificaram que o tratamento com butirato em cultura de célula primária de pulmão aumentou a replicação viral em modelos de infecção com metapneumovírus humano (CHEMUDUPATI et al., 2020). Mais estudos com modelo animal para infecção com SARS-CoV-2 envolvendo tratamento com AGCC são necessários para verificação dos efeitos em um panorama mais completo em relação às interações celulares existentes.

Estudo clínico em andamento investiga se a suplementação com simbiótico (composto com cepas de bactérias benéficas e fibras alimentares) em pacientes com COVID-19 melhora o quadro clínico dos pacientes, principalmente com relação aos sintomas gastrointestinais, carga viral e gravidade da doença (NCT04420676). Contudo, estudos clínicos são longos e geralmente não é possível coletar amostras de órgãos como o pulmão e o intestino. Portanto, considerando a aplicabilidade de modelos animais que mimetizam a infecção por SARS-CoV-2 em humanos, somada a necessidade de aprofundar a fisiopatogênese de novas variantes, bem como verificar os efeitos de terapias relacionadas à microbiota intestinal, este trabalho busca contribuir com informações que possam cobrir essas lacunas, favorecendo o desenvolvimento de futuros trabalhos com alvos mais refinados e impactantes no tratamento contra a COVID-19.

## **CAPÍTULO 2 – OBJETIVOS**

Estudos apontam que as alterações na composição e no metabolismo da microbiota intestinal induzidas pela COVID-19 podem ser importantes na patogênese, na intensidade da doença, na recuperação e inclusive nas sequelas ou COVID longa (LIU et al., 2022). Considerando a relação entre maior gravidade da COVID-19 com alterações na microbiota intestinal e redução dos AGCCs, investigamos neste trabalho se o tratamento com os AGCCs ou a redução da carga microbiana intestinal poderiam alterar a resposta durante a infecção por SARS-CoV-2.

### **2.1. Objetivo I**

Verificar o efeito dos ácidos graxos de cadeia curta em células do epitélio intestinal durante infecção por SARS-CoV-2.

### **2.2. Objetivo II**

Avaliar o impacto da depleção da microbiota intestinal na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos transgênicos fêmeas que expressam a enzima conversora de angiotensina humana em células epiteliais (K18-hACE2).

### **2.3. Objetivo III**

Comparar os efeitos da infecção pela variante gama (P.1.) *versus* à infecção por SARS-CoV-2 ancestral (B.1) na composição da microbiota intestinal em camundongos K18-hACE2 .

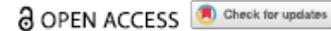
## CAPÍTULO 3 – ARTIGO ORIGINAL 1

### Ácidos graxos de cadeia curta derivados da microbiota não interferem na infecção por SARS-CoV-2 em biópsias de cólon humano

A COVID-19 pode causar disbiose, caracterizada por exemplo, pelo aumento de bactérias oportunistas e redução de bactérias produtoras de ácidos graxos de cadeia curta (AGCCs). Considerando a importância desses metabólitos da microbiota para a saúde das células intestinais e no controle de infecções virais, nós hipotetizamos que a redução dos AGCCs poderia interferir no controle viral por células do intestino humano. Biópsias de cólon de indivíduos saudáveis foram obtidas para ensaios *ex vivo* que incluíram o tratamento com mix de AGCCs (acetato, propionato e butirato) por 1 hora seguida da inoculação de  $10^5$  PFU de SARS-CoV-2. Cada amostra foi pesada e dividida igualmente para análise da carga viral e expressão de genes inflamatórios por RT-PCR e marcação da proteína viral Spike por imunofluorescência. O efeito dos AGCCs no controle de permeabilidade durante a infecção por SARS-CoV-2 foi medido em culturas de linhagem de colonócitos humanos, células Caco-2. O tratamento com AGCCs reduziu a transcrição de genes importantes para a detecção de moléculas virais, controle de entrada viral e replicação, como RIG1, TMPRSS2 e o receptor de IFN $\lambda$ . No entanto, não houve alteração na carga viral, indicando que esses efeitos não são suficientes ou podem ser neutralizados por outros efeitos de AGCCs nessas células. Com relação à análise de permeabilidade em Caco-2, não foram observadas alterações na resistência transepitelial após a infecção ou o tratamento. As limitações do trabalho incluem a ausência de interação entre as células epiteliais intestinais com o sistema imunológico e a microbiota intestinal, que podem responder aos AGCCs de maneira integrativa e gerar outros efeitos frente a infecção por SARS-CoV-2. Vale ressaltar que os AGCCs também podem ter efeitos sistêmicos, que podem ser relevantes para SARS-CoV-2 infecção em diferentes contextos.



## BRIEF REPORT



## Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples

Livia Bitencourt Pascoal<sup>a,b,f</sup>, Patricia Brito Rodrigues<sup>a,f</sup>, Livia Moreira Genaro<sup>b</sup>, Arilson Bernardo dos Santos Pereira Gomes<sup>a</sup>, Daniel Augusto Toledo-Teixeira<sup>a</sup>, Pierina Lorencini Parise<sup>c</sup>, Karina Bispo-Dos-Santos<sup>c</sup>, Camila Lopes Simeoni<sup>c</sup>, Paula Veri Guimarães<sup>b</sup>, Lucas Ildelfonso Buscaratti<sup>d</sup>, João Gabriel De Angeli Elston<sup>d</sup>, Henrique Marques-Souza<sup>d</sup>, Daniel Martins-de-Souza<sup>e,f</sup>, Maria De Lourdes Setsuko Ayrizono<sup>b</sup>, Lício Augusto Velloso<sup>g,h</sup>, José Luiz Proença-Modena<sup>c,e</sup>, Pedro Manoel Mendes Moraes-Vieira<sup>e,j</sup>, Marcelo Alves Silva Mori<sup>e,i</sup>, Alessandro Santos Farias<sup>e,k</sup>, Marco Aurélio Ramirez Vinolo<sup>a,e</sup>, and Raquel Franco Leal<sup>b,h</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>b</sup>Inflammatory Bowel Disease Research Laboratory, Colorectal Surgery Unit, Department of Surgery, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>c</sup>Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>d</sup>Brazilian Laboratory on Silencing Technologies (Blast), Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>e</sup>Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>f</sup>Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>g</sup>Laboratory of Cell Signaling, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>h</sup>Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>i</sup>Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>j</sup>Laboratory of Aging Biology, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; <sup>k</sup>Autoimmune Research Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

### ABSTRACT

Microbiota-derived molecules called short-chain fatty acids (SCFAs) play a key role in the maintenance of the intestinal barrier and regulation of immune response during infectious conditions. Recent reports indicate that SARS-CoV-2 infection changes microbiota and SCFAs production. However, the relevance of this effect is unknown. In this study, we used human intestinal biopsies and intestinal epithelial cells to investigate the impact of SCFAs in the infection by SARS-CoV-2. SCFAs did not change the entry or replication of SARS-CoV-2 in intestinal cells. These metabolites had no effect on intestinal cells' permeability and presented only minor effects on the production of anti-viral and inflammatory mediators. Together our findings indicate that the changes in microbiota composition of patients with COVID-19 and, particularly, of SCFAs do not interfere with the SARS-CoV-2 infection in the intestine.

### ARTICLE HISTORY

Received 29 October 2020  
Revised 17 December 2020  
Accepted 24 December 2020

### KEYWORDS

SARS-CoV-2; COVID-19; microbiota; short-chain fatty acids; human colonic samples

### Introduction

COVID-19 is a pandemic disease caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), characterized as respiratory disorder with clinical changes ranging from no symptoms to severe pneumonia and death.<sup>1,2</sup> After an incubation period, most patients with COVID-19 develop mild-to-moderate disease with typical symptoms including fever, chills, fatigue, dry cough, sore throat, sputum production, shortness of breath and headache.<sup>2,3</sup> In addition, recent studies showed that 17.6% of patients with COVID-19 present gastrointestinal symptoms that occurred more frequently in severe patients.<sup>3,4</sup>

Interestingly, the presence of SARS-CoV-2 in fecal samples was associated with changes in gut microbiota composition.<sup>5</sup> Numerous experimental and clinical observations suggested that the gut microbiota plays a key role in the pathogenesis of sepsis and acute respiratory distress syndrome suggesting that SARS-CoV-2 might also have an impact on the gut microbiota and vice-versa.<sup>5-7</sup>

Loss of gut bacteria diversity leading to dysbiosis is associated with the development of many diseases.<sup>5-7</sup> This also seems to be the case for SARS-CoV-2 infection. A recent study reported

**CONTACT** Raquel Franco Leal  [rafranco@unicamp.br](mailto:rafranco@unicamp.br); Marco Aurélio Ramirez Vinolo  [mvinolo@unicamp.br](mailto:mvinolo@unicamp.br)  Inflammatory Bowel Disease Research Laboratory, Colorectal Surgery Unit, Department of Surgery, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

<sup>a</sup>These authors contributed equally to this work.

© 2021 The Author(s). Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

an increase of opportunistic bacteria such as *Collinsella aerofaciens*, *Collinsella tanakaei*, *Streptococcus infantis* and *Morganella morganii* and a reduction of *Parabacteroides merdae*, *Bacteroides stercoris*, *Alistipes onderdonkii* and *Lachnospiraceae bacterium1\_1\_57FAA*) in patients with high SARS-CoV-2 infectivity signature compared to patients with low or no SARS-CoV-2 infectivity.<sup>5</sup> Functionally, this change in microbiota composition was associated with a reduction in short-chain fatty acids (SCFAs) production and increased synthesis of nucleotide and amino acids and carbohydrate metabolism. Another study pointed out to a reduction in bacterial groups (e.g., *Faecalibacterium*, *Fusicatenibacter* and *Eubacterium hallii*) involved in the production of the SCFA butyrate in fecal samples of COVID-19 patients compared to healthy controls.<sup>6</sup> Thus, there is evidence that the presence and/or infection of SARS-CoV-2 in the gut is associated with changes in microbiota including reduction in SCFAs-producing bacteria. However, no study addressed whether this effect on SCFAs is relevant for the infection.

Butyrate and other SCFAs are key molecules mediating host-microbiota interaction. Previous studies reported the ability of these molecules to regulate the production of antimicrobial peptides and mucus, intestinal permeability and mucosal immune system activation.<sup>8</sup> The gastrointestinal tract deserves special attention, in particular the potential role of the gut microbiota in the development and management of this disease. Therefore, we hypothesized that a reduction in SCFAs' production would affect SARS-CoV-2 entry and response of intestinal cells.

## Results

### *Treatment with SCFAs does not affect the entry of SARS-CoV-2 or the response of the intestinal tissue to infection*

We used human colon biopsies obtained from healthy individuals for investigating the interaction between SARS-CoV-2, microbiota-derived metabolites and intestinal cells (Table 1). Colonic biopsies are an attractive model for this type of study because they allow us to analyze the impact of infection in a well-preserved tissue architecture that includes the colonic epithelium and its lamina

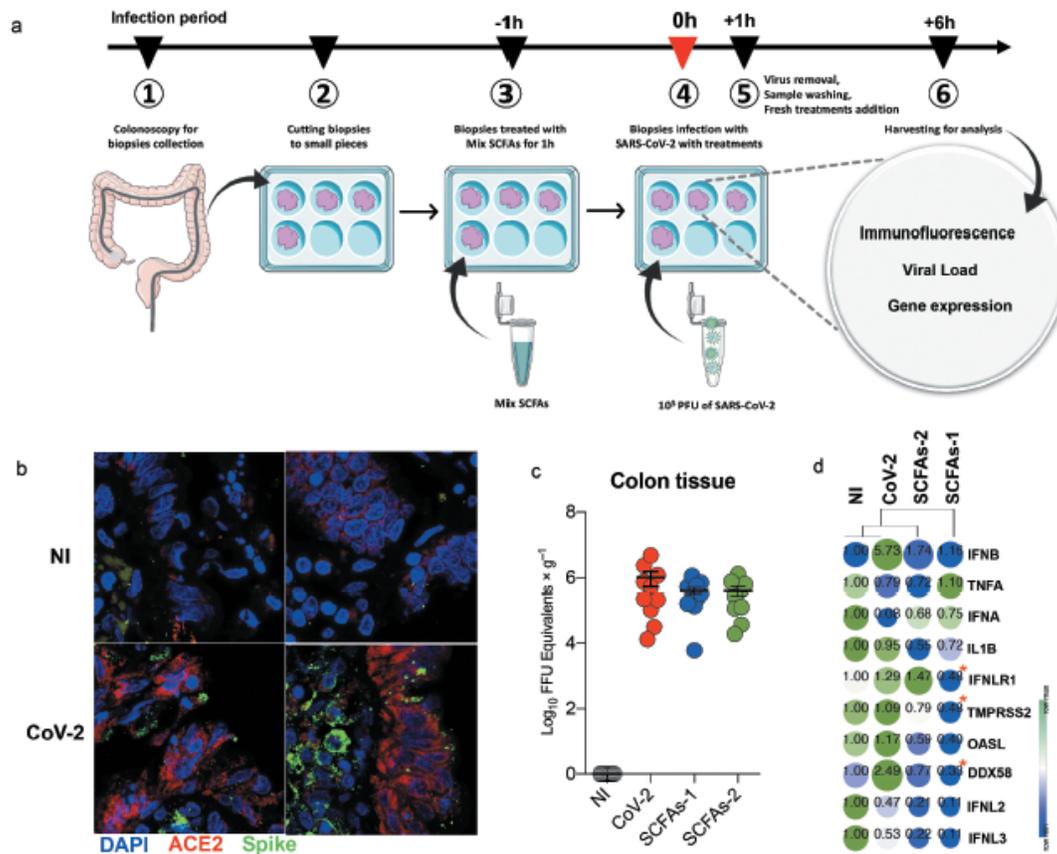
**Table 1.** Demographic and clinical characteristics of the patients included in the study.

Number of participants	11
Gender (M/F)	2/9
Age (y)	43 [19–65]
Body mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	25.03 [21.73–26.56]
Smoking	-
Hemoglobin (g/dL)	12.90 [6.6–14.6]
Hematocrit (%)	38.85 [22.8–44.4]
Platelet (×10 <sup>3</sup> )	269.50 [158–395]
Albumin (g/dL)	4.20 [3.4–4.4]

propria. To reduce the effect of technical and biological aspects associated with the tissue, we used samples obtained from the same individual that were treated and infected *ex vivo* in the same experimental conditions. Biopsies were maintained in culture for up to 7 h and presented normal histological features after this period of incubation.

Immunofluorescence staining revealed that the cells from colonic biopsies expressed the SARS-CoV-2 receptor, the angiotensin-converting enzyme-2 (ACE2, in red), and were efficiently infected by the virus, as shown by the spike staining (green) (Figure 1b). This later finding was confirmed by the measurement of virus load (Figure 1c). Colonic biopsies treated with different concentrations of SCFAs presented the same viral load as the control condition, indicating that these metabolites do not interfere with virus entrance in cells (Figure 1c).

Previous studies in human intestinal organoids infected with SARS-CoV-2 reported increased production of type-I and III interferon (IFN), cytokines that are relevant for the antiviral response.<sup>9–11</sup> Therefore, we evaluated the expression of these cytokines and of inflammatory-related genes in the colonic biopsies. We observed an increase of DDX58, a gene which encodes the viral receptor RIG-I (retinoic acid-inducible gene I), and of IFN beta, in infected biopsies compared with noninfected (Figure 1d). When compared to the infected biopsies, we verified a significant reduction of DDX58 and the type III IFN receptor, IFNLR1, in biopsies treated with SCFAs at the higher concentration (SCFAs 1, Figure 1d). We also observed a reduction in the expression of the serine protease TMPRSS2, a protein that is important for SARS-CoV-2 entry into target cells.<sup>12</sup> The



**Figure 1.** Effect of the SCFAs on the SARS-CoV-2 infection and cytokine response by the intestinal mucosa. (a) Schematic illustration of experimental design. (b) Biopsies infected or not with SARS-CoV-2 and stained for ACE2 (red) and spike (green). Nucleus of cells are identified by DAPI (blue). (c) The viral load was measured in colon biopsies infected with SARS-CoV-2 and incubated in the presence or absence of SCFAs (SCFAs-1 [acetate 16 mM, propionate 4 mM and butyrate 2 mM] and SCFAs-2 [acetate 1.6 mM, propionate 0.4 mM and butyrate 0.2 mM]). Noninfected (NI) biopsies were used as negative controls of the experiments. Results are presented as mean  $\pm$  SEM ( $n = 10$  individuals/group). (d) Gene expression in colon biopsies infected or not with SARS-CoV-2 and incubated in the presence or absence of SCFAs. The expression of genes related to the entry of SARS-CoV-2 (TMPRSS2), inflammation (IL1b and TNF), virus recognition (DDX58) and response (type III Interferon and its receptor – IFNL2, IFNL3 and IFN1, respectively – type I Interferon – IFN beta and IFN alpha), and IFN target genes related to virus elimination (OASL) were analyzed by RTq-PCR. Results were normalized by the NI condition and are presented as mean ( $n = 9$ –12 individuals/group). \* $p < .05$  compared to SARS-CoV-2.

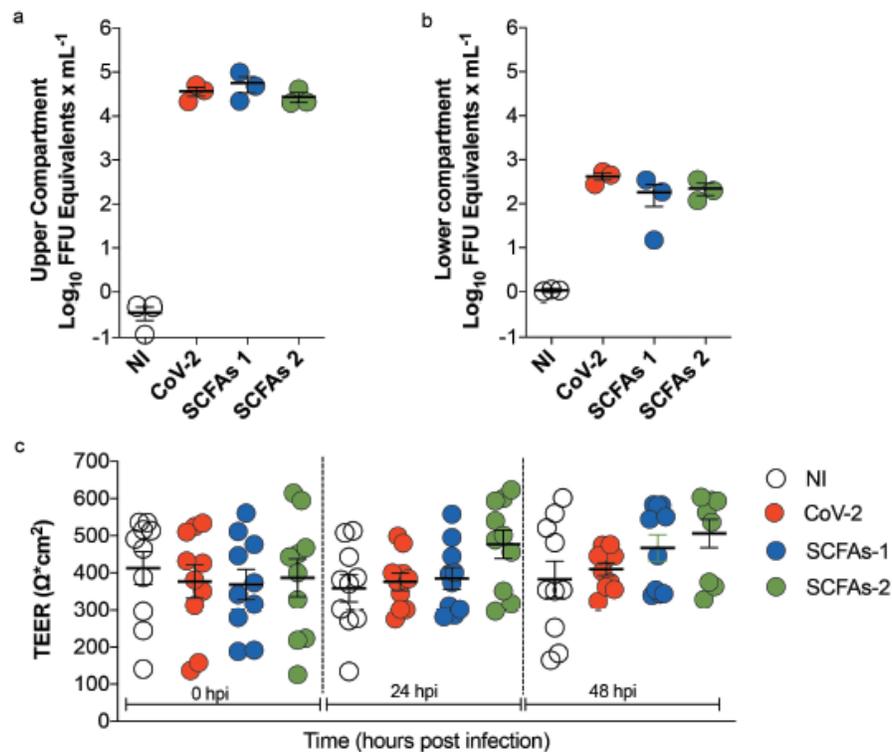
expression of other antiviral and inflammatory genes was not modulated by the SCFAs (Figure 1d).

We next investigated the effect of SARS-CoV-2 and SCFAs on isolated intestinal epithelial cells (Caco-2). For that, we used Caco-2 cells cultivated for 2–3 weeks in transwell inserts. Under this condition, cells differentiate and form a polarized monolayer, whose permeability/integrity can be measured by the transepithelial electrical resistance (TEER). In these experiments, we did not observe any effect of SARS-CoV-2 infection or the SCFAs on transepithelial resistance of Caco-2 monolayers

(Figure 2c). We also measured the amount of virus released in both apical and basolateral surfaces of infected cells and did not find any effect of SCFAs in these parameters (Figure 2a and b). Taken together, our results indicate that SCFAs do not affect the entry, replication or the intestinal cells' response to SARS-CoV-2 infection.

## Discussion

Patients with severe forms of COVID-19 frequently manifest gastrointestinal symptoms such as diarrhea, vomiting and abdominal pain.<sup>13–15</sup> Moreover, gut



**Figure 2.** Effect of the SCFAs on SARS-CoV-2 infection and transepithelial resistance of Caco-2. Caco-2 polarized cells were treated with SCFAs (SCFAs-1 [acetate 8 mM, propionate 2 mM and butyrate 1 mM] and SCFAs-2 [acetate 4 mM, propionate 1 mM and butyrate 0.5 mM]) and infected with SARS-CoV-2. Noninfected (NI) cells were used as negative controls of the experiments (a, b) Viral load was measured by RT-PCR in the upper and lower compartment of Caco-2 monolayer ( $n = 3$ ) at the end of the experiment (48 h after incubation) ( $n = 3$ ). (c) Transepithelial resistance of Caco-2 was measured at 24 and 48 h after infection ( $n = 10$ ). Symbols represent individual samples. Results are presented as mean  $\pm$  SEM. Data presented in (a) and (b) are representative of two independent experiments.

microbiota composition is altered in most COVID-19 patients, and it is neither known if this could worsen the clinical course of the disease, nor if the microbiota modulation could help to restore a balanced immune response against this viral infection.<sup>16,17</sup> Many studies have already been carried out looking for the effects of SCFAs in the treatment of infections, including viral airway infections. The consumption of a high-fiber diet or oral supplementation with acetate protected mice from infection by the respiratory syncytial virus (RSV) through GPR43 activation and IFN beta production in the lung epithelial cells.<sup>18</sup> Butyrate, as well as treatment with a high-fiber diet, was shown to protect mice from influenza infection by modulating their immune response.<sup>19</sup> Treatment of vascular endothelial cells with SCFAs decreased the

expression of VCAM-1 and ICAM-1, resulting in reduced adhesion of infected monocytes and virus transfer to the endothelium.<sup>20</sup> Acetate treatment during Influenza infection was effective in reducing secondary bacterial pulmonary infections.<sup>21</sup> Based on this evidence gathered before the SARS-CoV-2 pandemic, many researchers indicated that the reestablishment of SCFAs endogenous production could be useful for the prevention and treatment of COVID-19.<sup>16,17,22</sup> However, it is worth mentioning that detrimental effects of SCFAs on virus infections have also been reported. A recent study demonstrated that butyrate increases cellular infection by H1N1 influenza A virus, reovirus and human immunodeficiency virus 1 (HIV-1). This effect was associated with suppression of specific antiviral interferon-stimulated genes.<sup>23</sup> Another study

reported an exacerbation of arthropathy-induced by Chikungunya virus in mice after treatment with high-fiber diet or butyrate.<sup>24</sup>

Using colon biopsies from patients who were diagnosed with SARS-CoV-2 a few days after colonoscopy, it was possible to observe that intestinal cells are infected with the new coronavirus.<sup>25</sup> Other studies involving human intestinal organoid experiments confirmed the mechanism of viral entry into intestinal cells, as well as the molecular expression pattern associated with the viral invasion in a context of intestinal inflammation (patients with inflammatory bowel diseases).<sup>26,27</sup> Differences in the expression of molecules related to viral entry depended on the analyzed intestinal segment, ileum or colon.<sup>27</sup>

In the present study, the treatment with a mixture of acetate, propionate, and butyrate did not alter the viral load of intestinal biopsies or intestinal epithelial cells. These findings do not exclude the possibility that the SCFAs have a significant effect on SARS-CoV-2 infection. The antiviral effects promoted by the microbiota and its metabolites may depend on the interactions with different cell types and further studies are needed to understand these mechanisms during SARS-CoV-2 infection.

One of the characteristics of COVID-19 disease is the exacerbated inflammatory response that occurs in a second phase of the disease. Thus, one of the main investigations that has been carried out around the world is to dissect how the infection occurs in each tissue and systems and how that tissue reacts to the presence of this infection, especially in patients who already have an inflammatory condition, such as obesity.<sup>23,28,29</sup> A study with intestinal and pulmonary epithelial cell lines showed that SARS-CoV-2 infection alters the expression of inflammatory cytokines and anti-viral molecules such as IFN $\alpha$  and IFN $\beta$  in lung cells. Their findings suggested the pre-activation of IFN-I signaling pathway as a potential therapeutic and prophylactic management for COVID-19<sup>30</sup>. In our study, the treatment with SCFAs reduced the transcript levels of genes important for the detection of viral molecules, control of viral entry and replication, such as RIG1, TMPRSS2, and the IFN $\lambda$  receptor. However, the viral load of SCFAs-treated samples did not differ from the nontreated infected biopsies indicating that these effects are not sufficient or may be counteracted by other effects of SCFAs on these cells.

Some limitations of our study should be noted, such as the small sample size and the lack of intestinal biopsies from patients with COVID-19. However, the use of human samples, even of noninfected patients, provides a relevant contribution to establish a potential role of SCFAs in this pandemic disease.

Our results need to be validated *in vivo*, but indicate that changes in microbiota composition of patients with COVID19<sup>5,6</sup> and, particularly, of SCFAs do not interfere with the SARS-CoV-2 infection in the intestine. It is worth mentioning that SCFAs can also have systemic effects, which may be relevant for SARS-CoV-2 infection in different contexts.<sup>31</sup>

## Materials and methods

### Patient and sample selection

Left colon mucosa biopsies were collected from patients who underwent colonoscopy examination for diagnostic purposes and who presented no endoscopic abnormalities. All subjects were recruited at the Gastrocenter's Colonoscopy Unit of the Clinic Hospital from University of Campinas (Unicamp) and included in this study after having signed a written informed consent form. Table 1 shows the clinical and demographic characteristics of the 12 patients without comorbidities who participated in the study.

### Virus

Low passage of strain HIAE-02-SARS-CoV-2/SP02/human/2020/bra (GenBank MT126808) kindly donated by Prof. Dr. Edison Durigon (ICB-USP) was propagated in Vero cells (ATCC CCL81) for using in all experiments at the biosafety level 3 area of the Laboratory of Emerging Viruses (IB-Unicamp).

### Culture of intestinal biopsies

Immediately after the mucosa biopsies were collected during the colonoscopy examination, they were washed and included in culture. Culture of intestinal biopsy specimens was performed in RPMI-1640 medium (Sigma-Aldrich, Germany) without L-glutamine and supplemented with 10% fetal calf serum and antibiotic/antimycotic mixture

(Gibco Invitrogen). The samples were divided in four different conditions: noninfected (medium only), infected with SARS-CoV-2 and treated with short-chain fatty acids at two different concentrations (SCFAs-1 [acetate 16 mM, propionate 4 mM and butyrate 2 mM] or SCFAs-2 [acetate 1.6 mM, propionate 0.4 mM and butyrate 0.2 mM]), and infected with SARS-CoV-2. The ratio of SCFAs (acetate, propionate and butyrate) used in the study was similar to what was described in a previous study that measured these metabolites in fecal samples.<sup>32</sup> The concentrations of SCFAs were chosen based on experiments performed with Caco-2 cells in which we found that incubation for 24 h with SCFAs did not affect their viability.

All infections were performed with  $10^5$  PFU of SARS-CoV-2 for 1 h at room temperature (20–25°C) with continuous and gentle agitation. After viral adsorption, samples were washed three times with PBS 1x (0.15 M) and incubated for 6 h at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub> atmosphere with related media conditions. The experimental design of culture and different treatments are illustrated in Figure 1a.

### Cell culture

Human colon cancer cells (Caco-2) seeded  $2 \times 10^4$  cells per inserts into transwell 24-well plate (0.4  $\mu$ m polycarbonate membrane with 0.33 cm<sup>2</sup> area, Costar). Cells were maintained in Dulbecco's modified Eagle medium (Gibco) supplemented with 20% fetal bovine serum (FBS) and 1% Penicillin-Streptomycin at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for up to 21 d with changes of medium every 2 d. The medium volume in the up chamber was 0.2 mL and in the basal chamber was 0.5 mL. After 21 d of differentiation, cells were pretreated for 1 h with SCFAs (SCFAs-1 [8 mM de acetate, 2 mM de propionate and 1 mM de butyrate] and SCFAs-2 [4 mM de acetate, 1 mM propionate and 0.5 mM butyrate]) or medium alone. Cells were then infected with MOI of 1 at room temperature for 1 h with continuous and gentle agitation. Before viral adsorption, SARS-CoV-2 inoculum was removed, cells were washed three times with PBS 1x and then maintained with related media. Transepithelial resistance was measured immediately after infection

(time 0), 24- and 48-h post-infection, as previously described.<sup>33,34</sup>

### RNA extraction and quantification

Total RNA was extracted from colonic mucosa samples and culture supernatants using RNeasy Mini Kit (Qiagen, USA) according to the manufacturer's instructions. For qPCR analysis, RNA purity and concentration were determined by UV spectrophotometry at 260 nm using the BioTek Eon Microplate Spectrophotometer and Gen5 v 2.0 software.

### Viral load quantification

Viral RNA was detected and quantified by Charité protocol of one-step RT-Qpcr<sup>34</sup> using 3  $\mu$ L of TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems), 800 nM of primers (Forward: 5-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3; Reverse: 5-ATA TTG CAG CAG TAC GCA TAC GCA CAC A-3), 400 nM of probe (Probe: 5-6FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-QSY -3) and 6  $\mu$ L of RNA samples. The cycling method for running was: 1 cycle of 50°C for 10 min, 1 cycle of 95°C for 2 min, followed by 45 cycles of 95°C for 5 s and 60°C for 30 s in the QuantStudio3 System (Applied Biosystems). Negative and positive control samples were included in every run.

### Gene expression by RT-qPCR

For cDNA synthesis, the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was used according to the manufacturer's instructions. qPCR reactions were performed using the TaqMan™ system (Applied Biosystems) for the following primers: IL1b (Hs\_01555410\_m1), TNFA (Hs\_00174128\_m1), GAPDH (4326317E), IFNL2 (Hs00820125) and IFNL3 (Hs04193048), and using Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) for the following primers: DDX58 (F: CACCTCAGTTGC TGATGAAGGC and R: GTCAGAAGGAAGCA CTTGCTACC), OASL (F: GTGCCTGAAACAGG ACTGTTGC and R: CCTCTGCTCCACTGTC AAGTGG), IFNA (F: GTRACTGCAGAATCTCTCC TTT CTCCTG and R: GTGTCTAGATCTGACAA

CCTCCCAGGCACA), IFNB1 (F: TTGTGCTTCT CCACTACAGC and R: CTGTAAGTCTGTTAATG AAG), TMPRSS2 (F: CAAGTGCTCCAACTCTGGG AT and R: AACACACCGATTCTCGTCCTC), IFNL1 (F: ACCTATTTTGTGGCCTATCAGAG CT and R: CGGCTCCACTTCAAAAAGGTAAT). qPCR was performed with the StepOnePlus System (Applied Biosystems) using the TaqMan Fast Advanced master mix (Life Technologies) or Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems). All measurements were normalized by the expression of the GAPDH gene using the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  method.

### Immunofluorescence

Colon biopsies were fixed in paraformaldehyde 4% for 24 h and then embedded in paraffin. Five-micrometer-thick sections were prepared for immunofluorescent detection of ACE2 and viral spike protein. Samples were deparaffinized by two 10 min-incubation with Xylol, followed by an incubation with xylol:ethanol (1:1) solution for 10 min, followed by incubations with different concentrations of Ethanol solution (ethanol 100%, ethanol 95%, ethanol 85% and ethanol 70%, respectively, all diluted in DEPC), for 5 min each, and finalizing with water DEPC for 5 min and two times PBS 1x pH 7.4 for 5 min. To avoid autofluorescence, the tissues were treated with 2% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> methanol for 30 min, washed with PBST, and treated with glycine 0.1 M in PBST for 10 min at room temperature. The samples were then washed and treated with 1% bovine serum albumin (BSA) solution in PBST for 30 min, to block nonspecific epitopes. Tissues were incubated with SARS-CoV-2 Spike S1 Antibody (HC2001) (GenScript – A02038) and ACE2 Antibody (Rheabiotec – IM-0060, both diluted 1:100 in BSA 1% solution in PBST, and incubated overnight at 4°C in a humid box. The slides were then washed and incubated with anti-human IgG Alexa 488 (ThermoFisher – A11013) and anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594 (ThermoFisher – A21207), both diluted 1:500 in BSA 1% solution in PBST for 2 h at room temperature in a humid box, protected from the light. The samples were washed again, incubated DAPI (Santa Cruz Biotechnology – SC-3598) diluted 1:1000 in BSA 1% solution in PBST for 5 min at room temperature

protected from the light, and mounted in an aqueous mounting solution for confocal imaging.

Microscopy images were acquired with a Zeiss LSM880 with Airyscan on an Axio Observer 7 inverted microscope (Carl Zeiss AG, Germany) with a C Plan Apochromat 63x/1.4 Oil DIC objective, 4x optical zoom. Prior to image analysis, raw. czi files were automatically processed into deconvoluted Airyscan images using Zen Black 2.3 software. For DAPI were acquired conventional confocal image using 405-nm laser line for excitation and pinhole set to 1 AU.

### Statistical analysis

Analyses were performed using GraphPad software 8.0 (San Diego, CA, USA). Results are presented as mean  $\pm$  standard error mean (SEM) and “n” represents the number of samples, as indicated in the corresponding figure legend. Differences were considered significant for  $p < .05$ . Results were compared by non-parametric Mann–Whitney test.

### Acknowledgments

We thank Prof. Azucena Salas from the Department of Gastroenterology, IDIBAPS, Hospital Clinic, Barcelona, Spain, for carefully reviewing our report. The authors acknowledge the technical support of Elzira E. Saviani and the help of healthcare workers and volunteers.

### Availability of data

All relevant data supporting the findings of this study are available within this report.

### Ethics approval and consent to participate

This study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of the University of Campinas (CAAE #30571720.1.0000.5404). All participants read and signed a written informed consent form for study participation.

### Consent for publication

Ethical approval by the ethic board of the University of Campinas (UNICAMP) and consent of patients are included in the original publications.

## Competing Interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Contributors

MARV and RFL conceived the study, designed the study, supervised the study, interpreted the results and revised the manuscript. MARV, RFL and JLP searched the literature. LBP, PBR, LMG, ABSPG, DATT, PLP, KB-d-S, CLS, and LNS did the experiments, plotted and analyzed the data. LBP and PBR contributed equally. All the authors revised the letter. All authors contributed to the writing of the report. All authors contributed to writing the manuscript, and approved the final version for publication.

## Funding

This work was supported by São Paulo Research Foundation (FAPESP) (#20/04583-4, #20/04579-7, #20/04746-0, #20/04919-2, #20/04558-0, #19/06372-3, #13/07607-8) and by FAEPEX-UNICAMP (# 2332/20). P.B.R. (#19/14342-7), A.B. S.P.G. (#20/02312-3), P.L.P. (#17/26908-0), KB-d-S (#20/02159-0) and CLS (20/02448-2) were supported by FAPESP fellowships. L.B.P. was supported by FAEPEX-UNICAMP fellowship (#2332/20). L.M.G. and DATT were supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) fellowship (#140462/2020-1 and #141844/2019-1). The study was also financed by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

## ORCID

Raquel Franco Leal  <http://orcid.org/0000-0003-4285-4402>

## References

1. WHO - Coronavirus disease (COVID-2019) situation reports. 2020b. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situationreports>.
2. Guo T, Fan Y, Chen M, Wu X, Zhang L, He T, Wang H, Wan J, Wang X, Lu Z. Cardiovascular implications of fatal outcomes of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):811–818. doi:10.1001/jamacardio.2020.1017.
3. Liu Y, Yan LM, Wan L, Xiang TX, Le A, Liu JM, Peiris M, Poon LLM, Zhang W. Viral dynamics in mild and severe cases of COVID-19. *Lancet Infect Dis.* 2020 Jun;20(6):656–657. doi:10.1016/S1473-3099(20)30232-2.
4. Cheung KS, Hung IFN, Chan PPY, Lung KC, Tso E, Liu R, Ng YY, Chu MY, Chung TWH, Tam AR, et al. Gastrointestinal manifestations of SARS-CoV-2 Infection and virus load in fecal samples from a hong kong cohort: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology.* 2020;159(1):81–95. doi:10.1053/j.gastro.2020.03.065.
5. Zuo T, Liu Q, Zhang F, Lui GCY, Tso EYK, Yeoh YK, Chen Z, Boon SS, Chan FKL, Chan PKS, et al. Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut.* 2020;20:322294.
6. Gu S, Chen Y, Wu Z, Chen Y, Gao H, Lv L, Guo F, Zhang X, Luo R, Huang C, et al. Alterations of the gut microbiota in patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clin Infect Dis.* 2020;4:ciaa709.
7. Dumas A, Bernard L, Poquet Y, Lugo-Villarino G, Neyrolles O. The role of the lung microbiota and the gut lung axis in respiratory infectious diseases. *Cell Microbiol.* 2018;20(12):e12966. doi:10.1111/cmi.12966.
8. Corrêa-Oliveira R, Fachi JL, Vieira A, Sato FT, Vinolo MAR. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. *Clin Transl Immunology.* 2016;5(4):e73. doi:10.1038/cti.2016.17.
9. Lamers MM, Beumer J, van der VJ. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science.* 2020;369:50–54. doi:10.1126/science.abc1669.
10. Stanifer ML, Kee C, Cortese M, et al. Critical role of type III interferon in controlling SARS-CoV-2 infection in human intestinal epithelial cells. *Cell Rep.* 2020;32(1):107863. doi:10.1016/j.celrep.2020.107863.
11. Zang R, et al. TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Sci Immunol.* 2020;5(47) 10.1126/sciimmunol.abc3582 doi: 10.1126/sciimmunol.abc3582.
12. Hoffmann et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271–280. doi:10.1016/j.cell.2020.02.052.
13. Zuo T, et al. Alterations in gut microbiota of patients with COVID-19 during time of hospitalization. *Gastroenterology.* 2020;159:944–955. doi:10.1053/j.gastro.2020.05.048.
14. Wan Y, et al. Enteric involvement in hospitalised patients with COVID-19 outside Wuhan. *Lancet Gastroenterol Hepatol* 2020 Jun 56:534–535.DOI: 10.1016/S2468-1253(20)30118-7.
15. Cholankeril G, Podboy A, Aivaliotis VI, Tarlow B, Pham EA, Spencer SP, Kim D, Hsing A, Ahmed A. High prevalence of concurrent gastrointestinal manifestations in patients with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: early experience from California. *Gastroenterology.* 2020;159(2):775–777. doi:10.1053/j.gastro.2020.04.008.
16. Archer DL, Kramer DC. The use of microbial accessible and fermentable carbohydrates and/or butyrate as supportive treatment for patients with coronavirus SARS-CoV-2 infection. *Front Med.* 2020;7:292. doi:10.3389/fmed.2020.00292.
17. He L-H, et al. Intestinal flora as a potential strategy to fight SARS-CoV-2 Infection. *Front Microbiol.* 2020;11:1388. doi:10.3389/fmicb.2020.01388.

18. Antunes KH, et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. *Nat Commun.* 2019;10:3273. doi:10.1038/s41467-019-11152-6.
19. Trompette A, Gollwitzer ES, Pattaroni C, Lopez-Mejia IC, Riva E, Pernot J, et al. Dietary fiber confers protection against flu by shaping Ly6c<sup>+</sup> patrolling monocyte hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T cell metabolism. *Immunity.* 2018;48(5):992–1005.e8. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.022.
20. Poelaert KCK, et al. Beyond gut instinct: metabolic short-chain fatty acids moderate the pathogenesis of alphaherpesviruses. *Front Microbiol.* 2019;10:723. doi:10.3389/fmicb.2019.00723.
21. Sencio, et al. Gut dysbiosis during influenza contributes to pulmonary pneumococcal superinfection through altered short-chain fatty acid production. *Cell Reports* 30. 2020;30(9):2934–2947. doi:10.1016/j.celrep.2020.02.013.
22. He Y, et al. Main clinical features of COVID-19 and potential prognostic and therapeutic value of the microbiota in SARS-CoV-2 infections. *Front Microbiol.* 2020;11:1302. doi:10.3389/fmicb.2020.01302.
23. Chemudupati M, Kenney AD, Smith AC, Fillinger RJ, Zhang L, Zani A, Liu S-L, Anderson MZ, Sharma A, Yount JS. Butyrate reprograms expression of specific interferon-stimulated genes. *J Virol.* 2020;94:e00326–20. doi:10.1128/JVI.00326-20.
24. Prow NA, Hirata TDC, Tang B, Larcher T, Mukhopadhyay P, Alves TL, Le TT, Gardner J, Poo YS, Nakayama E, et al. Exacerbation of chikungunya virus rheumatic immunopathology by a high fiber diet and butyrate. *Front Immunol.* 2019;10:2736. doi:10.3389/fimmu.2019.02736.
25. Qian Q, et al. Direct evidence of active SARS-CoV-2 replication in the intestine. *Clinical Infectious Diseases.* 2020;8:ciaa925. doi:10.1093/cid/ciaa925.
26. Verstockt B, et al. Intestinal receptor of SARS-CoV-2 in inflamed IBD tissue seems downregulated by HNF4A in ileum and upregulated by interferon regulating factors in colon. *J Crohns Colitis.* 2020;11:jjaa185. Doi: 10.1093/ecco-jcc/jjaa185.
27. Nuzzo D, Picone P. Potential neurological effects of severe COVID-19 infection. *Neurosci Res.* 2020;158:1–5.
28. Tang Y, et al. Cytokine storm in COVID-19: the current evidence and treatment strategies. *Front Immunol.* 2020;11:1708. doi:10.3389/fimmu.2020.01708.
29. Friedland RP, Haribabu B. The role for the metagenome in the pathogenesis of COVID-19. *EBioMedicine.* 2020;61:103019.
30. Trottein F, Sokol H. Potential causes and consequences of gastrointestinal disorders during a SARS-CoV-2 Infection. *Cell Rep.* 2020;32(3):107915. doi:10.1016/j.celrep.2020.107915.
31. Shuai H, et al. Differential immune activation profile of SARS-CoV-2 and SARS-CoV infection in human lung and intestinal cells: implications for treatment with IFN- $\beta$  and IFN inducer. *Journal of Infection.* 2020;81:e1–e10. doi:10.1016/j.jinf.2020.07.016.
32. Machiels K, Joossens M, Sabino J, De Preter V, et al. A decrease of the butyrate-producing species *Roseburia hominis* and *Faecalibacterium prausnitzii* defines dysbiosis in patients with ulcerative colitis. *Gut* 2014;638:1275–1283. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304833. Epub 2013 Sep 10. PMID: 24021287.
33. Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, et al. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom.* 2015;202:107–126. doi:10.1177/2211068214561025.
34. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill.* <https://www.eurosurveillance.org/docserver/fulltext/eurosurveillance/25/3/eurosurv-25-35.pdf?expires=1593453322&id=id&accname=guest&checksum=E9E3700C4AF1A24AE86236123BABB41>

## **CAPÍTULO 4 – ARTIGO ORIGINAL 2**

### **Impacto da depleção da microbiota por antimicrobianos orais na resposta clínica e imunológica de camundongos K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2**

Dados clínicos e experimentais indicam que a infecção por SARS-CoV-2 está associada a mudanças significativas na composição e função da microbiota intestinal. No entanto, a relevância desses efeitos para a fisiopatologia do SARS-CoV-2 é desconhecida. Neste estudo, analisamos o impacto da depleção da microbiota após o tratamento com antimicrobianos orais de amplo espectro nas respostas clínicas e imunológicas de camundongos K18-hACE2 infectados por SARS-CoV-2. Os camundongos foram tratados com uma combinação de antimicrobianos orais (canamicina, gentamicina, metronidazol, vancomicina e colistina, Abx) por 3 dias e, 24 horas depois, foram infectados com a linhagem SARS-CoV-2 B. Nossos dados mostram que mais de 80% dos camundongos sucumbiram à infecção no dia 11 após a infecção. O tratamento com Abx não teve impacto na mortalidade. No entanto, camundongos tratados com Abx apresentaram sintomas clínicos atenuados, apesar da perda de peso ter sido semelhante entre os grupos infectados-tratados e não-tratados. Não observamos diferenças nos escores histopatológicos de pulmão e cólon ou na carga viral presente nos órgãos (pulmão, cólon, coração, cérebro e rim) entre os grupos no 5º dia de infecção. Apesar de algumas pequenas diferenças na expressão de marcadores antivirais e inflamatórios nos pulmões e cólon, nenhuma mudança robusta foi observada em camundongos tratados com Abx. Juntos, esses achados indicam que a depleção da microbiota não tem impacto na infecção por SARS-CoV-2 em camundongos.

Article

# Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE2 Mice

Patrícia Brito Rodrigues <sup>1</sup>, Giovanni Freitas Gomes <sup>2</sup>, Monara K. S. C. Angelim <sup>3</sup>, Gabriela F. Souza <sup>4</sup>, Stefanie Primon Muraro <sup>4</sup>, Daniel A. Toledo-Teixeira <sup>4</sup>, Bruna Amanda Cruz Rattis <sup>5</sup>, Amanda Stephane Passos <sup>2,6</sup>, Laís Passarielo Pral <sup>1</sup>, Vinícius de Rezende Rodovalho <sup>1</sup>, Arilson Bernardo dos Santos P. Gomes <sup>1</sup>, Valquíria Aparecida Matheus <sup>1</sup>, André Saraiva Leão Marcelo Antunes <sup>7</sup>, Fernanda Crunfli <sup>7</sup>, Krist Helen Antunes <sup>8</sup>, Ana Paula Duarte de Souza <sup>8</sup>, Silvio Roberto Consonni <sup>9</sup>, Luiz Osório Leiria <sup>2,6</sup>, José Carlos Alves-Filho <sup>2,6</sup>, Thiago M. Cunha <sup>2,6</sup>, Pedro M. M. Moraes-Vieira <sup>3,10,11,†</sup>, José Luiz Proença-Módena <sup>4,11</sup> and Marco Aurélio R. Vinolo <sup>1,10,11,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Immunoinflammation, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>2</sup> Center of Research in Inflammatory Diseases, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil
  - <sup>3</sup> Laboratory of Immunometabolism, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>4</sup> Laboratory of Emerging Viruses, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>5</sup> Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil
  - <sup>6</sup> Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil
  - <sup>7</sup> Laboratory of Neuroproteomics, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>8</sup> Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90000-000, Brazil
  - <sup>9</sup> Laboratory of Citochemistry and Immunocitochemistry, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>10</sup> Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
  - <sup>11</sup> Experimental Medicine Research Cluster, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil
- \* Correspondence: mvinolo@unicamp.br  
 † The COVID-19 International Research Team (COV-IRT) is a community of scientists driving research into COVID-19.



Citation: Rodrigues, P.B.; Gomes, G.F.; Angelim, M.K.S.C.; Souza, G.F.; Muraro, S.P.; Toledo-Teixeira, D.A.; Rattis, B.A.C.; Passos, A.S.; Pral, L.P.; de Rezende Rodovalho, V.; et al. Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE2 Mice. *Cells* **2022**, *11*, 2572. <https://doi.org/10.3390/cells11162572>

Academic Editor: Cord Brakebusch

Received: 16 July 2022

Accepted: 13 August 2022

Published: 18 August 2022

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



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

**Abstract:** Clinical and experimental data indicate that severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)-2 infection is associated with significant changes in the composition and function of intestinal microbiota. However, the relevance of these effects for SARS-CoV-2 pathophysiology is unknown. In this study, we analyzed the impact of microbiota depletion after antibiotic treatment on the clinical and immunological responses of K18-hACE2 mice to SARS-CoV-2 infection. Mice were treated with a combination of antibiotics (kanamycin, gentamicin, metronidazole, vancomycin, and colistin, Abx) for 3 days, and 24 h later, they were infected with SARS-CoV-2 B lineage. Here, we show that more than 80% of mice succumbed to infection by day 11 post-infection. Treatment with Abx had no impact on mortality. However, Abx-treated mice presented better clinical symptoms, with similar weight loss between infected-treated and non-treated groups. We observed no differences in lung and colon histopathological scores or lung, colon, heart, brain and kidney viral load between groups on day 5 of infection. Despite some minor differences in the expression of antiviral and inflammatory markers in the lungs and colon, no robust change was observed in Abx-treated mice. Together, these findings indicate that microbiota depletion has no impact on SARS-CoV-2 infection in mice.

**Keywords:** respiratory infection; SARS-CoV-2; COVID-19; intestinal microbiota; colon; gut-to-lung axis

## 1. Introduction

Severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2) is the etiological agent of coronavirus disease-2019 (COVID-19), a disorder that affects the respiratory tract, triggering a severe respiratory disorder and pneumonia in humans [1]. This virus emerged in Wuhan City, China, at the end of 2019 and quickly spread to all continents. By March 2022, more than 458 million cases had been confirmed, with over 6 million deaths due to COVID-19, according to the Worldometer Coronavirus database [2].

Clinical manifestations of COVID-19 vary from asymptomatic cases to severe disease [3]. Comorbidities such as obesity, diabetes, hypertension and cardiovascular diseases, older age and immunocompromised states have been strongly linked with severe outcomes [4]. Multiple vaccines against SARS-CoV-2 have been successfully developed and offered to the population [5], having a significant positive impact on the number of cases and deaths [6].

SARS-CoV-2 pathogenesis involves different steps: (1) virus entry and replication in epithelial, endothelial and immune cells of the respiratory tract, (2) destruction of infected cells with virus release and (3) triggering of a local immune response, which may be sufficient to eliminate the infection [7]. In some cases, the infection may evolve to a dysfunctional immune response that leads to lung damage, endothelial dysfunction and systemic alterations, resulting in severe clinical complications such as abnormal blood coagulation, heart diseases, neurological alterations and liver and kidney injuries, which can progress to multi organ failure and death [7]. Infection by SARS-CoV-2 is not limited to the lungs and respiratory-associated tissues. Recent studies have demonstrated that gastrointestinal (GI) manifestations including loss of appetite, nausea or vomiting, diarrhea and abdominal pain are relatively common in SARS-CoV-2-infected patients [8]. It has also been reported that the GI tract appears to be an important target of SARS-CoV-2 replication, since viral mRNA and the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein have been frequently detected in different parts of the human GI tract in infected individuals [9,10]. Moreover, human intestinal epithelial cell lines [11] are usually susceptible to SARS-CoV-2 and this virus also infects and replicates in human small intestine enterocytes [12]. GI manifestations of SARS-CoV-2 infection can be the result of direct histopathological alterations, but may also reflect the systemic effects of the infection or changes induced in the immune system or the intestinal microbiota [13,14].

The GI tract is the largest immunological tissue in the body and its resident microbiota modulate host immune responses [15]. Promising results obtained using different models demonstrated the relevance of the intense and complex cross-talk between the gut microbiota, the lungs and the systemic immune response, thus highlighting the potential of preventive and/or therapeutic strategies for respiratory infectious diseases based on changes in microbiota composition or the production of metabolites [16–20].

COVID-19 patients present drastic changes in gut microbiota composition, including an increased amount of opportunistic pathogens such as *Clostridium hathewayi*, *Actinomyces viscosus* and *Bacteroides nordii* [21]. Depletion of beneficial commensals including *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae bacterium 5\_1\_63FAA*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum* and *Dorea formicigenerans* has been observed in COVID-19 patients treated with antibiotics, indicating that this intervention can accentuate the shift in microbiota composition from a healthy to an unhealthy condition [21]. The dysbiotic gut microbiota of COVID-19 patients has been associated with elevated levels of cytokines and inflammatory markers, suggesting a relationship between alterations in gut microbiota and the severity of the disease [22]. Moreover, a recent study found an association between COVID-19 gut dysbiosis, particularly depletion of *Faecalibacterium* and *Roseburia* genera, and an increased inflammatory profile, as observed in severe or critical COVID-19 patients [23]. A recent study found an association between dysbiotic microbiota and the translocation of bacteria into the blood of COVID-19 patients, thus contributing to the increased inflammatory profile observed in these patients and the development of secondary infections [24]. Intestinal dysbiosis has also been reported in mice, hamsters and nonhuman primates infected with

SARS-CoV-2 [25–27], indicating that the gut microbiome profile is involved in this disease and strategies to alter the intestinal microbiota might change the disease outcome.

The relationship between COVID-19 and changes in the composition of the intestinal microbiota becomes increasingly evident with the advancement of research in humans and animal models. However, factors associated with treatment during COVID-19 in humans make it difficult to understand the role of the microbiota in the development of the disease. In the present study, we explored the effect of acute treatment with broad-range oral antibiotics, which was previously demonstrated to impair the antiviral response in mice to respiratory syncytial virus (RSV) [28]. We show that treatment with antibiotics has no direct impact on the survival and immune response of SARS-CoV-2-infected mice. Moreover, microbiota depletion had no significant effects on viral lethality, tropism, load and histopathological alterations in key target tissues.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Animals

Adult heterozygous K18-hACE2 transgenic female mice were purchased from the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB), Campinas, São Paulo, Brazil. Mice were kept in regular filter-top cages with free access to sterile water and food. Animal procedures were approved by the Ethics Committee on Animal Use of the University of Campinas (protocol #5495-1/2020).

### 2.2. Antibiotic Treatment

Mice were provided with sterile drinking water supplemented with an antibiotic mix (Abx) for three days before SARS-CoV-2 infection. Abx [28] was composed of kanamycin (0.4 mg/mL), gentamicin (0.035 mg/mL), metronidazole (0.045 mg/mL), vancomycin (0.045 mg/mL) and colistin (0.035 mg/mL), purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). The addition of antibiotics to drinking water did not cause a reduction in water intake by the animals and no diarrhea was observed.

### 2.3. Virus

SARS-CoV-2 B strain (HIAE-02-SARS CoV-2/SP02/human/2020/BRA; GenBank MT126808.1) was a gift from Prof. Dr. Edison Durigon (ICB-USP, São Paulo, Brazil). Viral stock was propagated in Vero cells (ATCC CCL81) and the supernatant was harvested at 2–3 days post-infection (dpi) and kept at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Viral titers were determined by plaque assays and RT-qPCR [29]. The virus was produced in a biosafety level (BSL) 3 area of the Laboratory of Emerging Viruses and kindly provided by Prof. Dr. José Luiz Proença-Módena (Institute of Biology, UNICAMP, Campinas, Brazil).

### 2.4. SARS-CoV-2 Infection and Clinical Analysis of Mice

Virus inoculation was performed under anesthesia induced using a mixture of xylazine and ketamine (20 and 100 mg/kg, respectively). Mice were intranasally administered  $5 \times 10^4$  plaque forming units (PFU) of SARS-CoV-2 in a total volume of 40  $\mu\text{L}$  for mortality testing and  $1 \times 10^4$  PFU for the other experiments involving tissue harvesting at 5 dpi. All infections were performed at the animal BSL 3 laboratory of Ribeirão Preto Medical School (FMRP, Ribeirão Preto, Brazil). Following infection, mice were monitored daily for body weight changes and signs of disease. A clinical score based on body weight variation, behavior and respiratory distress was used to evaluate the disease over the course of infection in each animal (Table 1). The clinical score was obtained by summing the scores of the six parameters evaluated for each animal. The clinical score data are presented as the mean of the group per day.

**Table 1.** Parameters and point scale to calculate the clinical score <sup>1</sup>.

Clinical Parameters	Degree	Score Points
Body weight loss	Normal	0
	<5%	1
	6–10%	2
	11–15%	3
	16–20%	4
	>20%	5
Appearance	No piloerection	0
	Piloerection	1
Spontaneous behavior	Alert	0
	Slow-moving	1
	Lethargic	2
	Immobile	3
Eyes	Normal	0
	Squinted	1
	Closed	2
Provoked behavior	Quickly moves away	0
	Slow to move away	1
	Does not respond	2
Breathing	Normal	0
	Elevated	1

<sup>1</sup> Adapted from Moreau et al. [30] and Kumari et al. [31].

### 2.5. Bacterial DNA Isolation from Mice Feces

Fecal samples were collected 1 day before and 1 day after (D0) antibiotic treatment and prior to SARS-CoV-2 infection. Fecal pellets were collected in sterile DNase-free tubes and immediately frozen in liquid nitrogen. Samples were kept at  $-80^{\circ}\text{C}$  until use. DNA extraction was performed using the Purelink Microbiome DNA purification kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA), following the manufacturer's recommendations. Purified DNA was eluted in 20  $\mu\text{L}$  elution buffer and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNA concentrations were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer.

### 2.6. rRNA Sequencing and Analysis

Luminal colonic contents were collected at 5 dpi from both experimental groups. In addition, we also included samples from non-infected animals. Samples were collected in sterile DNase-free tubes and immediately frozen in liquid nitrogen. DNA extraction was performed using the Purelink Microbiome DNA purification kit (ThermoFisher Scientific), following the manufacturer's recommendations. Purified DNA was eluted in 20  $\mu\text{L}$  elution buffer and kept at  $-20^{\circ}\text{C}$ . DNA concentrations were measured using a NanoDrop 2000 spectrophotometer. Universal primers 341F ( $5'$ -CCT AYG GGR BGC ASC AG- $3'$ ) and 806R ( $5'$ -GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT- $3'$ ) were used for the amplification of the V3-V4 region of the bacterial 16S rRNA gene. Library quantification and quality was assessed on Qubit@ 2.0 Fluorometer (Thermo Scientific) and Agilent Bioanalyzer 2100 systems. The libraries were sequenced on a NovaSeq PE250 at Novogene.

Fastq files with raw sequences were subjected to quality control with FastQC [32] and MultiQC [33]. Demultiplexed sequences were imported into QIIME2 2021.11 [34], for filtering, paired-end read combination, denoising and chimera detection with the DADA2 plugin [35]. The resulting table of amplicon sequence variants (ASVs) was rarefied at a rarefaction depth of 42,258 [36] and used to construct a phylogenetic placement with SEPP [37]. Alpha and beta diversity metrics, as well as Principal Coordinate Analysis (PCoA), were estimated with the QIIME2 diversity plugin [38–41]. Taxonomic composition analysis was performed with the q2-feature-classifier [42] using a Naive Bayes classifier trained on Silva 138 99% OTU full-length sequences [43–45]. Differential analysis was

conducted at phylum and class level using the QIIME2 composition plugin with the ANCOM statistical framework [46]. Visualizations were obtained with the QIIME2 View interface and Python's library Seaborn [47]. The raw reads of 16S rRNA sequencing were submitted to the National Center for Biotechnology Information's Sequence Read Archive (NCBI SRA) with the accession number PRJNA858922.

### 2.7. RNA Extraction and Quantification

Tissues were weighed and homogenized in 1 mL Hank's Balanced Salt (HBSS) containing a mixture of antibiotics (0.2% Normocin, 1% Penicillin and Streptomycin and 1% Gentamicin) and zirconia beads in MagNaLyser equipment (Roche Life Science, Mannheim, Germany). The homogenates were clarified by centrifugation and used for RNA extraction, which was performed using the Quick-RNA viral kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA), following the manufacturer's instructions. RNA concentrations were determined using the NanoDrop 2000 spectrophotometer.

### 2.8. Viral Load Quantification

Viral RNA was detected and quantified by one-step RT-qPCR, using primers for gene E (envelope protein), as previously described [48]. Briefly, all assays were performed using TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, MA, USA), 800 nM of primers (F: 5-ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT-3; R: 5-ATA TTG CAG CAG TAC GCA TAC GCA CAC A-3), 400 nM of probe (P: 5-6FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-QSY-3) and 6  $\mu$ L RNA samples. The PCR cycling conditions were: 1 cycle of 50 °C for 10 min, 1 cycle of 95 °C for 2 min, followed by 45 cycles of 95 °C for 5 s and 60 °C for 30 s, using the QuantStudio3 Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Negative samples and a standard curve were included in all PCR runs. The standard curve was built using serial 10-fold dilutions of viral stock of known titer, and the viral copy number was expressed on a log<sub>10</sub> scale as viral RNA equivalents per gram or per milliliter after normalization for tissue weight.

### 2.9. Histopathological Score

After 5 dpi, mice were anesthetized with ketamine–xylazine mixture (20 and 100 mg/kg, respectively) and, after total loss of response to stimuli, blood was collected through the retrobulbar venous plexus. Mice were intracardially perfused with 20 mL sterile saline solution before harvesting the tissues of interest. For histological analyses, samples were fixed in 4% PFA for 72 to 96 h at 8 °C. After fixation, tissues were washed three times in saline solution and kept in 70% ethanol solution. Lungs were embedded in paraffin and sectioned transversely at a width of 5  $\mu$ m. Intestines were embedded in historesin (Leica Microsystems, Heidelberg, Germany) and sectioned transversely at a width of 2  $\mu$ m. Sections were produced using a microtome for hematoxylin and eosin staining. On intestine sections, the presence of inflammatory cell infiltration, edema and epithelial erosions was assessed. For lung tissue analysis, factors such as type II pneumocyte hyperplasia, perivascular, septal and alveolar inflammation, edema and alveolar fibrin were evaluated [49].

### 2.10. Bronchoalveolar Lavage Fluid (BALF)

Mice were anesthetized as described below and the tracheas were cannulated. The lungs were washed with a cold DMEM medium. BALF were kept on ice until all samples were collected. Samples were centrifuged and pellets suspended for total cell count and flow cytometry analysis. The counting procedure was performed in a blinded manner by an experienced investigator.

### 2.11. Flow Cytometry

After washing with saline solution, single cell suspensions were stained for 20 min at 4 °C, with two separate staining mixtures: (a) anti-CD45-APC-Cy7 (#103116 BioLegend® (San Diego, CA, USA), Clone 30-F11), anti-CD3 $\epsilon$ -PerCP-Cy5.5 (#100217 BioLegend®, Clone 17A2), anti-

CD4-PE (#553048 BD Biosciences® (Franklin Lakes, NJ, USA), Clone RM4-5), anti-CD8a-APC (#100711BioLegend®, Clone 53-6.7) or (b) anti-CD45-APC-Cy7 (#103116 BioLegend®, Clone 30-F11), anti-CD11c-APC (#117309BioLegend, clone N418), anti-CD11b-PE (#101207BioLegend®, Clone M1/70), anti-LyG-FITC (#127605BioLegend®, Clone 1A8) and anti-NK1.1-Brilliant Violet 605 (#108739, BioLegend®, Clone PK136). After washing in FACS buffer (saline solution with 1% fetal bovine serum), cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature before taking samples out of the BSL3 area. Cells were again washed, resuspended in FACS buffer and acquired using FACS Symphony A5 with BD FACS Diva software. Cell populations were gated and quantified by FlowJo10.7 software. Gating strategies used for analysis are presented in Figure S1.

### 2.12. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Lung and colon fragments (15–30 mg) were collected in 300 µL RIPA buffer supplemented with protease inhibitors. Samples were processed for protein extraction on ice using a tissue homogenizer and then centrifuged at 10,000 rpm/10 min/4 °C. The supernatant was collected for enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The levels of TNF-α, IL-6, IL-1β, CXCL1, CXCL2, IFN-β (lung and colon) and IL-17 (colon) were measured following the manufacturer's recommendations (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). The results were expressed in pg/mL and normalized to the total protein content, as determined by Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Concentrations of lipocalin-2 in the luminal content of the colon were determined with an ELISA kit, according to the manufacturer's instructions (R&D Systems). The concentrations of this protein were expressed in pg/mg of luminal content.

### 2.13. Quantitative Real-Time PCR Analysis

RNA was reverse-transcribed using the High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit (Thermo Fisher) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR was performed using the Sybr Green Master mix (Applied Biosystems™, Waltham, MA, USA) and the BIO-RAD CFX394 Touch Real-Time PCR Detection System. Relative gene expression was calculated using the  $\Delta\Delta C_t$  method with the 18S gene as a reference. The sequences of the primers used are given in Table 2.

**Table 2.** Sequences of primers used in qRT-PCR.

Gene <sup>1</sup>	Sequences
<i>Tnfa</i>	F: 5'-TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG C-3' R: 5'-CAC TTG GTG GTT TGC TAC GAC G-3'
<i>Il1b</i>	F: 5'-GGC AGC TAC CTG TGT CTT TCC C-3' R: 5'-ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG-3'
<i>Cxcl2</i>	F: 5'-GGGACAAAATAGCTGCAGTCGG-3' R: 5'-CTACTCTCCTCGGTGCTTAC-3'
<i>Cxcl11</i>	F: 5'-CCGAGTAACGGCTGCGACAAAAG-3' R: 5'-CCTGCATTATGAGGCGAGCTTG-3'
<i>Ifna</i>	F: 5-CCTGAGAGAGAAGAAACACAGCC-3 R:5-TCTGCTCTGACCACYTCCCAG-3
<i>Ifng</i>	F: 5-ACTGGCAAAAAGGATGGTGAC-3 R: 5-TGAGCTCATTGAATGCTTGG-3
<i>Ifnl2/3</i>	F: 5-AGC TGC AGG CCT TCA AAA AG-3 R: 5-TGG GAG TGA ATG TGG CTC AG-3
<i>Onsl1</i>	F: 5-GGATGCCTGGGAGAGAATCG-3 R: 5-TCGCCCTGCTCTTCGAAACTG-3

<sup>1</sup> (Exxtend, São Paulo, Brazil).

#### 2.14. Statistical Analysis

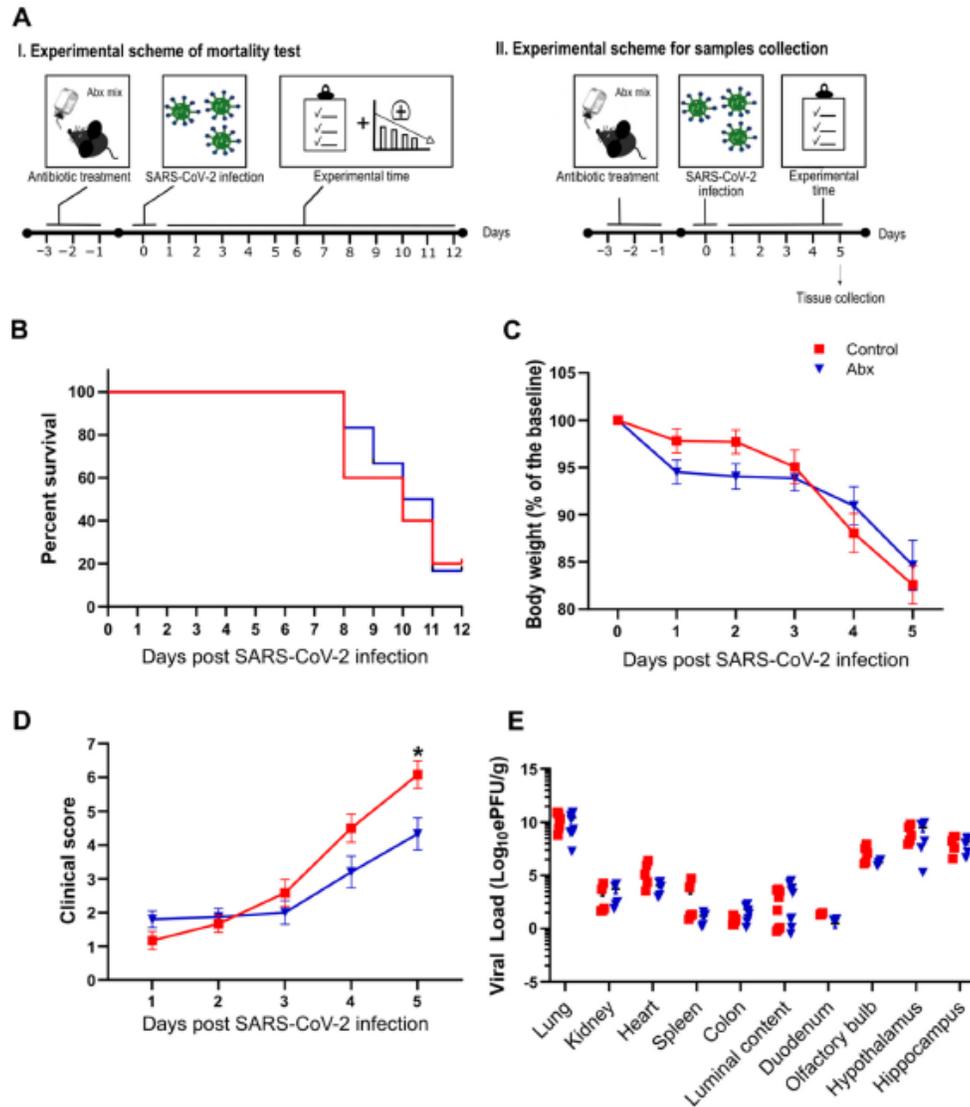
Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0 software (San Diego, CA, USA). Results are presented as mean  $\pm$  standard error mean (SEM). For comparison between 2 groups, Student's *t*-test was used. For comparison between more than 2 groups, one-way ANOVA followed by Tukey's post hoc test analysis was applied. For analysis with more than 2 variables, two-way ANOVA was applied. Differences were considered statistically significant for *p* values  $< 0.05$ .

### 3. Results

#### 3.1. Microbiota Depletion Does Not Change Mortality of SARS-CoV-2 Infection, but Alters Clinical Symptoms

To explore the role of the intestinal microbiota in SARS-CoV-2 infection, we conducted a series of experiments in mice previously treated with an oral antibiotic cocktail (Abx), a treatment known to deplete most of the bacteria present in the guts of mice [30]. Briefly, female K18-hACE2 mice received the antibiotics in drinking water for 3 days before SARS-CoV-2 intranasal inoculation (Figure 1A). The efficacy of the Abx treatment was confirmed by macroscopic analysis of the cecum and colon, which were enlarged, and by measurement of bacterial DNA load in the feces of mice on the day of infection. Fecal DNA was nearly five-fold lower in Abx-treated mice (Figure S2). Despite these effects, we did not observe diarrhea or any clinical alteration in mice under Abx treatment.

Next, we analyzed the impact of the Abx treatment on infection-associated lethality. We infected Abx and control mice with  $5 \times 10^4$  PFU/animal of SARS-CoV-2 and followed these infected mice until 12 dpi (Figure 1A). Abx treatment had no significant effect on mouse mortality compared with the control group (Figure 1B). We repeated the infections using lower titers of virus ( $1 \times 10^4$  PFU/animal) and followed the development of clinical signs until 5 dpi. Despite the fact that mice in the Abx and control groups presented a similar body weight loss during the course of infection (Figure 1C), a more intense deterioration in clinical signs was observed in controls (Figure 1D). The effect on Abx-treated mice was not associated with a significant difference in viral load in the tissues analyzed or the colon luminal content (Figure 1E). The microbiota composition of Abx-treated infected mice at 5 dpi presented significant differences in abundance and evenness (i.e., reduction in Abx-treated mice compared to the other groups) (Figure S3A,B). In weighted UniFrac-based beta diversity analysis, we found a significant difference between non-infected and infected groups, but not between Abx and control infected mice (Figure S3D). The bacterial relative abundance was different between experimental groups: compared to the non-infected group, we found a higher proportion of the *Verrucomicrobiota* phylum in the infected groups (Figure S3E), which was associated with an increase in the *Akkermansia* genus. This alteration was previously reported in SARS-CoV-2-infected mice [27]. Reductions in *Firmicutes* (mainly due to a lower proportion of *Bacilli* class) were also observed when comparing infected groups with the non-infected group. Moreover, the proportion of the *Desulfobacterota* phylum (and *Desulfovibrionia* class) was increased in the control group (compared to the non-infected group) and decreased in the Abx group (relative to the control group). Increases in the *Desulfobacterota* phylum were also verified in the fecal microbiota of SARS-CoV-2-infected hamsters [26]. Together, these results indicate that SARS-CoV-2 infection results in significant changes in the bacterial communities of the gut and that Abx treatment has only minor effects on the development of SARS-CoV-2 infection in mice.

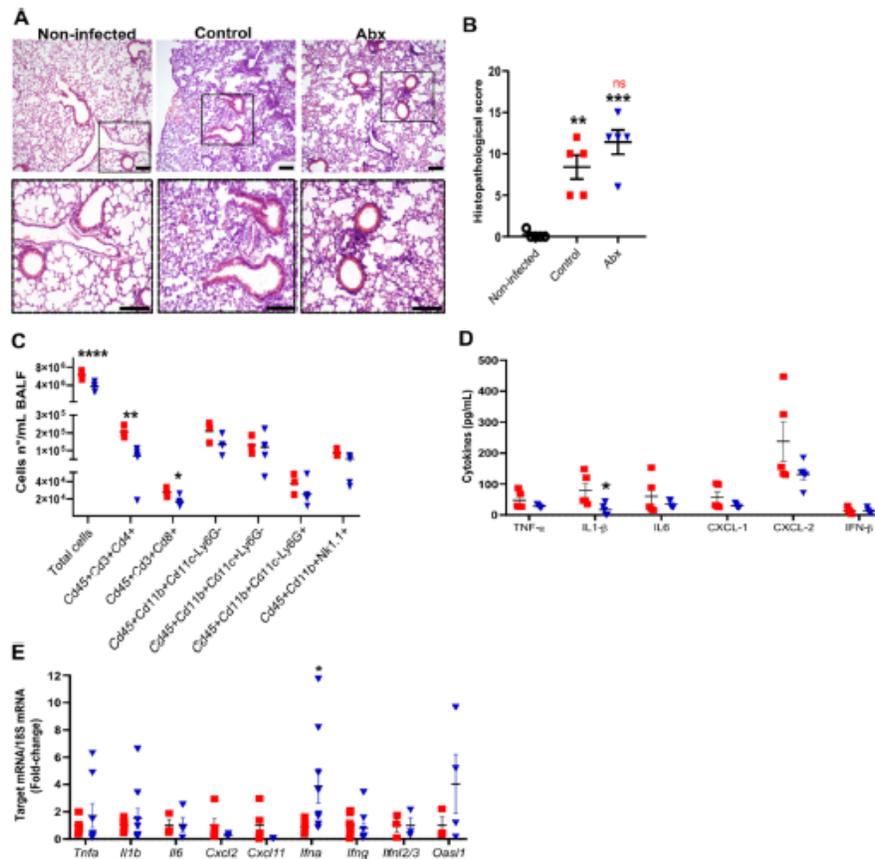


**Figure 1.** (A) Female K18-hACE2 mice were either treated (Abx) or not treated (control) for 3 days before SARS-CoV-2 infection. Body weight and clinical scores were measured after infection. I. Experimental scheme of mortality: experiments were performed to evaluate percent survival up to 12 dpi. II. Experimental scheme for sample collection: mice were euthanized at 5 dpi and the organs were collected for viral load quantification. (B) Survival rate after infection with SARS-CoV-2 ( $n = 6$ ). (C) Body weight changes after infection ( $n = 12-15$ ). (D) Clinical scores of infected mice ( $n = 12-15$ ). \*  $p < 0.05$ , 2-way ANOVA. (E) Viral load determination by RT-qPCR. \*  $p < 0.05$  by Student's  $t$ -test ( $n = 4-10$ ).

### 3.2. Antibiotic Treatment Does Not Affect Lung Histopathology but Promotes Changes in Production of Immune Molecules Following SARS-CoV-2 Infection

We next evaluated the impact of Abx on lung histopathology and inflammatory response during SARS-CoV-2 infection. At 5 dpi, we observed intense histopathological

alterations on hematoxylin and eosin-stained lung sections of infected mice, including the accumulation of immune cells in different locations, mainly in perivascular areas, and alveolar wall thickening (Figure 2A). No difference was observed in histopathological parameters between infected control and Abx mice (Figure 2B).



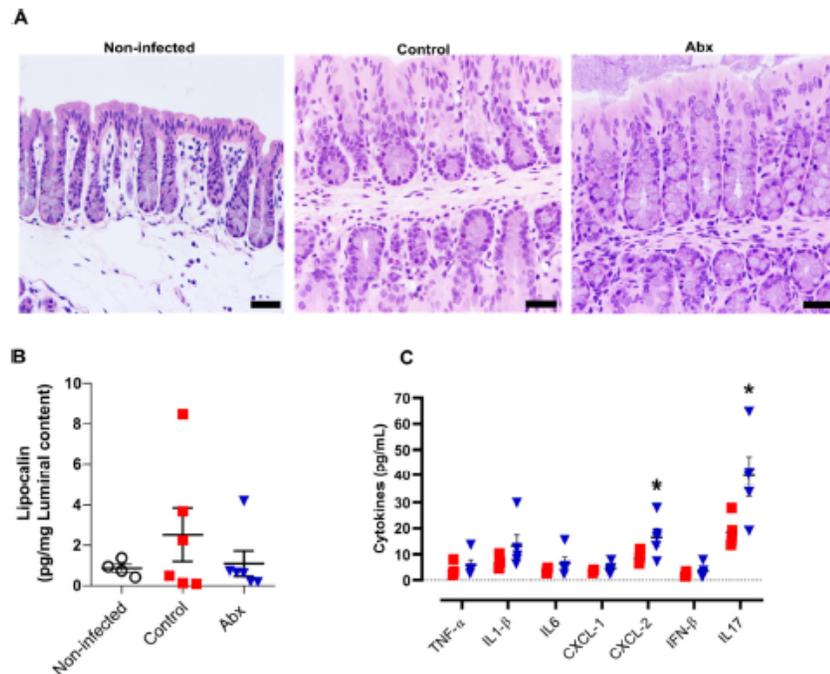
**Figure 2.** Lung histological and inflammatory alterations after infection. (A) Representative images of hematoxylin and eosin staining of lung sections from each experimental group. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Lung histopathological scores from each experimental group. \*\*  $p < 0.005$  and \*\*\*  $p < 0.001$  by 2-way ANOVA; Sidak's multiple comparisons test ( $n = 5$ ). (C) Total cell number and differential cell counts of lymphocytes (Cd45+Cd3+Cd4+ and Cd45+Cd3+Cd8+), myeloid (monocytes Cd45+Cd11b+Cd11c–Ly6G–, dendritic cells Cd45+Cd11b+Cd11c+Ly6G– and neutrophils Cd45+Cd11b+Cd11c–Ly6G+) and NK cells (Cd45+Cd11b+NK1.1+) in BALF. \*\*\*\*  $p < 0.0001$ , \*\*  $p < 0.005$  and \*  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test ( $n = 3$ –5). (D) Concentration of cytokines in lung homogenates, as measured by ELISA. \*  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test ( $n = 5$ ). (E) Expression of inflammatory and antiviral genes quantified using RT-qPCR in lung samples. \*  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test ( $n = 3$ –9).

To characterize the lung inflammatory profile, we assessed the immune cells by flow cytometry of bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and measured the mRNA and protein levels of pro-inflammatory and anti-viral cytokines in lung tissue. The gut microbiota reduction by Abx significantly reduced the total cell number in the BALF, mainly attributed to both lymphocytes CD4+ and CD8+ (Figure 2C). No significant effect of Abx was found on innate immune cells in the BALF. Among the cytokines analyzed, the only difference observed between the experimental groups was a reduction in the levels of IL-1 $\beta$  in the

lung homogenates of Abx-treated mice (Figure 2D). We also found increased expression of *Ifna* in the lungs of Abx-treated mice compared to controls (Figure 2E). No significant changes in the levels or expression of other inflammatory cytokines, chemokines or antiviral molecules were observed between the experimental groups (Figure 2D,E).

### 3.3. Antibiotic Treatment Increases Inflammatory Cytokines in Colon but This Effect Is Not Associated with Significant Alterations in Colon Histopathology

A previous study showed that human ACE2 is highly expressed along the intestinal tract (stomach to large intestine) of K18-hACE2 mice [50]. This explains the presence of viral RNA at relatively high levels in these tissues [50]. However, we observed minor histopathological changes in hematoxylin and eosin-stained colon sections of infected mice (at 5 dpi), including an increment in the number of nuclei at the crypt base, pointing to an increase in proliferation, and a reduction in mucus production. In the histological sections of Abx-treated mice, we only observed a reduction in mucus compared with non-infected mice. No infiltration of inflammatory cells or exfoliation of epithelial cells was observed in infected mice (Figure 3A).



**Figure 3.** Colon histological and inflammatory alterations after SARS-CoV-2 infection. (A) Representative images of hematoxylin and eosin staining of colon sections from each experimental group. Scale bar = 100  $\mu$ m. (B) Concentration of the inflammatory protein lipocalin-2 in luminal content samples from mice as measured by ELISA. ( $n = 4-6$ ). (C) Concentration of cytokines in colon homogenates, as measured by ELISA. \*  $p < 0.05$ , Student's  $t$ -test. ( $n = 4-5$ ).

We next examined the levels of pro-inflammatory cytokines in the colon, along with measurement of lipocalin-2 in the luminal content of colon samples. In accordance with the histopathological score, there was no significant difference in the lipocalin-2 levels at 5 dpi between the infected groups or between these and non-infected mice (Figure 3B). Nevertheless, the colons of Abx-treated mice showed an increase in CXCL-2 and IL-17 cytokines, compared with the control group (Figure 3C). The other cytokines analyzed

presented similar concentrations among infected animals, treated or not with the antibiotic cocktail prior to infection.

#### 4. Discussion

Recent studies indicate that a large proportion (more than threequarters) of COVID-19 patients are treated with antibiotics [51], [52]. This is much higher than the prevalence of bacterial co-infections [51], thus indicating the unnecessary use of this therapy, which can accentuate the gut dysbiosis induced by SARS-CoV-2 infection and increase the susceptibility to *Clostridioides difficile* infections. A number of studies have observed an exacerbated disease in antibiotic-treated mice infected with respiratory pathogens including *Pseudomonas aeruginosa* [53], influenza virus [54] and respiratory syncytial virus (RSV) [28]. Antibiotic treatment has been shown to impair antiviral responses, thus rendering mice more susceptible to infection by multiple viruses, including West Nile (WNV), Dengue and Zika virus infection [55].

We found that acute microbiota depletion by oral antibiotics had no impact on SARS-CoV-2 mortality in mice. In agreement with these findings, we did not observe changes in viral load or histopathological alterations in the lungs or colons of infected mice. The experimental model used in our study, transgenic mice expressing the human ACE2 receptor under control of cytokeratin-18 promoter (K18-hACE2), develops a severe viral disease after SARS-CoV-2 inoculation. Mice infected with  $5 \times 10^4$  CFUs began to succumb at 7–8 dpi and only 20% survived until the 12th dpi. These results are in agreement with previous data obtained by other groups using this experimental model [49,50,56]. Despite no significant impact on survival, we observed that Abx-treated mice had a less intense deterioration in clinical signs compared to control mice.

Abx-treated mice presented a reduction in IL-1 $\beta$  concentrations and an increase in *Ifna* expression in the lungs. Both cytokines are relevant for SARS-CoV-2 response and pathogenesis. IL-1 $\beta$  is one of the proinflammatory cytokines excessively produced in the acute phase of SARS-CoV-2 infection. A recent experimental study highlighted the relevance of this cytokine for lung damage and indicated that blocking it may have a protective effect [57]. In contrast with the harmful effects of IL-1 $\beta$ , intranasal administration of IFN- $\alpha$  had a beneficial effect on SARS-CoV-2-infected Syrian hamsters [58]. In addition, we found a reduction in T cells present in the BAL of Abx-treated mice. Contrary to our initial hypothesis, these results suggest that microbiota depletion may have attenuating effects towards SARS-CoV-2 infection. This may be due to a reduction in bacteria translocation after antibiotic treatment. A recent study reported that COVID-19 patients present higher levels of markers associated with gut leakage than healthy individuals, and the levels of these markers are higher in patients with a more severe form of COVID-19 compared with patients with less severe forms of this infection [59]. In addition, the dysbiotic microbiota of COVID-19 patients has been associated with the development of secondary bloodstream infections [24]. It is worth mentioning that Abx treatment reduces the gut bacterial load, thus diminishing the amount of microorganisms that interact with the epithelium and may cross this barrier. However, it may also select some microorganisms, thus contributing to the development of secondary resistant infections, as has been reported for COVID-19 patients [60].

We also found an increase in IL-17 and CXCL-1 levels in the colons of Abx-treated mice. However, no change in inflammatory cells was observed between the groups at the time point analyzed. A similar increment in pro-inflammatory cytokines (e.g., CXCL1, CXCL2 and IL-1 $\beta$ ) was previously reported in *E. histolytica*-infected mice treated with Abx, compared to mice that were infected but not treated with Abx [61]. The authors of the mentioned study demonstrated that these alterations were not associated with an increment in neutrophil migration to the intestine because the Abx treatment reduced the responsiveness of neutrophils to chemokines [61], an effect that may also be present in our model.

The dysbiosis associated with the antibiotic regimen used in this study has been well characterized in previous studies [28,62,63]. In addition to drastic changes in the gut microbiota profile, including a reduction in microbial diversity and significant changes in community structure, this treatment was also associated with a reduction in the production of several microbiota-derived metabolites relevant for the host immune responses, including short-chain fatty acids (SCFAs). Moreover, COVID-19 patients who received antibiotics showed more intense alterations in gut microbiota composition compared to those who were not exposed to antibiotics, with a decrease in multiple beneficial symbionts, including the SCFA-producers *Faecalibacterium prausnitzii*, *Lachnospiraceae bacterium 5\_1\_63FAA*, *Eubacterium rectale*, *Ruminococcus obeum* and *Dorea formicigenerans* [21]. SCFAs are an important link between microbiota and immunity. As already mentioned, COVID-19 dysbiotic microbiota produce lower amounts of these metabolites, which have been linked with positive effects in different infection models [28,53,54,62,64]. However, recent evidence indicates that the SCFAs have no impact on SARS-CoV-2 infection [17,26,65] and may also not be effective in other viral infections [66], indicating that their effect is limited to specific infectious agents. Our data on Abx-treated mice indirectly support the hypothesis that SCFAs play no relevant role in SARS-CoV-2 infection.

Several aspects remain to be investigated in the context of the gut–lung axis during SARS-CoV-2 infection. For example, is SARS-CoV-2 intestinal dysbiosis secondary to the systemic inflammation or is it a direct effect of the virus on intestinal epithelial cells, thus affecting the interaction between them (and immune cells) and the components of the microbiota? Two other important questions that need to be addressed in this context are (1) whether the dysbiotic microbiota associated with diabetic and obese individuals play a role in this process and (2) whether dietary interventions that are known to affect microbiota composition and function may have an impact on disease progression. Many dietary strategies that allow us to verify the role of the microbiota in the regulation of the immune system during respiratory diseases such as probiotic therapy [67–69], intestinal microbiota transplantation [70], the use of fermentable dietary fibers (prebiotics) [70–72] or through supplementation with compounds of bacterial metabolism (e.g., SCFAs) [28,70,71] can be evaluated in future studies on SARS-CoV-2. Our study has limitations, including the absence of analyses on the effect of Abx treatment during the course of infection, or treatment with more potent Abx regimens or antibiotics that have been commonly used in COVID-19 patients, such as azithromycin. In addition, we only focused our analysis on a limited number of time points and doses and we did not test SARS-CoV-2 variants.

## 5. Conclusions

In summary, our data demonstrate that gut microbiota depletion by acute treatment with a broad range of oral antibiotics did not alter survival and had only minor effects on the immune response to SARS-CoV-2 in K18-ACE2 mice.

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells11162572/s1>, Figure S1. Gating strategies used to define the leukocyte populations of the BAL. Figure S2. Effect of oral antibiotics on the length of large intestine and fecal bacterial load. Figure S3. Microbiota changes after infection of K18-hACE2 mice.

**Author Contributions:** Conceptualization, P.B.R., K.H.A., A.P.D.d.S. and M.A.R.V.; validation, S.R.C.; formal analysis, P.B.R., A.B.d.S.P.G. and V.A.M.; investigation, P.B.R., G.F.G., M.K.S.C.A., G.F.S., S.P.M., D.A.T.-T., B.A.C.R., A.S.P., L.P.P., V.d.R.R., A.B.d.S.P.G., V.A.M., A.S.L.M.A., F.C. and K.H.A.; resources, A.P.D.d.S., J.L.P.-M. and M.A.R.V.; data curation, P.B.R.; writing—original draft preparation, P.B.R., M.K.S.C.A., K.H.A., A.P.D.d.S. and M.A.R.V.; writing—review and editing, P.B.R., M.K.S.C.A., K.H.A., A.P.D.d.S., J.L.P.-M. and M.A.R.V.; supervision, A.P.D.d.S., L.O.L., P.M.M.M.-V., J.C.A.-F., T.M.C., J.L.P.-M. and M.A.R.V.; funding acquisition, A.P.D.d.S., L.O.L., P.M.M.M.-V., J.C.A.-F., T.M.C., J.L.P.-M. and M.A.R.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), grant numbers 2019/19/06372-3, 2020/04583-4, 2020/04746-0, 2020/04558-0, 2020/10282-7

and 2020/05211-3. This study was also funded by Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão from UNICAMP (FAPEX-UNICAMP; grant no. 2266/20) and FAPERGS COVID19 20-2551-0000258-6. J.L.P.-M. was supported by the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development, CNPq, grant no. 305628/2020-8.

**Institutional Review Board Statement:** The animal study protocol was approved by the Ethics Committee of the University of Campinas (protocol #5792-1/2021, approved in July 2021).

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The raw reads of 16S rRNA sequencing were submitted to the National Center for Biotechnology Information's Sequence Read Archive (NCBI SRA) with accession number PRJNA858922.

**Acknowledgments:** We are grateful to the Multidisciplinary Center for Biological Investigation (CEMIB), the Institute of Biology of Unicamp and the BSL 3 laboratory of Ribeirão Preto Medical School (FMRP) for providing the infrastructure and all technical support.

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

## References

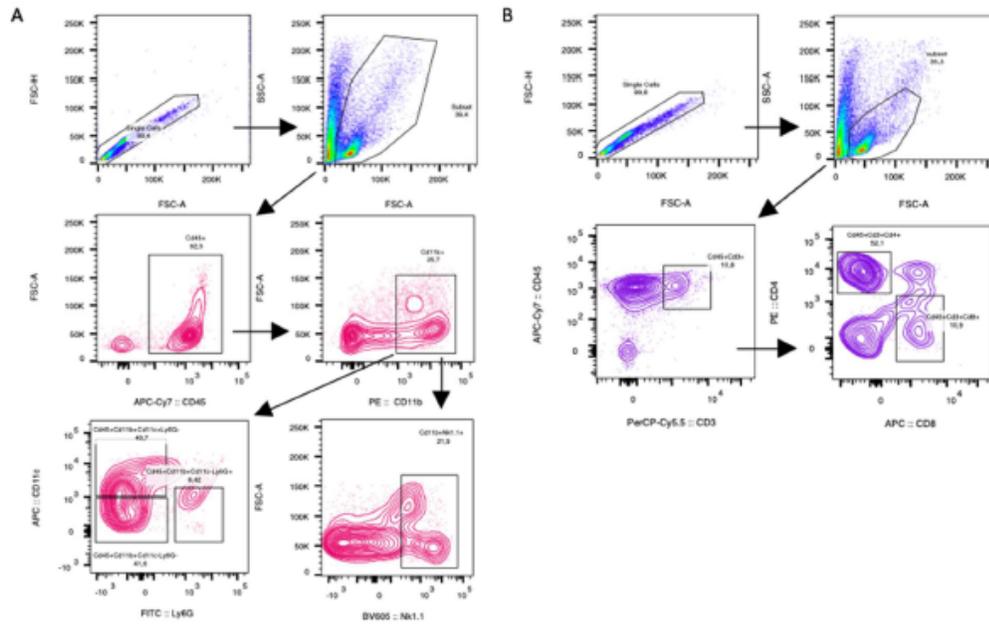
1. Cui, J.; Li, F.; Shi, Z.L. Origin and Evolution of Pathogenic Coronaviruses. *Nat. Rev. Microbiol.* **2019**, *17*, 181–192. [CrossRef] [PubMed]
2. COVID Live-Coronavirus Statistics—Worldometer. Available online: <https://www.worldometers.info/coronavirus/> (accessed on 26 May 2022).
3. Yuen, K.S.; Ye, Z.W.; Fung, S.Y.; Chan, C.P.; Jin, D.Y. SARS-CoV-2 and COVID-19: The Most Important Research Questions. *Cell Biosci.* **2020**, *10*, 40. [CrossRef] [PubMed]
4. Jordan, R.E.; Adab, P.; Cheng, K.K. COVID-19: Risk Factors for Severe Disease and Death. *BMJ* **2020**, *368*, m1198. [CrossRef] [PubMed]
5. The Lancet Respiratory Medicine. Realising the Potential of SARS-CoV-2 Vaccines—a Long Shot? *Lancet Respir. Med.* **2021**, *9*, 117. [CrossRef]
6. Pormohammad, A.; Zarei, M.; Ghorbani, S.; Mohammadi, M.; Razizadeh, M.H.; Turner, D.L.; Turner, R.J. Efficacy and Safety of COVID-19 Vaccines: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Clinical Trials. *Vaccines* **2021**, *9*, 467. [CrossRef]
7. Tay, M.Z.; Poh, C.M.; Renia, L.; MacAry, P.A.; Ng, L.F.P. The Trinity of COVID-19: Immunity, Inflammation and Intervention. *Nat. Rev. Immunol.* **2020**, *20*, 363–374. [CrossRef]
8. Sultan, S.; Altayar, O.; Siddique, S.M.; Davitkov, P.; Feuerstein, J.D.; Lim, J.K.; Falck-Ytter, Y.; El-Serag, H.B. AGA Institute Rapid Review of the Gastrointestinal and Liver Manifestations of COVID-19, Meta-Analysis of International Data, and Recommendations for the Consultative Management of Patients with COVID-19. *Gastroenterology* **2020**, *159*, 320–334.e27. [CrossRef]
9. Lin, L.; Jiang, X.; Zhang, Z.; Huang, S.; Zhang, Z.; Fang, Z.; Gu, Z.; Gao, L.; Shi, H.; Mai, L.; et al. Gastrointestinal Symptoms of 95 Cases with SARS-CoV-2 Infection. *Gut* **2020**, *69*, 997–1001. [CrossRef]
10. Xiao, F.; Tang, M.; Zheng, X.; Liu, Y.; Li, X.; Shan, H. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. *Gastroenterology* **2020**, *158*, 1831–1833.e3. [CrossRef]
11. Lee, S.; Yoon, G.Y.; Myoung, J.; Kim, S.J.; Ahn, D.G. Robust and Persistent SARS-CoV-2 Infection in the Human Intestinal Brush Border Expressing Cells. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 2169–2179. [CrossRef]
12. Lamers, M.M.; Beumer, J.; Van Der Vaart, J.; Knoops, K.; Puschhof, J.; Breugem, T.L.; Ravelli, R.B.G.; Van Schayck, J.P.; Mykytyn, A.Z.; Duimel, H.Q.; et al. SARS-CoV-2 Productively Infects Human Gut Enterocytes. *Science* **2020**, *369*, 50–54. [CrossRef] [PubMed]
13. Lehmann, M.; Allers, K.; Heldt, C.; Meinhardt, J.; Schmidt, F.; Rodriguez-Sillke, Y.; Kunkel, D.; Schumann, M.; Böttcher, C.; Stahl-Hennig, C.; et al. Human Small Intestinal Infection by SARS-CoV-2 Is Characterized by a Mucosal Infiltration with Activated CD8+ T Cells. *Mucosal Immunol.* **2021**, *14*, 1381–1392. [CrossRef]
14. Yantiss, R.K.; Qin, L.; He, B.; Crawford, C.V.; Seshan, S.; Patel, S.; Wahid, N.; Jessurun, J. Intestinal Abnormalities in Patients With SARS-CoV-2 Infection: Histopathologic Changes Reflect Mechanisms of Disease. *Am. J. Surg. Pathol.* **2022**, *46*, 89–96. [CrossRef] [PubMed]
15. Schirmer, M.; Smeeckens, S.P.; Vlamakis, H.; Jaeger, M.; Oosting, M.; Franzosa, E.A.; Jansen, T.; Jacobs, L.; Bonder, M.J.; Kuzilshikov, A.; et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. *Cell* **2016**, *167*, 1125–1136.e8. [CrossRef] [PubMed]
16. Dang, A.T.; Marsland, B.J. Microbes, Metabolites, and the Gut-Lung Axis. *Mucosal Immunol.* **2019**, *12*, 843–850. [CrossRef]
17. Antunes, K.H.; Stein, R.T.; Franceschina, C.; da Silva, E.F.; de Freitas, D.N.; Silveira, J.; Mocellin, M.; Leitão, L.; Fachi, J.L.; Pral, L.P.; et al. Short-Chain Fatty Acid Acetate Triggers Antiviral Response Mediated by RIG-I in Cells from Infants with Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. *EBioMedicine* **2022**, *77*, 103891. [CrossRef]

18. Song, L.; Huang, Y.; Liu, G.; Li, X.; Xiao, Y.; Liu, C.; Zhang, Y.; Li, J.; Xu, J.; Lu, S.; et al. A Novel Immunobiotics *Bacteroides Dorei* Ameliorates Influenza Virus Infection in Mice. *Front. Immunol.* **2022**, *12*, 828887. [CrossRef]
19. Machado, M.G.; Patente, T.A.; Rouillé, Y.; Heumel, S.; Melo, E.M.; Deryuter, L.; Pourcet, B.; Sencio, V.; Teixeira, M.M.; Trottein, F. Acetate Improves the Killing of *Streptococcus Pneumoniae* by Alveolar Macrophages via NLRP3 Inflammasome and Glycolysis-HIF-1 $\alpha$  Axis. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 773261. [CrossRef]
20. Sencio, V.; Machado, M.G.; Trottein, F. The Lung-Gut Axis during Viral Respiratory Infections: The Impact of Gut Dysbiosis on Secondary Disease Outcomes. *Mucosal Immunol.* **2021**, *14*, 296–304. [CrossRef]
21. Zuo, T.; Zhang, E.; Lui, G.C.Y.; Yeoh, Y.K.; Li, A.Y.L.; Zhan, H.; Wan, Y.; Chung, A.C.K.; Cheung, C.P.; Chen, N.; et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients with COVID-19 during Time of Hospitalization. *Gastroenterology* **2020**, *159*, 944–955.e8. [CrossRef]
22. Yeoh, Y.K.; Zuo, T.; Lui, G.C.Y.; Zhang, E.; Liu, Q.; Li, A.Y.L.; Chung, A.C.K.; Cheung, C.P.; Tso, E.Y.K.; Fung, K.S.C.; et al. Gut Microbiota Composition Reflects Disease Severity and Dysfunctional Immune Responses in Patients with COVID-19. *Gut* **2021**, *70*, 698–706. [CrossRef] [PubMed]
23. Reinold, J.; Farahpour, F.; Fehring, C.; Dolff, S.; Konik, M.; Korth, J.; van Baal, L.; Hoffmann, D.; Buer, J.; Witzke, O.; et al. A Pro-Inflammatory Gut Microbiome Characterizes SARS-CoV-2 Infected Patients and a Reduction in the Connectivity of an Anti-Inflammatory Bacterial Network Associates with Severe COVID-19. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 747816. [CrossRef] [PubMed]
24. Venzon, M.; Bernard-Raichon, L.; Klein, J.; Axelrad, J.E.; Zhang, C.; Hussey, G.A.; Sullivan, A.P.; Casanovas-Massana, A.; Noval, M.G.; Valero-Jimenez, A.M.; et al. Gut Microbiome Dysbiosis during COVID-19 Is Associated with Increased Risk for Bacteremia and Microbial Translocation. *bioRxiv* **2022**. preprint. [CrossRef]
25. Sokol, H.; Contreras, V.; Maisonnasse, P.; Desmons, A.; Delache, B.; Sencio, V.; Machelart, A.; Brisebarre, A.; Humbert, L.; Deryuter, L.; et al. SARS-CoV-2 Infection in Nonhuman Primates Alters the Composition and Functional Activity of the Gut Microbiota. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1893113. [CrossRef]
26. Sencio, V.; Machelart, A.; Robil, C.; Benech, N.; Hoffmann, E.; Galbert, C.; Deryuter, L.; Heumel, S.; Hantute-Ghesquier, A.; Flourens, A.; et al. Alteration of the Gut Microbiota Following SARS-CoV-2 Infection Correlates with Disease Severity in Hamsters. *Gut Microbes* **2022**, *14*, 2018900. [CrossRef]
27. Seibert, B.; Cáceres, C.J.; Cardenas-García, S.; Carnaccini, S.; Geiger, G.; Rajao, D.S.; Ottesen, E.; Perez, D.R. Mild and Severe SARS-CoV-2 Infection Induces Respiratory and Intestinal Microbiome Changes in the K18-HACE2 Transgenic Mouse Model. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e00536-21. [CrossRef]
28. Antunes, K.H.; Fachi, J.L.; de Paula, R.; da Silva, E.F.; Pral, L.P.; dos Santos, A.Á.; Dias, G.B.M.; Vargas, J.E.; Puga, R.; Mayer, F.Q.; et al. Microbiota-Derived Acetate Protects against Respiratory Syncytial Virus Infection through a GPR43-Type 1 Interferon Response. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 3273. [CrossRef]
29. Rocco, P.R.M.; Silva, P.L.; Cruz, F.F.; Melo, M.A.C.; Tierno, P.F.G.M.M.; Moura, M.A.; de Oliveira, L.F.G.; Lima, C.C.; Dos Santos, E.A.; Junior, W.F.; et al. Early Use of Nitazoxanide in Mild COVID-19 Disease: Randomised, Placebo-Controlled Trial. *Eur. Respir. J.* **2021**, *58*, 2003725. [CrossRef]
30. Moreau, G.B.; Burgess, S.L.; Sturek, J.M.; Donlan, A.N.; Petri, W.A.; Mann, B.J. Evaluation of K18-HACE2 Mice as a Model of SARS-CoV-2 Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2020**, *103*, 1215–1219. [CrossRef]
31. Kumari, P.; Rothan, H.A.; Natekar, J.P.; Stone, S.; Pathak, H.; Strate, P.G.; Arora, K.; Brinton, M.A.; Kumar, M. Neuroinvasion and Encephalitis Following Intranasal Inoculation of SARS-CoV-2 in K18-HACE2 Mice. *Viruses* **2021**, *13*, 132. [CrossRef]
32. Andrews, S.; Krueger, F.; Segonds-Pichon, A.; Biggins, L.; Krueger, C.; Wingett, S. Babraham Bioinformatics-FastQC. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data. Available online: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> (accessed on 14 July 2022).
33. Ewels, P.; Magnusson, M.; Lundin, S.; Källner, M. MultiQC: Summarize Analysis Results for Multiple Tools and Samples in a Single Report. *Bioinformatics* **2016**, *32*, 3047–3048. [CrossRef] [PubMed]
34. Bolyen, E.; Rideout, J.R.; Dillon, M.R.; Bokulich, N.A.; Abnet, C.C.; Al-Ghalith, G.A.; Alexander, H.; Alm, E.J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; et al. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat. Biotechnol.* **2019**, *37*, 852–857. [CrossRef] [PubMed]
35. Callahan, B.J.; McMurdie, P.J.; Rosen, M.J.; Han, A.W.; Johnson, A.J.A.; Holmes, S.P. DADA2: High-Resolution Sample Inference from Illumina Amplicon Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 581–583. [CrossRef] [PubMed]
36. Weiss, S.; Xu, Z.Z.; Peddada, S.; Amir, A.; Bittinger, K.; Gonzalez, A.; Lozupone, C.; Zaneveld, J.R.; Vázquez-Baeza, Y.; Birmingham, A.; et al. Normalization and Microbial Differential Abundance Strategies Depend upon Data Characteristics. *Microbiome* **2017**, *5*, 27. [CrossRef]
37. Janssen, S.; McDonald, D.; Gonzalez, A.; Navas-Molina, J.A.; Jiang, L.; Xu, Z.Z.; Winker, K.; Kado, D.M.; Orwoll, E.; Manary, M.; et al. Phylogenetic Placement of Exact Amplicon Sequences Improves Associations with Clinical Information. *mSystems* **2018**, *3*, e00021-18. [CrossRef]
38. Halko, N.; Martinsson, P.G.; Shkolnisky, Y.; Tytgert, M. An Algorithm for the Principal Component Analysis of Large Data Sets. *SIAM J. Sci. Comput.* **2010**, *33*, 2580–2594. [CrossRef]
39. Lozupone, C.; Knight, R. UniFrac: A New Phylogenetic Method for Comparing Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **2005**, *71*, 8228–8235. [CrossRef]
40. Pielou, E.C. The Measurement of Diversity in Different Types of Biological Collections. *J. Theor. Biol.* **1966**, *13*, 131–144. [CrossRef]

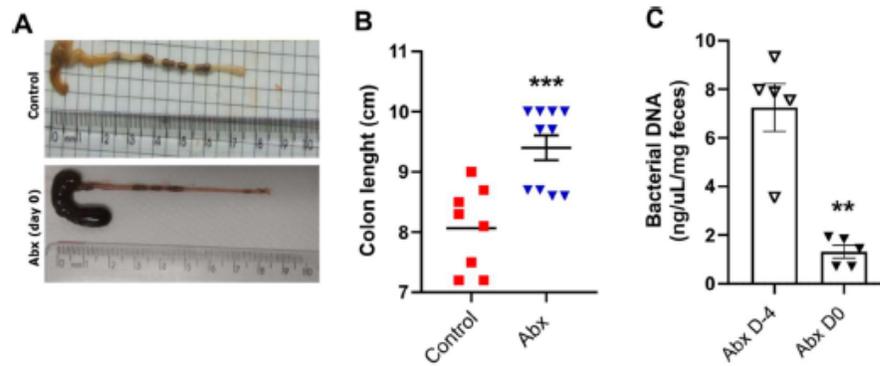
41. Shannon, C.E. A Mathematical Theory of Communication. *Bell Syst. Tech. J.* **1948**, *27*, 623–656. [[CrossRef](#)]
42. Bokulich, N.A.; Kaehler, B.D.; Rideout, J.R.; Dillon, M.; Bolyen, E.; Knight, R.; Huttley, G.A.; Gregory Caporaso, J. Optimizing Taxonomic Classification of Marker-Gene Amplicon Sequences with QIIME 2's Q2-Feature-Classifer Plugin. *Microbiome* **2018**, *6*, 90. [[CrossRef](#)]
43. Glöckner, F.O.; Yilmaz, P.; Quast, C.; Gerken, J.; Beccati, A.; Ciuprina, A.; Bruns, G.; Yarza, P.; Peplies, J.; Westram, R.; et al. 25 Years of Serving the Community with Ribosomal RNA Gene Reference Databases and Tools. *J. Biotechnol.* **2017**, *261*, 169–176. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Robeson, M.S.; O'Rourke, D.R.; Kaehler, B.D.; Ziemski, M.; Dillon, M.R.; Foster, J.T.; Bokulich, N.A. RESCRIPt: Reproducible Sequence Taxonomy Reference Database Management. *PLoS Comput. Biol.* **2021**, *17*, e1009581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Yilmaz, P.; Parfrey, L.W.; Yarza, P.; Gerken, J.; Pruesse, E.; Quast, C.; Schweer, T.; Peplies, J.; Ludwig, W.; Glöckner, F.O. The SILVA and "All-Species Living Tree Project (LTP)" Taxonomic Frameworks. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, D643–D648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Mandal, S.; Van Treuren, W.; White, R.A.; Eggesbø, M.; Knight, R.; Peddada, S.D. Analysis of Composition of Microbiomes: A Novel Method for Studying Microbial Composition. *Microb. Ecol. Health Dis.* **2015**, *26*, 27663. [[CrossRef](#)]
47. Waskom, M.L. Seaborn: Statistical Data Visualization. *J. Open Source Softw.* **2021**, *6*, 3021. [[CrossRef](#)]
48. Corman, V.M.; Landt, O.; Kaiser, M.; Molenkamp, R.; Meijer, A.; Chu, D.K.W.; Bleicker, T.; Brünink, S.; Schneider, J.; Schmidt, M.L.; et al. Detection of 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV) by Real-Time RT-PCR. *Euro Surveill.* **2020**, *25*, 2000045. [[CrossRef](#)]
49. Yinda, C.K.; Port, J.R.; Bushmaker, T.; Owusu, I.O.; Purushotham, J.N.; Avanzato, V.A.; Fischer, R.J.; Schulz, J.E.; Holbrook, M.G.; Hebnar, M.J.; et al. K18-HACE2 Mice Develop Respiratory Disease Resembling Severe COVID-19. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009195. [[CrossRef](#)]
50. Dong, W.; Mead, H.; Tian, L.; Park, J.-G.; Garcia, J.L.; Jaramillo, S.; Barr, T.; Kollath, D.S.; Coyne, V.K.; Stone, N.E.; et al. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-Severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. *J. Virol.* **2022**, *96*, e00964-21. [[CrossRef](#)]
51. Langford, B.J.; So, M.; Raybardhan, S.; Leung, V.; Soucy, J.R.; Westwood, D.; Daneman, N.; Macfadden, D.R. Antibiotic Prescribing in Patients with COVID-19: Rapid Review and Meta-Analysis. *Clin. Microbiol. Infect.* **2021**, *27*, 520–531. [[CrossRef](#)]
52. Bendala Estrada, A.D.; Calderón Parra, J.; Fernández Carracedo, E.; Muiño Míguez, A.; Ramos Martínez, A.; Muñoz Rubio, E.; Rubio-Rivas, M.; Agudo, P.; Arnalich Fernández, F.; Estrada Perez, V.; et al. Inadequate Use of Antibiotics in the Covid-19 Era: Effectiveness of Antibiotic Therapy. *BMC Infect. Dis.* **2021**, *21*, 1144. [[CrossRef](#)]
53. Dessein, R.; Bauduin, M.; Grandjean, T.; Le Guern, R.; Figeac, M.; Beury, D.; Faure, K.; Favœu, C.; Guery, B.; Gosset, P.; et al. Antibiotic-Related Gut Dysbiosis Induces Lung Immunodepression and Worsens Lung Infection in Mice. *Crit. Care* **2020**, *24*, 611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Ichinohe, T.; Pang, I.K.; Kumamoto, Y.; Peaper, D.R.; Ho, J.H.; Murray, T.S.; Iwasaki, A. Microbiota Regulates Immune Defense against Respiratory Tract Influenza A Virus Infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 5354–5359. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Thackray, L.B.; Handley, S.A.; Gorman, M.J.; Poddar, S.; Bagadia, P.; Briseño, C.G.; Theisen, D.J.; Tan, Q.; Hykes, B.L.; Lin, H.; et al. Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. *Cell Rep.* **2018**, *22*, 3440–3453.e6. [[CrossRef](#)]
56. Fumagalli, V.; Ravà, M.; Marotta, D.; Di Lucia, P.; Laura, C.; Sala, E.; Grillo, M.; Bono, E.; Giustini, L.; Perucchini, C.; et al. Administration of Aerosolized SARS-CoV-2 to K18-HACE2 Mice Uncouples Respiratory Infection from Fatal Neuroinvasion. *Sci. Immunol.* **2022**, *7*, eabl9929. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Xiong, S.; Zhang, L.; Richner, J.M.; Class, J.; Rehman, J.; Malik, A.B. Interleukin-1ra Mitigates Sars-Cov-2-Induced Inflammatory Lung Vascular Leakage and Mortality in Humanized K18-Hace-2 Mice. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2021**, *41*, 2773–2785. [[CrossRef](#)]
58. Bessière, P.; Wasniewski, M.; Picard-Meyer, E.; Servat, A.; Figueroa, T.; Foret-Lucas, C.; Coggon, A.; Lesellier, S.; Boué, F.; Cebron, N.; et al. Intranasal Type I Interferon Treatment Is Beneficial Only When Administered before Clinical Signs Onset in the SARS-CoV-2 Hamster Model. *PLoS Pathog.* **2021**, *17*, e1009427. [[CrossRef](#)]
59. Oliva, A.; Miele, M.C.; Di Timoteo, F.; De Angelis, M.; Mauro, V.; Aronica, R.; Al Ismail, D.; Ceccarelli, G.; Pinacchio, C.; d'Ettore, G.; et al. Persistent Systemic Microbial Translocation and Intestinal Damage During Coronavirus Disease-19. *Front. Immunol.* **2021**, *12*, 708149. [[CrossRef](#)]
60. Nori, P.; Cowman, K.; Chen, V.; Bartash, R.; Szymczak, W.; Madaline, T.; Punjabi Katiyar, C.; Jain, R.; Aldrich, M.; Weston, G.; et al. Bacterial and Fungal Coinfections in COVID-19 Patients Hospitalized during the New York City Pandemic Surge. *Infect. Control. Hosp. Epidemiol.* **2021**, *42*, 84–88. [[CrossRef](#)]
61. Watanabe, K.; Gilchrist, C.A.; Uddin, M.J.; Burgess, S.L.; Abhyankar, M.M.; Moonah, S.N.; Noor, Z.; Donowitz, J.R.; Schneider, B.N.; Arju, T.; et al. Microbiome-Mediated Neutrophil Recruitment via CXCR2 and Protection from Amebic Colitis. *PLoS Pathog.* **2017**, *13*, e1006513. [[CrossRef](#)]
62. Fachi, J.L.; de Felipe, J.S.; Pral, L.P.; da Silva, B.K.; Corrêa, R.O.; de Andrade, M.C.P.; da Fonseca, D.M.; Basso, P.J.; Câmara, N.O.S.; de Sales e Souza, É.L.; et al. Butyrate Protects Mice from Clostridium Difficile-Induced Colitis through an HIF-1-Dependent Mechanism. *Cell Rep.* **2019**, *27*, 750–761.e7. [[CrossRef](#)]

63. Reeves, A.E.; Theriot, C.M.; Bergin, I.L.; Huffnagle, G.B.; Schloss, P.D.; Young, V.B. The Interplay between Microbiome Dynamics and Pathogen Dynamics in a Murine Model of Clostridium Difficile Infection. *Gut Microbes* **2011**, *2*, 145–158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Desai, M.S.; Seekatz, A.M.; Koropatkin, N.M.; Kamada, N.; Hickey, C.A.; Wolter, M.; Pudlo, N.A.; Kitamoto, S.; Terrapon, N.; Muller, A.; et al. A Dietary Fiber-Deprived Gut Microbiota Degrades the Colonic Mucus Barrier and Enhances Pathogen Susceptibility. *Cell* **2016**, *167*, 1339–1353.e21. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Pascoal, L.B.; Rodrigues, P.B.; Genaro, L.M.; dos Santos Pereira Gomes, A.B.; Toledo-Teixeira, D.A.; Parise, P.L.; Bispo-Dos-Santos, K.; Simeoni, C.L.; Guimarães, P.V.; Buscaratti, L.L.; et al. Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Do Not Interfere with SARS-CoV-2 Infection of Human Colonic Samples. *Gut Microbes* **2021**, *13*, 1–9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Ni, D.; Tan, J.; Niewold, P.; Spiteri, A.G.; Pinget, G.V.; Stanley, D.; King, N.J.C.; Macia, L. Impact of Dietary Fiber on West Nile Virus Infection. *Front. Immunol.* **2022**, *13*, 784486. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Sagar, S.; Morgan, M.E.; Chen, S.; Vos, A.P.; Garssen, J.; van Bergenhenegouwen, J.; Boon, L.; Georgiou, N.A.; Kraneveld, A.D.; Folkerts, G. Bifidobacterium Breve and Lactobacillus Rhamnosus Treatment Is as Effective as Budesonide at Reducing Inflammation in a Murine Model for Chronic Asthma. *Respir. Res.* **2014**, *15*, 46. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Garcia-Castillo, V.; Tomokiyo, M.; Raya Tonetti, F.; Islam, M.A.; Takahashi, H.; Kitazawa, H.; Villena, J. Alveolar Macrophages Are Key Players in the Modulation of the Respiratory Antiviral Immunity Induced by Orally Administered Lactobacillus Rhamnosus CRL1505. *Front. Immunol.* **2020**, *11*, 568636. [[CrossRef](#)]
69. Hu, X.; Zhao, Y.; Yang, Y.; Gong, W.; Sun, X.; Yang, L.; Zhang, Q.; Jin, M. Akkermansia Muciniphila Improves Host Defense Against Influenza Virus Infection. *Front. Microbiol.* **2021**, *11*, 586476. [[CrossRef](#)]
70. Jang, Y.O.; Lee, S.H.; Choi, J.J.; Kim, D.H.; Choi, J.M.; Kang, M.J.; Oh, Y.M.; Park, Y.J.; Shin, Y.; Lee, S.W. Fecal Microbial Transplantation and a High Fiber Diet Attenuates Emphysema Development by Suppressing Inflammation and Apoptosis. *Exp. Mol. Med.* **2020**, *52*, 1128–1139. [[CrossRef](#)]
71. Trompette, A.; Gollwitzer, E.S.; Pattaroni, C.; Lopez-Mejia, I.C.; Riva, E.; Pernot, J.; Ubags, N.; Fajas, L.; Nicod, L.P.; Marsland, B.J. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c-Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8+ T Cell Metabolism. *Immunity* **2018**, *48*, 992–1005.e8. [[CrossRef](#)]
72. Jang, Y.O.; Kim, O.H.; Kim, S.J.; Lee, S.H.; Yun, S.; Lim, S.E.; Yoo, H.J.; Shin, Y.; Lee, S.W. High-Fiber Diets Attenuate Emphysema Development via Modulation of Gut Microbiota and Metabolism. *Sci. Rep.* **2021**, *11*, 7008. [[CrossRef](#)]

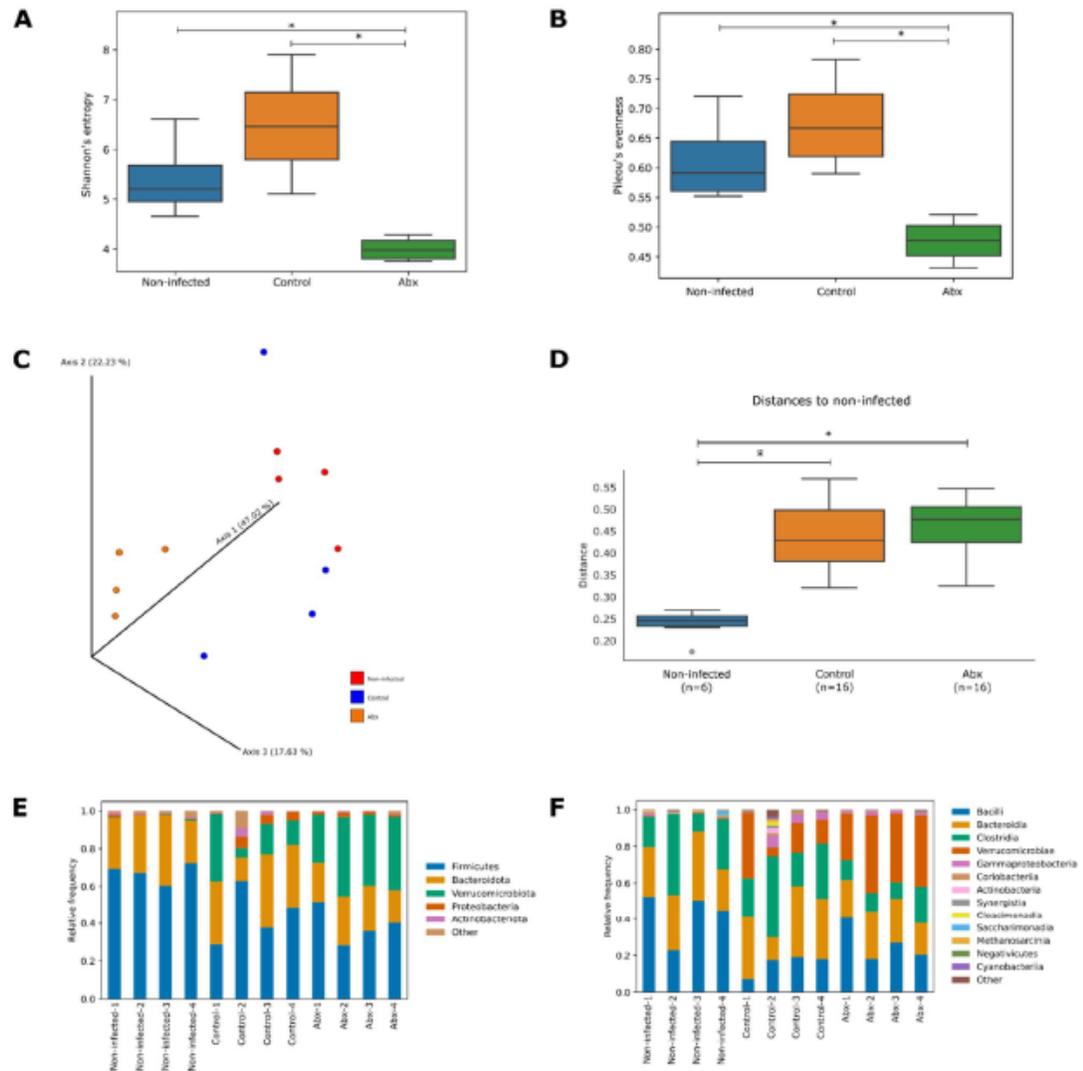
## Supplementary Materials



**Supplementary Figure S1. Gating strategies used to define the leukocyte populations of the BAL. (A)** Gating strategy used for analysis of myeloid and NK cells. **(B)** Gating strategy used for the analysis of lymphocytes.



**Supplementary Figure S2. Effect of oral antibiotics on the length of large intestine and fecal bacterial load.** (A) Representative images of cecum and colon. Female K18-hACE2 mice were treated for 3 days with antibiotic cocktail before infection (Abx day 0). (B) Colon length of mice treated or not with antibiotics. \*\*\* $p < 0.001$  by Student's *t*-test ( $n = 8-11$ ). (C) Bacterial DNA from feces samples of mice before (Abx D-4) and after 3 days of antibiotic treatment (Abx D0). \*\* $p < 0.005$  by Student's *t*-test ( $n = 5$ ).



**Supplementary Figure S3. Microbiota changes after infection of K18-hACE2 mice.** Female K18-hACE2 mice were either treated (Abx) or not treated (Control) for 3 days before SARS-CoV-2 infection. Mice were euthanized at 5 dpi and the luminal contents were collected for microbiota analysis. A non-infected group was also included in this analysis. Comparisons of alpha diversity between experimental groups. (A) Shannon's entropy index, (B) Pielou's evenness index. \* $p < 0.05$  by Kruskal-Wallis test ( $n = 4$  samples/group). (C) PCoA plot using weighted UniFrac dissimilarity based on ASVs of the different experimental groups. Comparisons of beta diversity between experimental groups. (D) Distance from the non-infected group using pairwise PERMANOVA test and weighted UniFrac distance matrix. \* $p < 0.05$  ( $n = 4$  samples/group). (E-F) Comparison of gut bacterial composition among experimental groups. (E) Bacterial abundance at the phylum level and (F) class distribution.

## CAPÍTULO 5 – RESULTADOS ADICIONAIS

### **Comparação dos efeitos da infecção pela variante gama e pelo SARS-CoV-2 original na clínica e composição da microbiota intestinal de camundongos K18-hACE2**

A infecção pela variante gama (P.1) apresenta maior gravidade comparada à infecção causada pelo vírus ancestral (BANHO et al., 2022). Entretanto, sua influência nos distúrbios gastrointestinais, como a disbiose da microbiota intestinal permanece desconhecida. O objetivo desta parte do trabalho foi comparar o tropismo em diferentes órgãos, patologia pulmonar e intestinal, os efeitos na composição da microbiota intestinal da infecção pela variante gama *versus* a infecção por SARS-CoV-2 ancestral (B.1). Para tanto, camundongos K18-hACE2 foram infectados com as duas linhagens e analisados quanto ao desenvolvimento de alterações clínicas. No quinto dia pós infecção, os animais foram eutanasiados e foram coletados pulmão e cólon para análises histopatológicas e de perfil de genes inflamatórios, enquanto amostras de conteúdo luminal foram processadas para análise da composição da microbiota intestinal por sequenciamento de RNA ribossomal 16S. A infecção com a variante P.1 em animais transgênicos K18-hACE2 apresentou maior letalidade do que a com B.1. Apesar de não haver diferença na carga viral no pulmão, intestino, rins e coração, verificou-se maiores quantidades de vírus no sistema nervoso central de animais infectados pela variante gama, o que pode ter relação com alta mortalidade. Houve redução na expressão do gene que codifica ocludina e aumento da proteína claudina-1 no cólon dos animais infectados pela variante, além de alterações na composição da microbiota intestinal em comparação à composição da microbiota de animais não infectados ou infectados com o vírus original. Mais estudos são necessários para investigar o papel da microbiota e seu perfil de composição durante a COVID-19 com relação ao tropismo pelo sistema nervoso central.

## 5.1. Introdução

O surgimento de variantes do SARS-CoV-2 pode ter um impacto enorme nos sistemas de saúde pública. A segunda onda de casos de Covid-19 em Manaus, a qual foi causada pela variante Gama (P.1), resultou em prejuízo econômico, social e uma crise de saúde sem precedentes, ilustrando esse risco das variantes. No período da segunda onda houve um aumento dramático do número de casos em jovens de 20 a 59 anos, os quais, diferente do que foi observado na primeira onda que afetou principalmente os idosos (de SOUZA F., et al., 2021). De dezembro de 2020 a maio de 2021, os casos de Covid-19 na região amazônica foram causados predominantemente pela variante P.1, de modo que a permanência da transmissão pode ter favorecido o surgimento de novas mutações que podem representar ainda mais preocupação devido a capacidade de evadir o sistema imunológico (NAVECA, et al., 2021). Recentemente, em um estudo que utilizou análises de bioinformática e associou os dados de pacientes e aos de sequenciamento de vírus foi observado que pacientes infectados com a variante P.1 tinham 70% de chance de evoluir para óbito (HAHN, et al., 2021). O objetivo do presente trabalho foi caracterizar as diferenças entre a infecção causada pela variante gama (P.1) e o vírus original. Para tanto, analisamos o tropismo viral, sobrevivência e perfil inflamatório no pulmão e intestino, além de investigar o papel da microbiota intestinal na infecção em modelo murino de infecção.

## 5.2. Objetivos

Comparar as alterações intestinais causadas pela variante gama (P.1) *versus* o vírus original em camundongos transgênicos que expressam a enzima conversora de angiotensina humana (K18-hACE2) em células epiteliais.

### Objetivos específicos

- I. Analisar a gravidade da doença por avaliação do peso, escore clínico e sobrevivência após infecção;
- II. Verificar o tropismo viral em diferentes órgãos;
- III. Mensurar o tamanho, morfologia e parâmetros inflamatórios em órgãos alvo da infecção;
- IV. Analisar as alterações na composição da microbiota intestinal após 5 dias de infecção pela variante gama.

### 5.3. Materiais e métodos

#### Vírus

O SARS-CoV-2 B.1 (HIAE-02-SARS CoV-2/SP02/human/2020/BRA; Genbank [MT126808.1](#)) foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Edison Luiz Durigon (ICB-USP). A cepa P.1 (GISAID Accession ID: EPI\_ISL\_2499748) foi isolada a partir de amostra de swab nasofaríngeal disponibilizada pela Professora Dra. Ester Sabino (IMT-USP) seguindo protocolo descrito por Amorim (AMORIM et al., 2021). O sequenciamento de genoma do vírus foi realizado para confirmação da mutação através do MinION sequencing (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). Os estoques virais de ambas as linhagens foram produzidos e gentilmente disponibilizados pelo Professor Dr. José Luiz Módena, do Laboratório de Vírus Emergentes/LEVE, do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O estoque viral foi obtido por cultivo em células VERO CCL81 em confluência (MOI (*Multiplicity of Infection*) = 0,01). O sobrenadante foi coletado após 36 a 40 horas da inoculação com vírus ou após observação de 50% de efeito citopático (CPE), centrifugado e armazenado à -80°C. A titulação foi realizada por RT-qPCR e ensaio de placa (ROCCO et al., 2020).

#### Animais

Os procedimentos com animais foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, sob parecer número 5792-1/2021. Foram utilizados camundongos da linhagem 2B6.Cg-Tg(K18-ACE2) 2PrImn/J, ou seja, que expressam a forma humanizada de enzima conversora de angiotensina 2 (hACE2). Estes foram adquiridos da *Jackson Laboratory* (JAX stock #034860) e fornecidos pelo Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica (CEMIB – UNICAMP). Todos os animais foram mantidos inicialmente no Biotério de Animais SPF do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram dispostos em gaiolas com filtro na tampa em número inferior a 5 por gaiola e possuíam livre acesso à água e ração esterilizada. Posteriormente, os animais foram transferidos para o biotério com nível de biossegurança 3 do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, onde foram realizadas as infecções e coletas dos tecidos. Neste estudo, utilizou-se somente camundongos fêmeas com de 8 a 12 semanas de idade. Todos os experimentos foram realizados em acordo com as normas éticas propostas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

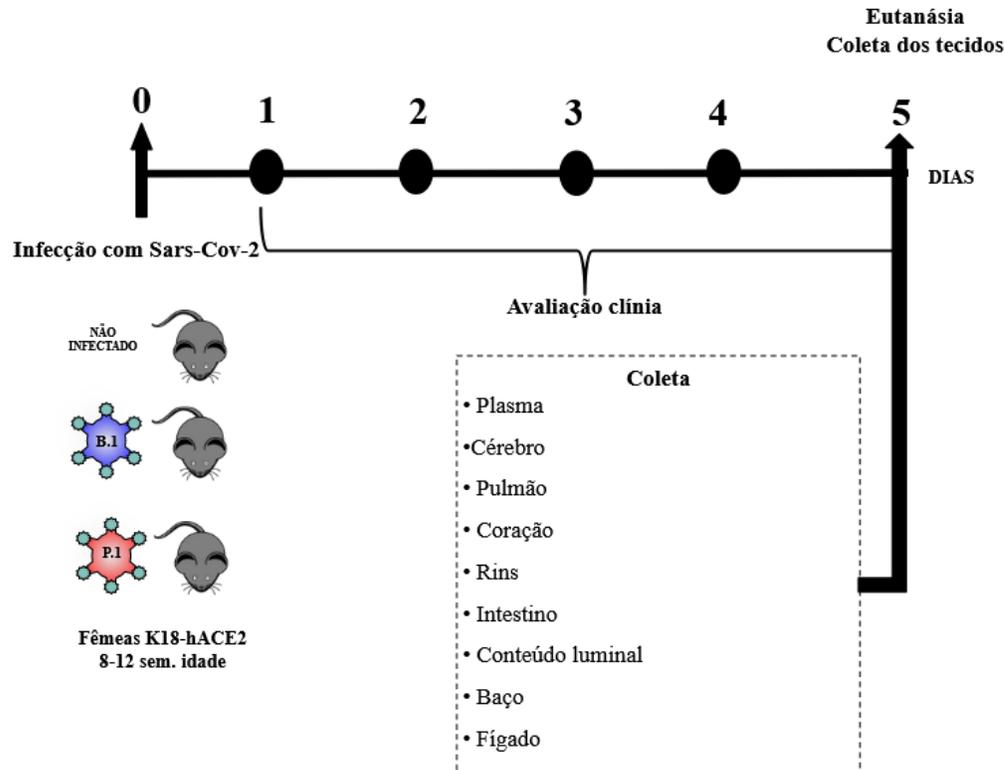
**Infecção**

Os animais foram anestesiados com solução contendo cloridrato de cetamina (100 mg/kg de peso do animal) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg de peso do animal) intraperitoneal e, posteriormente, infectados com 40  $\mu$ L de meio de cultura contendo  $10^4$  PFU/mL do SARS-CoV-2 cepa B.1 ou P.1 por aplicação intranasal (ROSSEELS, et al., 2021, MOREAU et al., 2020). Todos os animais foram pesados e analisados quanto aos parâmetros clínicos (Tabela 4) diariamente. A eutanásia e coleta dos tecidos foi realizada no quinto dia pós infecção. Foram coletados fezes, sangue periférico para separação do plasma, pulmão, coração, intestino delgado e grosso (duodeno e cólon) e rins (Figura 10). Para análise da microbiota foi coletado conteúdo luminal do cólon e congelado imediatamente em nitrogênio líquido.

**Tabela 4.** Parâmetros utilizados para avaliar escore clínico da doença.

<b>Parâmetro</b>	<b>Avaliação</b>	<b>Escore</b>
Peso corporal	0% de perda	0
	1 a 5% de perda	1
	6 a 10% de perda	2
	11 a 15% de perda	3
	16 a 20% de perda	4
	> de 20% de perda	5
Postura e aparência	Sem piloericação	0
	Piloericação	1
Atividade	Ativo	0
	Atividade moderada	1
	Pouca atividade	2
	Imobilidade	3
Abertura dos olhos	Normal	0
	Fechamento lento	1
	Fechados	2
Responsividade a estímulos	Normal	0
	Moderada	1
	Baixa	2
Respiração	Normal	0
	Acelerada	1

Adaptado de (KUMARI et al., 2021; MOREAU et al., 2020)



**Figura 10 . Desenho experimental da infecção pelo B.1 original ou P.1 variante e coleta dos tecidos**

Fêmeas K18-hACE2 foram inoculadas via intranasal, 40  $\mu$ L de meio de cultura estéril (grupo não infectado) ou contendo  $10^4$  PFU/mL do SARS-CoV-2 cepa B.1 ou P.1 (grupo P.1 variante). Foram avaliados durante 5 dias os parâmetros clínicos da doença (peso corporal, postura e aparência, atividade, abertura dos olhos, responsividade a estímulos e velocidade da respiração). No quinto dia após a infecção, os animais foram anestesiados e coletou-se o sangue para separação do plasma. Após a eutanásia, foram coletados os órgãos para análises de carga viral por qRT-PCR, perfil inflamatório por ELISA e transcritos inflamatórios, além de histologia para morfologia por coloração de hematoxilina e eosina (HE). Foram realizados dois experimentos independentes, totalizando o número amostral de 11 animais por grupo.

### Análise clínica da doença

Após a infecção, os animais tiveram o peso corporal e análise clínica da doença mensurados diariamente até o dia da coleta (5 dias após infecção) ou até 10 dias em análise de sobrevivência. Os parâmetros utilizados para avaliar a clínica da doença estão detalhados na Tabela 4. No momento da coleta foi mensurado o tamanho do coração, baço, cécum e cólon.

## Carga Viral

Os tecidos foram pesados e homogeneizados em 1 mL solução *Hank's Balanced Salt* (HBSS) (Gibco™; número catálogo: 14025092) contendo antibióticos (0,2% normocin; 1% Penicilina e Streptomicina; 1% solução gentamicina 10 mg/mL) com beads de zircão em homogeneizador (MagNa Lyzer, Roche Life Science). Em seguida, 200 uL da solução foram separados para realizar ensaio de placa e do restante do volume foi extraído RNA com o kit Quick-RNA viral kit (Zymo Research) seguindo as recomendações do fabricante. A concentração de RNA foi determinada por aparelho Nanodrop. O material foi amplificado por reação em cadeia da polimerase usando o sistema Taqman. A sequências dos primers utilizados foi:

Primer 1 : (5` to 3`) ACA GGT ACG TTA ATA GTT AAT AGC GT ;

Primer 2: Sequência (5` to 3`) ATA TTG CAG CAG TAC GCA CAC A

Oligo: Pass Sequência: 6FAM-ACA CTA GCC ATC CTT ACT GCG CTT CG-QSY.

O número de cópias virais foi determinado utilizando curva padrão do vírus e normalizado pelo peso de tecido (em miligramas).

## Escore histopatológico

No quinto dia após a infecção, os animais foram anestesiados com solução de cetamina e xilazina, e após perda total de resposta a estímulos foi realizada a coleta de sangue pelo plexo venoso retro bulbar, seguida de perfusão cardíaca com 20 ml de solução salina, decapitação para remoção do cérebro, e então remoção dos demais órgãos de interesse presentes na cavidade abdominal. O material destinado às análises histológicas foi fixado em solução tamponada de paraformaldeído 4% por 72 a 96 horas à 8°C. Após fixação, os materiais foram lavados três vezes com solução salina e mantidos em álcool 70% até o momento do processamento para inclusão em parafina. Foi realizada a microtomia em 5-7 µm para realização de coloração por hematoxilina e eosina. Após obtenção das imagens de microscopia dos cortes de pulmão e intestino, foi realizada análise qualitativa de escore inflamatório. Para o intestino foi avaliada a presença de infiltrado inflamatório, edema e ulcerações no epitélio (FACHI et al., 2020). Para o tecido pulmonar foi avaliada a hiperplasia de pneumócito do tipo II, inflamação perivascular, septal e alveolar, caracterizada pela presença de linfócitos, macrófagos e neutrófilos, além de quantidade de edema e fibrina alveolar (YINDA et al., 2021).

## RT-qPCR de genes inflamatórios

O material de RNA obtido do processamento para carga viral do pulmão, intestino delgado, intestino grosso e células epiteliais intestinais isoladas também foi utilizado para análise quantitativa de RT-PCR. Os genes alvos e o endógeno estão descritos na tabela 5. O isolamento de células epiteliais intestinais do cólon foi realizado por meio de incubação em 20 mL de HBSS com 2 mM de EDTA à 37°C, com homogeneizações de 15 segundos a cada 10 minutos durante 1 hora. Em seguida foi filtrado em 70 µm e lavado para remoção do EDTA por meio de centrifugação a 2000 rpm/10 minutos/4°C. Em seguida o *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de HBSS suplementado com 5% de soro bovino fetal, centrifugado à 1800 rpm/3 minutos/4°C e ressuspenso em tampão de lise contendo 1% de beta-mercaptoetanol (RNeasy® Kit Qiagen - número catálogo 7404).

O RNA foi convertido em cDNA seguindo as recomendações do fabricante do kit de conversão com transcriptase reversa High Capacity (Applied Biosystems™). A amplificação foi realizada por sistema de real time PCR Sybrgreen (Master mix - Applied Biosystems™). As sequências dos primers são apresentadas na tabela 5. Os resultados foram calculados para obtenção do delta *cycle threshold* ( $\Delta$ CT), subtraindo o valor de CT do gene alvo pelo gene endógeno (B2-microglobulina). A normalização dos valores de  $2^{-\Delta\Delta$ CT foi realizada com base no grupo B.1 original, e o resultado transformado em Log2 de modo a facilitar as comparações com o grupo P.1 variante.

**Tabela 5.** Lista de primers utilizados.

Gene	Sequências
<i>B2m (endógeno)</i>	F: 5' – CCCCACTGAGACTGATACATACG -3' R: 5'- CGATCCCAGTAGACGGTCTTG-3'
<i>Cxcl11</i>	F: 5'-CCGAGTAACGGCTGCGACAAAG-3' R: 5'-CCTGCATTATGAGGCGAGCTTG-3'
<i>Tnfa</i>	F: 5' - TCT TCT CAT TCC TGC TTG TGG C -3' R: 5' - CAC TTG GTG GTT TGC TAC GAC G - 3'
<i>Il6</i>	F: 5' - CTG CAA GAG ACT TCC ATC CAG - 3' R: 5' - AGT GGT ATA GAC AGG TCT GTT GG - 3'
<i>Il1b</i>	F: 5' GGC AGC TAC CTG TGT CTT TCC C -3' R: 5'ATA TGG GTC CGA CAG CAC GAG - 3'
<i>Rank1</i>	F: 5'- GCTCAACAAGGACACAGTGTGC-3' R: 5'- CGCATCGGATTTCTGTCCCA-3'
<i>Bcl2</i>	F: 5'- ATG CCT TTG TGG AAC TAT ATG GC - 3' R: 5'- GGT ATG CAC CCA GAG TGA TGC- 3'
<i>Bax</i>	F: 5' - AGA CAG GGG CCT TTT TGC TAC - 3' R: 5' - AAT TCG CCG GAG ACA CTC G - 3'
<i>Ifnb1</i>	F: 5'- CGT CCC AGA TCT CCT CAA CT - 3' R: 5'- AGA TCT CTG CTC GGA CCA CC - 3'
<i>Ifnl3 (IL28a/b)</i>	F: 5' - GCC TCT TCA TAX ACT GAG CCA - 3' R: 5'- CCT GTC CAG ACT CAC CTT GCT - 3'
<i>Ifng</i>	F: 5'- ACTGGCAAAGGATGGTGAC - 3' R: 5'-TGAGCTCATTGAATGCTTGG - 3'
<i>Isg15</i>	F: 5'-GAGCTAGAGCCTG CAGCAAT-3' R: 5'-TCACGGACACCAGGAAATCG-3'
<i>Tlr4</i>	F: 5' - ATGCATGGATCAGAAACTCAGCAA - 3' R: 5' - AAACCTCCTGGGGAAAAACTCTGG - 3'
<i>Reg3</i>	F: 5' - TTC CTG TCC TCC ATG ATC AAA A- 3' R: 5' - CAT CCA CCT CTG TTG GGT TCA- 3'
<i>Defb1</i>	F: 5'- GGACGCATTCTACCAAAAA-3' R: 5'- TCTTCCTTTCCAAGGCAGTT-3'
<i>Occludin</i>	F: 5' - CACTCCCAGACTCCACCACC- 3' R: 5' - CGATCCATCCCAGAGAAGCC- 3'

### **Enzyme-Linked Immunosorbant Assay (ELISA)**

Foram coletados fragmentos de 15-30 mg de pulmão, duodeno e cólon, aos quais foram adicionados 300 µL de tampão Ripa com inibidor de proteases. As amostras foram processadas para extração de proteínas em gelo com homogeneizador por 30 segundos à 7000 rpm e centrifugadas à 10000 rpm/10 minutos/4°C. O sobrenadante foi coletado para ensaio ELISA. Foram dosadas as citocinas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-17 , CXCL1 (KC), CXCL2 (MIP-2) e IFN- $\beta$

seguindo as recomendações do fabricante (R&D Systems). Outro marcador de inflamação intestinal, a lipocalina-2 foi quantificado em amostras de conteúdo luminal do cólon foram por kit ELISA, de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems). As concentrações desta proteína foram expressas em pg/mg de conteúdo luminal.

### **Análise de parâmetros bioquímicos**

A atividade da isoenzima MB da creatina quinase (CK-MB -Labtest, referência 118), da Transaminase Pirúvica e Oxalacética (TGP e TGO - Labtest, referências 53 e 52) e as concentrações plasmáticas de uréia (Laborleb, código UR130708) foram mensuradas de acordo com as recomendações dos fabricantes. A glicemia e concentração de corpos cetônicos foram mensurados em amostras de sangue periférico caudal com aparelho de glicemia (FreeStyle optium neo, Abbott).

### **Análise do perfil de microbiota intestinal por sequenciamento de DNAr 16S**

A extração de DNA do conteúdo luminal foi realizada com o kit PureLink™ Microbiome DNA Purification Kit (Invitrogen, código A29790) seguindo protocolo recomendado pelo fabricante. Para análise de 16 S foi realizada a amplificação da região V3-V4 do 16S ribossomal usando os primers 341F (5'-CCT AYG GGR BGC ASC AG-3') e 806R (5'-GGA CTA CNN GGG TAT CTA AT-3') e sequenciamento de nova geração (NGS). Tanto o preparo da biblioteca quanto o sequenciamento foram realizados pela empresa Novogene.

As sequências foram enviadas em formato Fastq e então aplicadas em teste de controle de qualidade por FastQC e MultiQC. Para realizar as etapas de filtragem, pareamento, identificação e remoção de ruídos foi utilizada a plataforma QIIME2 2021.11 e o plugin DADA2. Os resultados gerados em tabelas com valores de frequência das ASVs (*amplicon sequence variants*) e usados para construir a taxonomia utilizando SEPP (RODRIGUES, et al., 2022). Foi avaliada a  $\alpha$ -diversidade, por meio do índice de Shannon com base no perfil das espécies. Para cálculo da distância entre as amostras,  $\beta$ -diversidade, foi utilizada a escala multidimensional não métrica (NMDS) com base na abundância relativa dos gêneros (HU et al., 2021).

## **Análises estatística**

Todas as análises foram realizadas usando o software GraphPad Prism 5.0 (Graph Pad Software, Inc, San Diego, CA, EUA). Diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ . Os resultados foram primeiramente analisados por teste de normalidade de D'Agostino/Shapiro-Wilk e então comparados por teste-t Student ou ANOVA com *post test* de Tukey, dependendo do número de grupos e variáveis analisados.

## 5.4. Resultados

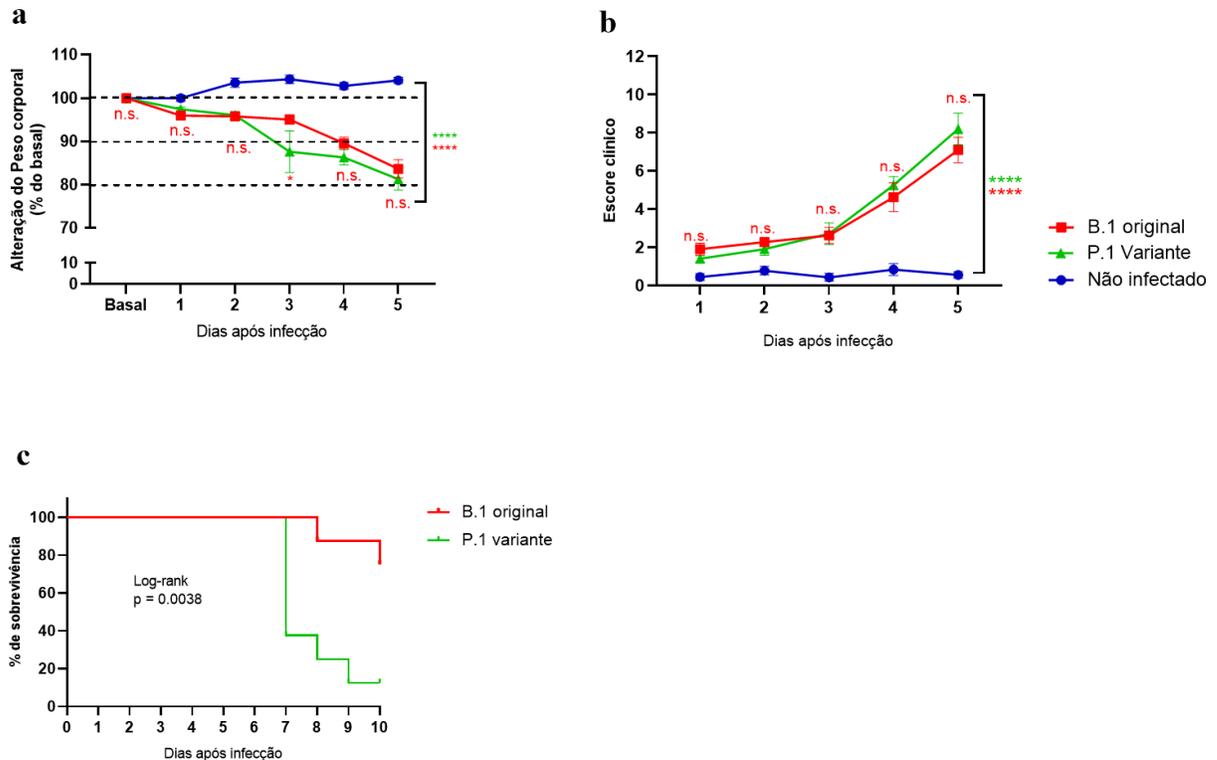
### Avaliação clínica da doença

Após a infecção com  $1 \times 10^4$  PFU tanto os animais infectados com a cepa original quanto os infectados com a variante gama desenvolveram doença segundo os parâmetros clínicos de perda de peso ( $****p < 0,0001$ ) e escore clínico ( $****p < 0,0001$ ) quando comparados ao grupo não infectado (Figura 11). Os dados apresentados nessa figura se referem a dois experimentos independentes. A compilação desses resultados indica que não há diferença entre peso ou escore clínico dos animais infectados. No entanto, quando analisados separadamente, observamos que no primeiro experimento ( $n=6$ ) não foram observadas diferenças na perda de peso entre os grupos P.1 e B.1 ao longo de 5 dias após infecção (dados não mostrados). No entanto, em um segundo experimento ( $n=5$ ), enquanto o grupo infectado com a cepa original apresentou a partir do terceiro dia pós infecção (dpi) reduções médias do percentual de peso corporal de 1,7%, 8% e 13%, a média do grupo P.1 foi mais alta (10%, 17% e 23% nos dias 3, 4 e 5, respectivamente (dados não mostrados). Ao realizar a análise comparativa de ambos os experimentos, observamos perda ponderal intensa (quase 20%) ao final do período experimental, tanto nos animais infectados com a cepa B.1, quanto nos animais infectados com a cepa da variante P.1 (Figura 11a)

Ambos os grupos infectados apresentaram escores maiores da doença entre os dias 4 e 5 após a infecção ( $***p < 0,001$ , B.1 original e P.1 variante vs. não infectado; Teste de Tukey Anova-2 way). As diferenças observadas entre os experimentos também foram vistas no escore clínico, de modo que na primeira infecção não houve diferença entre as linhagens quanto a gravidade da doença ao longo dos cinco primeiros dias após a infecção (dados não mostrados). Já no segundo lote, os animais infectados com a variante gama apresentaram doença com maior gravidade, segundo valor de escore clínico, entre os dias 4 ( $*p < 0,05$ ) e 5 ( $****p < 0,0001$ ) quando comparada com a evolução dos animais infectados com a B.1 original (dados não mostrados). Entretanto, quando compilados os dados, os animais infectados com a variante P.1 apresentaram escore clínico semelhante aos animais infectados com a cepa original (Figura 11b).

A infecção com a cepa P.1. apresentou maior letalidade do que a com a cepa B.1 (Figura 11c). A partir do sétimo dia da infecção foi observada elevada mortalidade de animais infectados com a variante, de modo que ao final do experimento o grupo apresentou sobrevivência de 12,5% (Figura 11c). Já no grupo infectado com a cepa B.1, a sobrevivência foi de 75%,

demonstrando assim maior gravidade da infecção por P.1 comparado à infecção gerada pela cepa original (Figura 11c).



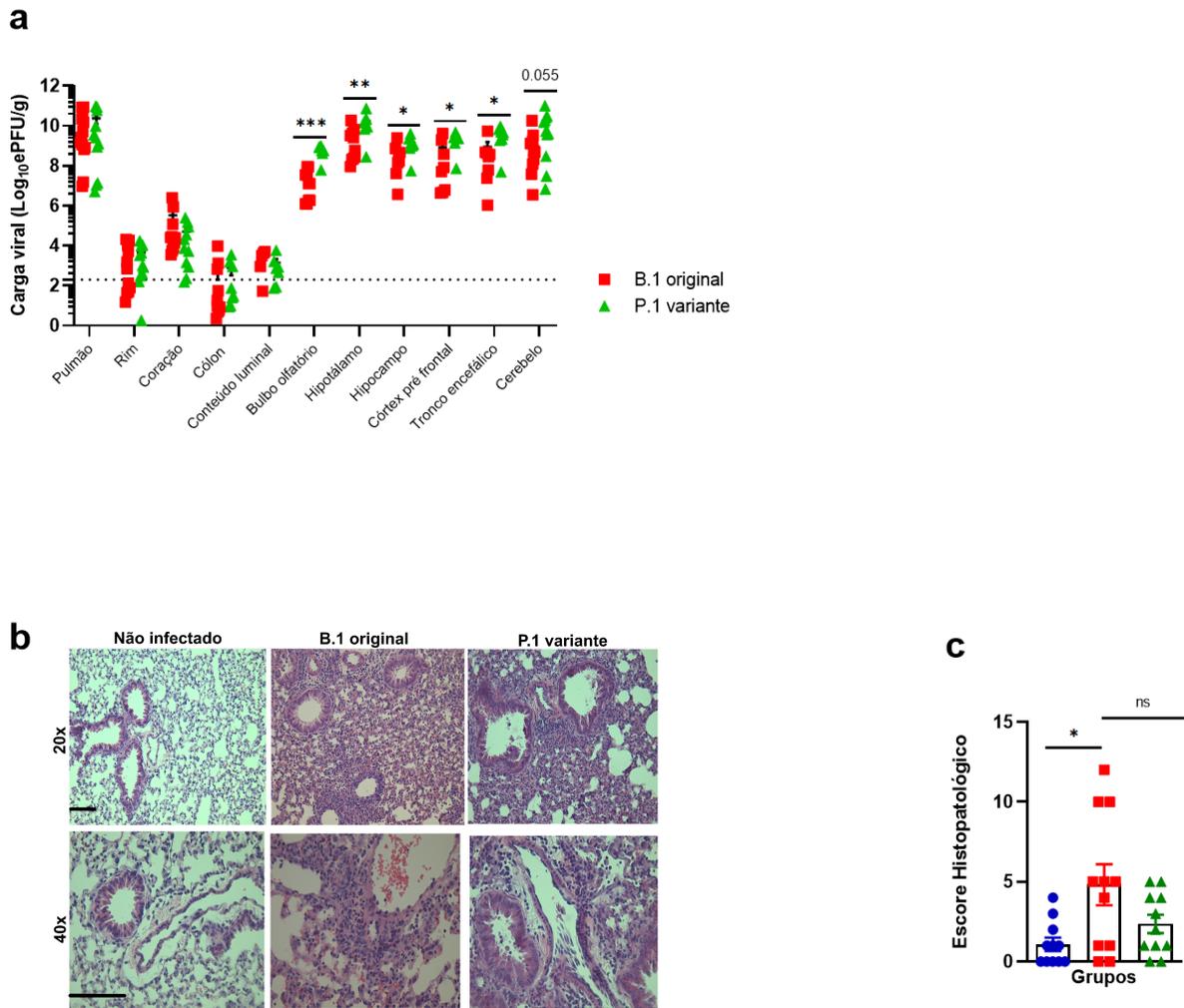
**Figura 11. Parâmetros clínicos e de sobrevivência da infecção pelas linhagens P.1 e B.1 em animais K18-hACE2.**

Fêmeas K18-hACE2 (8-12 semanas de idade) foram inoculadas via nasal com 40  $\mu$ L de meio de cultura puro (não infectado) ou contendo  $1 \times 10^4$  PFU/mL da cepa B.1 (B.1 original) ou P.1 (P.1 variante) do SARS-CoV-2. Após a infecção foi acompanhado o peso corporal e escore clínico por 5 dias, e 10 dias para análise de sobrevivência. Ao final do período experimental de 5 dpi foi realizada a eutanásia, medida dos órgãos e coleta dos materiais biológicos. **(A)** Percentual de variação do peso corporal. **(B)** Escore clínico. **(C)** Sobrevivência. As linhas representam a média  $\pm$  SEM. \*\*\* $p < 0,0001$  por Anova 2-Way com teste Tukey de multi comparação para a média dos grupos entre P.1 variante vs não infectado e B.1 original ou não infectado. Os dados nas figuras A e B são representativos de dois experimentos ( $n=11$ ); em C dados de um experimento ( $n=8$ ).

### **Comparação de tropismo tecidual e da histopatologia pulmonar**

Para verificação do perfil de tropismo tecidual da variante P.1 foi analisada a carga de partículas virais no quinto dia após infecção por RT-PCR em diferentes amostras biológicas (pulmão, rim, coração, cólon, conteúdo luminal do colón e cérebro) (Figura 12a). Conforme pode ser observado na figura 12a, a carga viral do pulmão foi alta, mas similar entre as linhagens do SARS-CoV-2 empregadas (Figura 12a). Para os demais tecidos, à exceção do cérebro, também não houve diferença significativa de carga viral entre as linhagens. A carga viral encontrada no cérebro foi alta, sendo próxima à observada no pulmão. Além disso, verificou-se maiores cargas virais para todas as regiões do cérebro avaliadas (bulbo olfatório, hipotálamo, hipocampo, córtex pré-frontal, tronco encefálico e cerebelo) no caso dos animais infectados com a cepa P.1. (Figura 12a).

Apesar da infecção pela variante P.1 ter apresentado maior letalidade, o pulmão dos animais no quinto dia pós-infecção não apresentou alterações patológicas significativamente diferentes das observadas no grupo infectado com o vírus original (Figura 12b e c).

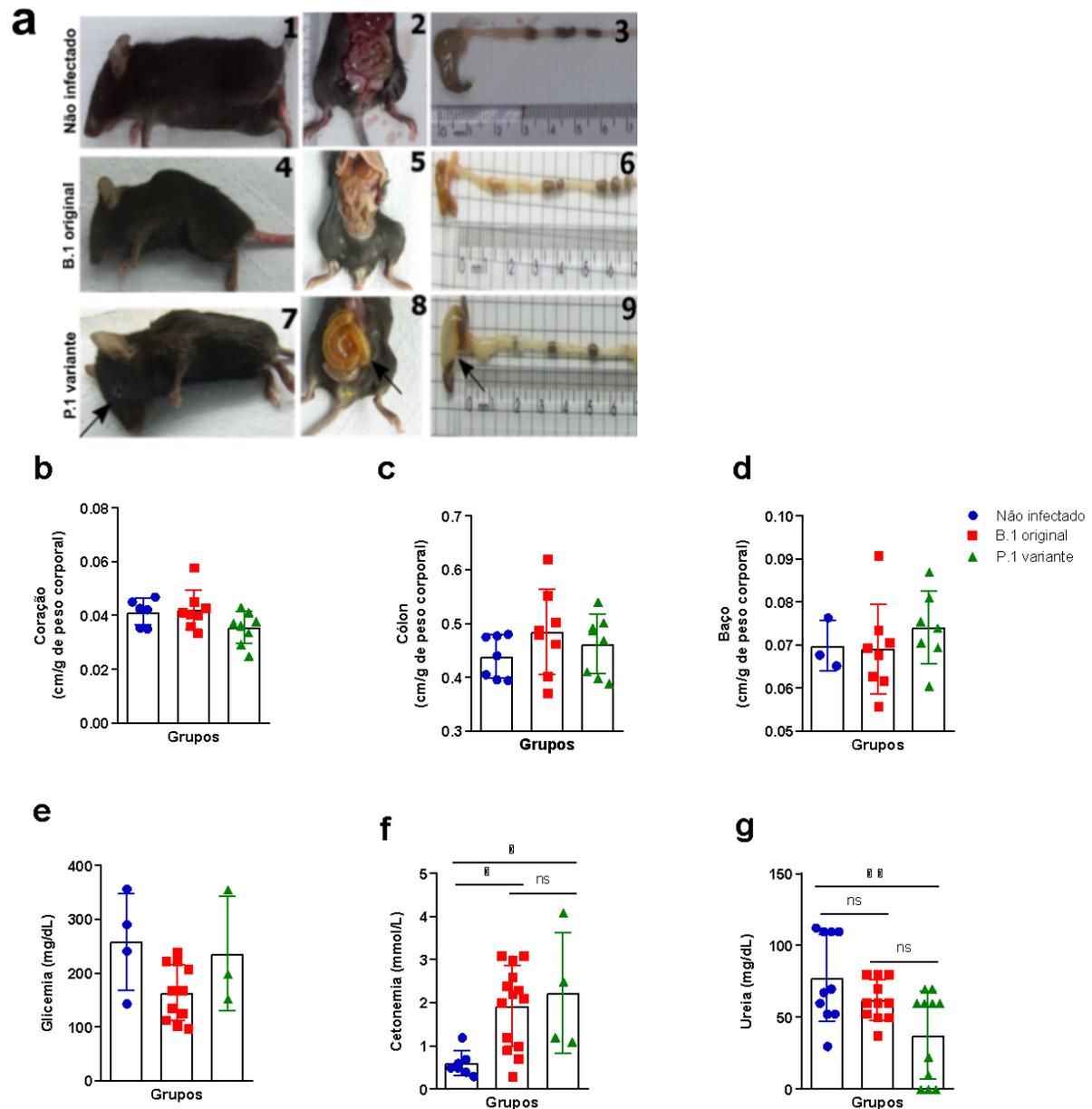


**Figura 12. Comparação de tropismo tecidual e efeito histopatológico no pulmão entre a variante P.1 e o SARS-CoV-2 original.**

(a) Carga viral avaliada por qRT-PCR de RNA viral de diferentes tecidos coletados após 5 dias da infecção em animais K18-hACE2. Linha tracejada representa o valor mínimo de log para quantidade de RNA viral para ser considerada infecção. Gráficos de barras representam a média do grupo e SEM. Dados obtidos de duplicata experimental ( $n=11$ ). (b) Cortes histológicos do pulmão em coloração de hematoxilina e eosina (HE); Escalas apresentadas em 100 microns. (c) Escore histopatológico do pulmão. \* $p<0,05$  por Anova One-Way com teste Tukey de multi comparação;  $n=5$ .

### **Comparação de efeitos macroscópicos e em parâmetros bioquímicos**

Foram observadas alterações macroscópicas nos animais infectados com P.1, como secreção nos olhos (Figura 13 a7) e inchaço com acentuada coloração amarelada no interior de todo o intestino delgado (Figura 13 a8) e cécum (Figura 13 a9). Não foram encontradas essas alterações nos animais infectados com o vírus original. A infecção, pelas duas linhagens virais, não alterou o tamanho do baço, ou dos outros órgãos avaliados (Figura 13 b-d). Em relação aos parâmetros bioquímicos dosados no plasma, não houve diferença para TGO, TGP, CK-MB (dados não mostrados) ou glicemia após a infecção em ambos os grupos (Figura 13 e) No entanto, houve considerável aumento da concentração de corpos cetônicos nos grupos infectados em relação aos animais não infectados (Figura 13 f). Animais infectados pela variante P.1 apresentaram redução nas concentrações de uréia plasmática quando comparados ao grupo controle não infectado (Figura 13 g).



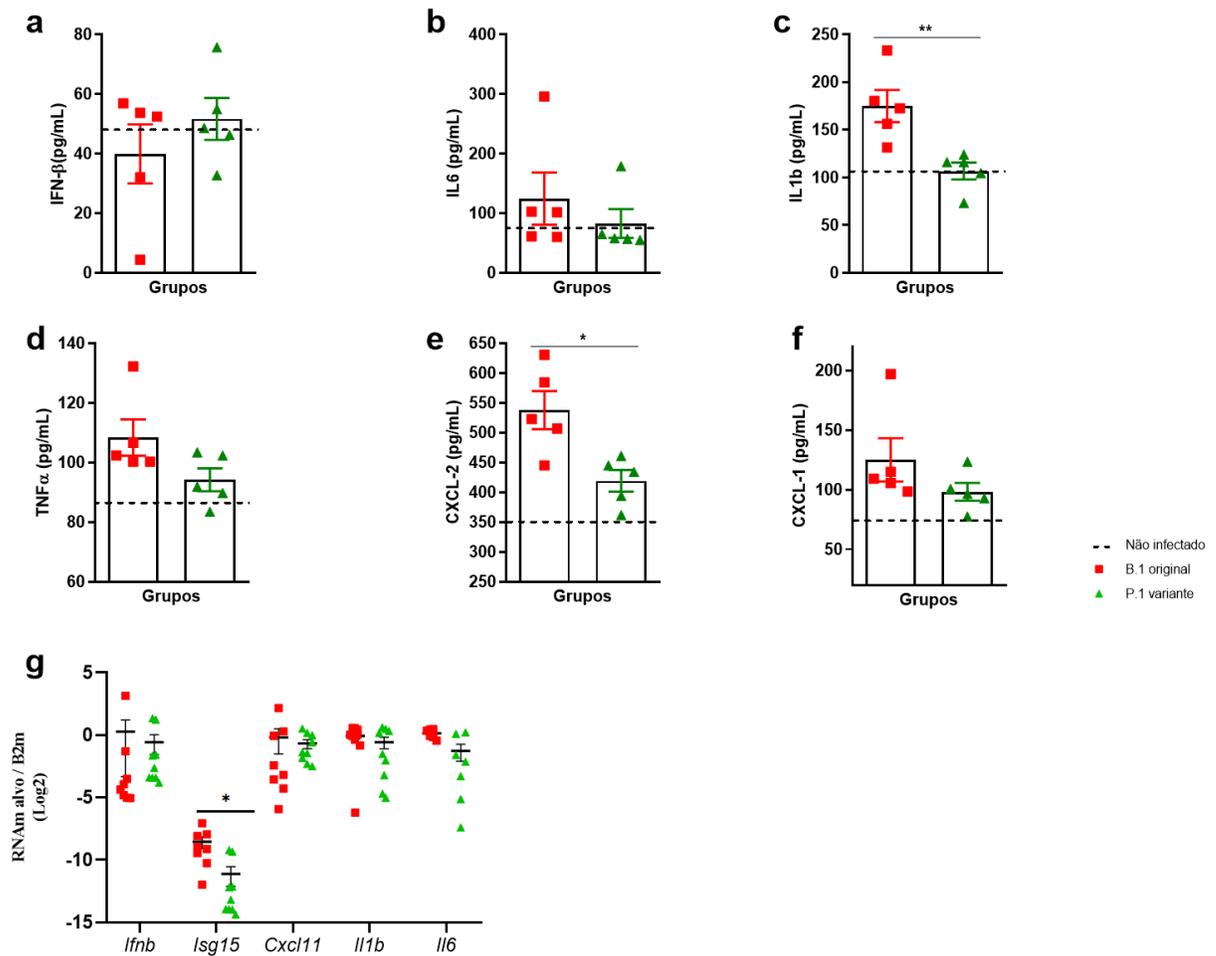
**Figura 13. Análise macroscópica geral, tamanhos do baço, cólon e coração e parâmetros bioquímicos no plasma e sangue.**

Medidas mensuradas e amostras de plasma coletadas ao final do período experimental, 5º dia após a infecção. **(a)** Macroscopia de corpo todo (1, 4 e 7), da cavidade abdominal (2, 5 e 8) e dos segmentos cécum e cólon (3, 6 e 9). **(b)** coração, **(c)** cólon, **(d)** baço; **(e)** glicemia; **(f)** cetonemia e **(g)** ureia plasmática. (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ) Anova One-way. Amostras obtidas de dois ensaios independentes

(n=3-8). Média do grupo representada pelas barras e valores individuais de cada animal expressos em pontos  $\pm$  SEM.

### **Perfil inflamatório do pulmão**

A concentração proteica de IFN- $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e de CXCL1(KC) não apresentou alterações entre os grupos experimentais (Figura 14 a-f). A infecção pela variante P.1 induziu menor produção de IL1- $\beta$  e CXCL-2 (MIP-2) comparada à infecção com o vírus original (Figura 14 c-e) (\*\*p<0,005 e \*p<0,05, respectivamente). Em relação à expressão gênica de citocinas inflamatórias, não houve diferença nas concentrações de *Infb*, *Cxcl11*, *Il1b* e *Il6*. No entanto, a expressão de *Isg15* foi menor no pulmão de animais infectados pela variante, comparada ao grupo infectado com a cepa original (Figura 14 g)



**Figura 14. Perfil inflamatório pulmonar de animais infectados com as linhagens B.1 ou P.1 de SARS-CoV-2.**

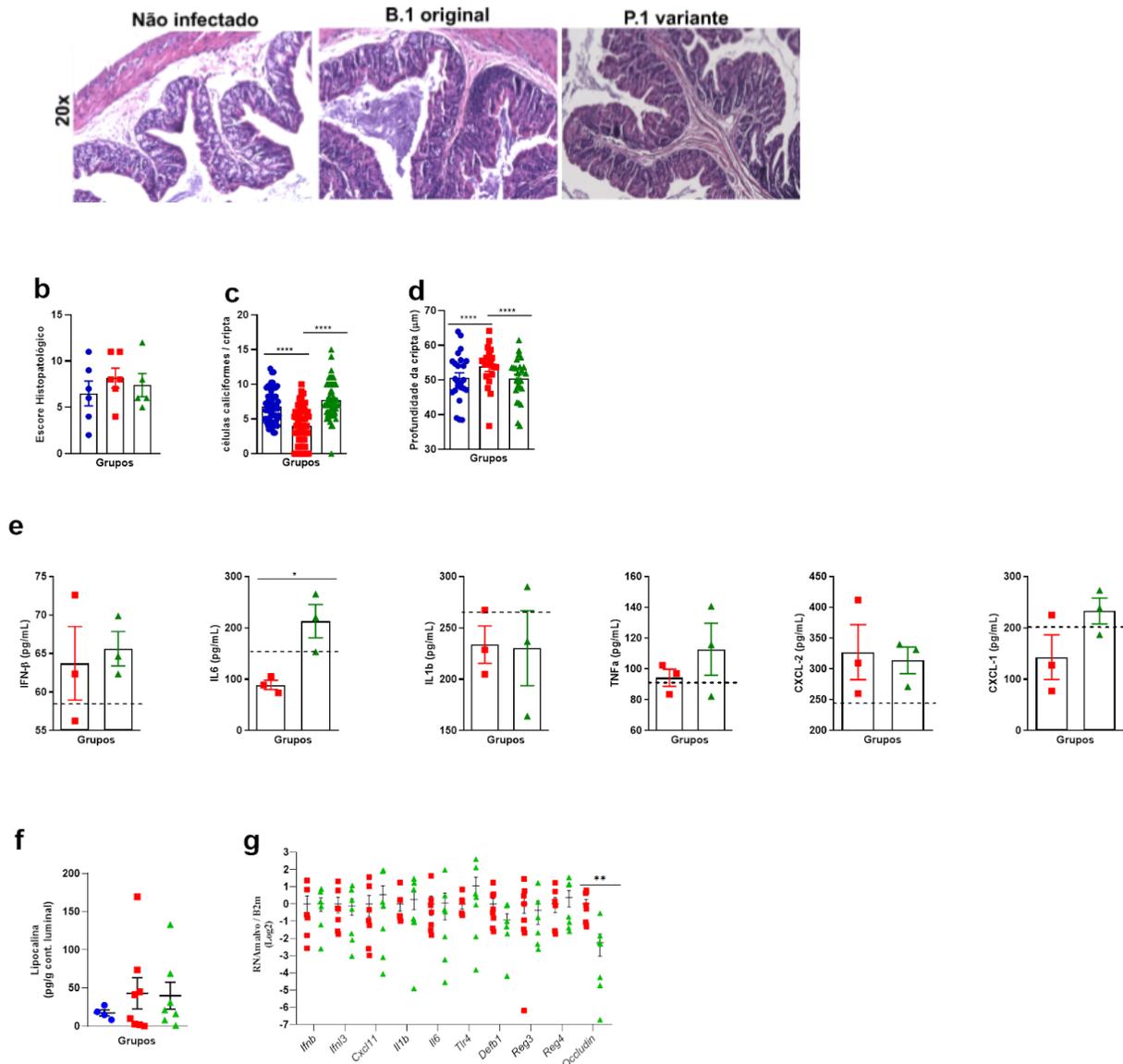
Citocinas inflamatórias avaliadas por ELISA e qRT-PCR de pulmão coletado no 5 dpi. (a) Concentração de IFN- $\beta$ ; (b) IL-6; (c) IL1- $\beta$  (\*\*p<0,005, Test T); (d) TNF- $\alpha$ ; (e) CXCL-2 (\*p<0,05, Test T); (f) CXCL-1 ou KC; Linha tracejada representa o valor médio das concentrações do grupo não infectado. (g) qRT-PCR dos transcritos de *Ifnb*, *Isg15*, *Cxcl11*, *Il1b* e *Il6* com valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados pelo grupo B.1 e representados em Log2. Dados obtidos de um experimento com n=5-6 para análise do ELISA e de dois experimentos independentes para análise de qRT-PCR (n=7-9). Média do grupo representada pelas barras e valores individuais de cada animal expressos em pontos  $\pm$  SEM.

## Perfil inflamatório intestinal

Na análise histopatológica do cólon foi possível observar apenas diferença na quantidade de células produtoras de muco. Houve redução no número de células calciformes por cripta no cólon de animais infectados com SARS-CoV-2 original comparado ao grupo controle não infectado (\*\*\*\* $p < 0,001$ ) (Figura 15b-c). Contudo, em animais infectados com P.1 observamos o oposto, ou seja, aumento no número dessas células, comparado ao grupo infectado com SARS-CoV-2 (\*\*\*\* $p < 0,001$ ). Não foi observada diferença quanto à profundidade de criptas ou escore histopatológico (Figura 15d).

Com relação ao cólon, para as proteínas IFN- $\beta$ , IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , CXCL-2 e CXCL-1, as concentrações apresentadas pelo grupo infectado com a variante foram similares às do grupo infectado com a cepa B.1 (Figura 15e). A infecção pela variante aumentou a produção de IL-6 no cólon, valor médio duas vezes maior (212 pg/ml) que o apresentado pelo grupo infectado com a linhagem original do SARS Cov-2 (88,9 pg/ml) (Figura 15 e) (\* $p < 0,05$ , Test T). Não houve diferença nas concentrações de lipocalina entre os grupos experimentais (Figura 15f).

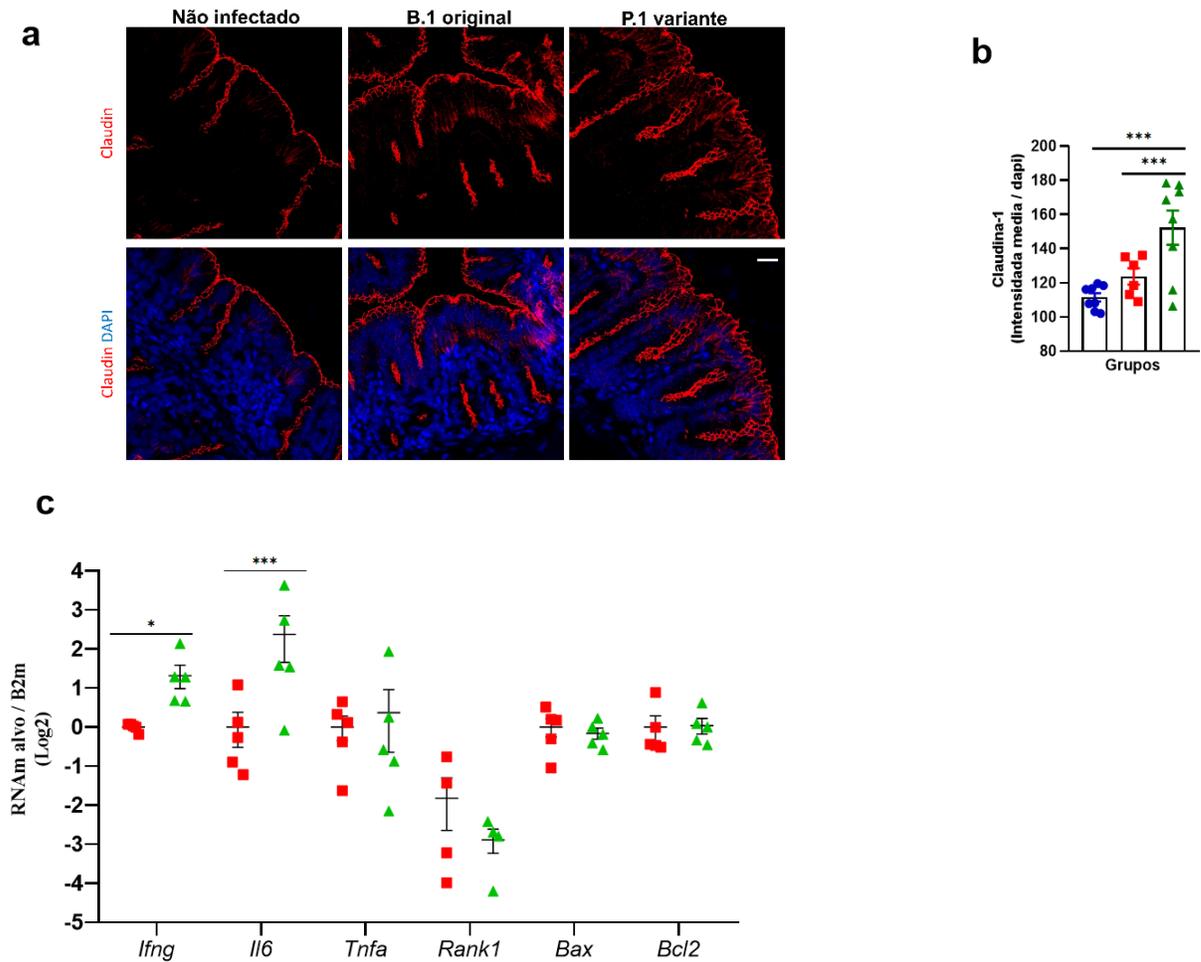
Não houve diferença na expressão de genes antivirais, inflamatórios ou de peptídeos antimicrobianos entre os grupos infectados (Figura 15g). A infecção por P.1 reduziu a expressão do gene de junção celular *Ocln*, comparado à infecção pelo vírus original (\*\* $p < 0,005$ ) (Figura 15 g). Além disso, a infecção pela variante gama induziu aumento da proteína claudina-1 no cólon de camundongos em comparação com os grupos não infectado e infectado com B.1 (\* $p < 0,05$ ) (Figura 16a-b). A expressão de genes relacionados à inflamação (*Rank1* e *Tnfa*) e apoptose (*Bax* e *Bcl2*) por células epiteliais do cólon foi semelhante entre os animais infectados com as diferentes linhagens de SARS Cov-2 (Figura 16c). Contudo, na infecção pela variante houve maior expressão *Ifng* e *Ii6* pelas células do epitélio do intestino grosso (Figura 16c) (\* $p < 0,05$ , Test T, e \*\*\* $p < 0,0005$  Anova-one way). Este último resultado é condizente com o aumento da proteína no tecido colônico (Figura 15 e) e indica ativação inflamatória no tecido.



**Figura 15. Análise morfológica e inflamatória do cólon de animais K18-hACE2 infectados com SARS-CoV-2 ancestral ou variante P.1.**

(a) Microscopia de cólon em HE. (b) Análise quantitativa da morfologia por: escore histopatológico, número de células caliciformes por cripta e comprimento de cripta. (c) Análise quantitativa da morfologia por: escore histopatológico, número de células caliciformes por cripta e (d) comprimento de cripta; (e) Citocinas IFN-β, IL-6, IL-1-β, TNF-α, IL-17, CXCL-2 e CXCL-1 ou KC avaliadas por ELISA no cólon; Linha tracejada representa o valor médio das concentrações do grupo não infectado. (f) Lipocalina (pg/g de conteúdo luminal do cólon), quantificada por ELISA; (g) Expressão gênica por qRT-PCR de citocinas inflamatórias (*Ifnb*, *Ifn3*, *Cxcl11*, *Il6*, *Il1b*), receptor imunológico (*Tlr4*), peptídeos antimicrobianos (*Reg3*, *Reg4* e *Defnb1*) e componente de junção celular (*Ocld*). Valores de  $2^{-\Delta\Delta CT}$  normalizados pelo grupo B.1

e representados em Log2. \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,005$  Test T; \*\*\*\* $p < 0,001$  Anova 1-way. As barras representam a média  $\pm$  SEM e formas geométricas representam os valores individuais. N=3-6.



**Figura 16 .** Imunofluorescência de claudina-1 em cólon e qRT-PCR de células epiteliais colônicas de animais infectados com as linhagens B.1 ou P.1 de SARS-CoV-2.

(a) Imunofluorescência para Claudina-1 (vermelho) e marcação de núcleo (DAPI/azul) em cortes de cólon (5  $\mu$ m). (b) Quantificação de claudina-1 por intensidade média de fluorescência normalizada pela intensidade de fluorescência do DAPI. \* $p < 0,05$  Anova one-Way. Não infectado n=4; B.1 original n=5; P.1 variante n=5; (c) Análise de expressão gênica por qRT-PCR em células epiteliais intestinais isoladas do cólon de animais 5 dpi. Dados obtidos de um experimento. Valores de  $2^{\Delta\Delta CT}$  normalizados pelo grupo B.1 e representados em Log2; n=5. Média do grupo representada pelas barras e valores individuais de cada animal expressos em pontos  $\pm$  SEM.

## **Análise da composição da microbiota intestinal após infecção por SARS-CoV-2 original ou variante P.1**

A diversidade alfa que avalia a riqueza ou diversidade da microbiota intestinal dentro de uma amostra, foi avaliada pelos parâmetros de índice Shannon e medidas qualitativas de diversidade filogenética. Segundo índice Shannon, houve redução da diversidade no grupo P.1 comparado ao grupo não infectado ( $*p<0,05$ ), porém sem alteração da diversidade do grupo B.1 com os demais. Considerando as relações filogenéticas na medida qualitativa de enriquecimento das comunidades, a infecção por P.1 também apresentou redução do enriquecimento, comparada ao observado na infecção pelo vírus original ( $*p<0,05$ ) (Figura 17a). Não houve diferença quando avaliados todos os grupos em conjunto. Com relação à medida qualitativa de características observadas de enriquecimento, a infecção pela variante P.1 reduziu o enriquecimento das comunidades quando comparado a comunidade pós infecção pelo vírus original ( $*p<0,05$ ) ou antes da infecção por SARS-CoV-2 ( $*p<0,05$ ). Neste caso, houve diferença entre todos os grupos ( $*p<0,05$ ) (Figura 17a).

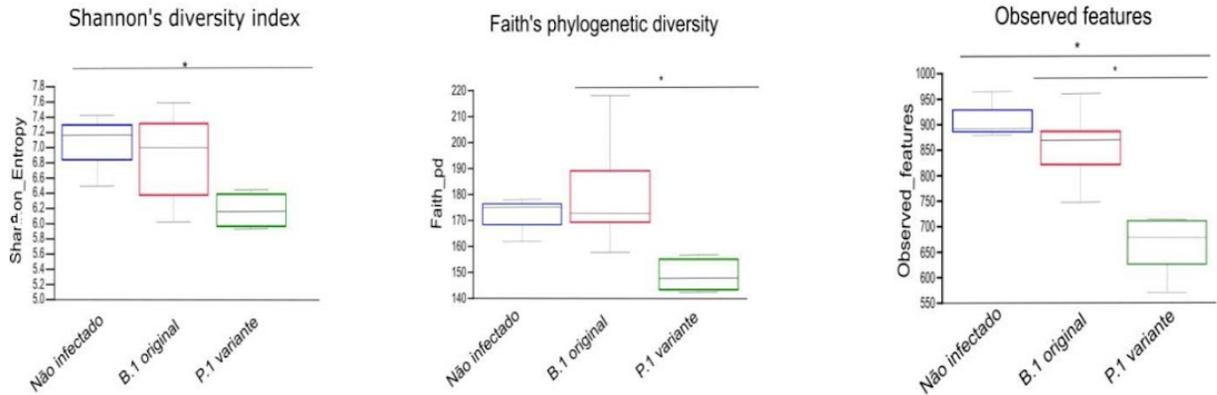
Por outro lado a diversidade beta, que avalia as diferenças entre a riqueza ou diversidade comparando a dissimilaridade entre as amostras, revelou mudanças na composição microbiana intestinal dos animais infectados pela variante P.1 em comparação aos animais infectados com SARS-CoV-2 original ou em estado basal sem infecção ( $*p<0,05$  por Bray-Curtis e Unweighted UniFrac) (Figura 17b-c). Em seguida, avaliamos a composição da microbiota em diferentes níveis taxonômicos.

Devido ao baixo número amostral (não infectados  $n=3$  e infectados  $n=6$ ) para as análises de abundância relativas dos grupos taxonômicos, avaliados por teste de ANCOM, não foram observadas diferenças significantes. Contudo, é possível observar aumento da abundância relativa dos filos *Bacteroidota* e *Verrucomicrobiota* na microbiota dos animais infectados com variante P.1 (Figura 17d). Isso é observado na abundância relativa para *Verrucomicrobiae* e *Bateroidia*, em que a infecção por P.1 parece ter aumentado nessas classes, comparado aos demais grupos experimentais (Figura 17d). Mais amostras são necessárias para aumentar o poder de análise comparativa da composição da microbiota intestinal de animais infectados por SARS-CoV-2 ou pela variante P.1.

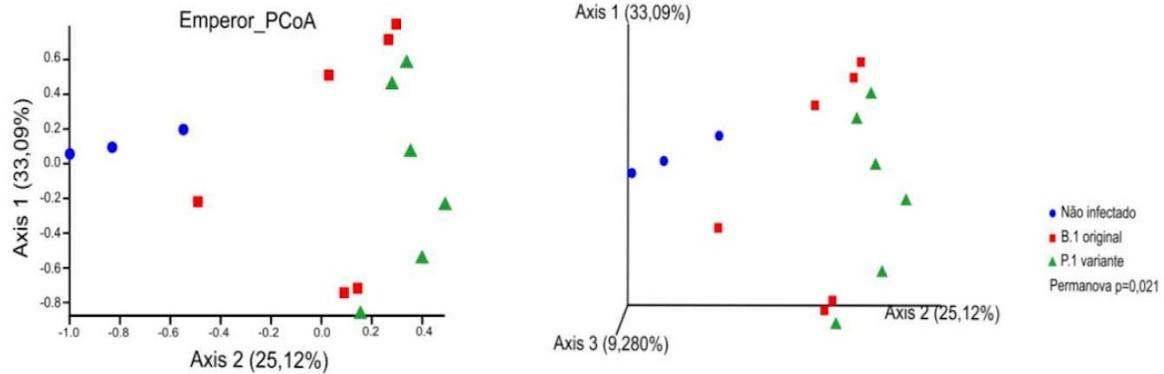
Apesar de não ter sido observado diferenças estatísticas ao nível de ordem, algumas *features* parecem apresentar um padrão biológico comum de aumento (*Rhizobiales*, *Staphylococcales*, *Pseudomonadales*, *Oscillospirales*, *Gastranaerophilales*, *Lactobacillales*, *Bacteroidales* e *Vibrionales*) ou de redução (*Rhodospirillales* e *Veillonellaes-Selenomonadoles*)

da abundância entre os animais infectados quando comparado aos animais não infectados (Figura 18a). Nesse sentido, também se observou uma tendência no aumento (*Verrucomicrobiales*) ou redução (*Bacilales*, *Acholeplasmatales* *Aeromonadales*, *Lachospirales* e *Richettsiales*) de algumas ordens de bactérias apenas nos animais infectados com a variante P.1, comparando com os animais sem infecção (Figura 18a).

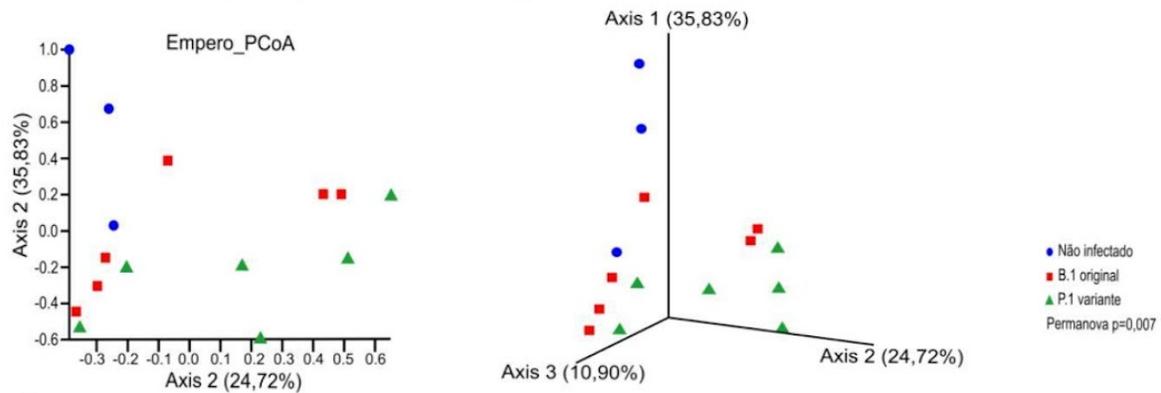
**a Alfa Diversidade**



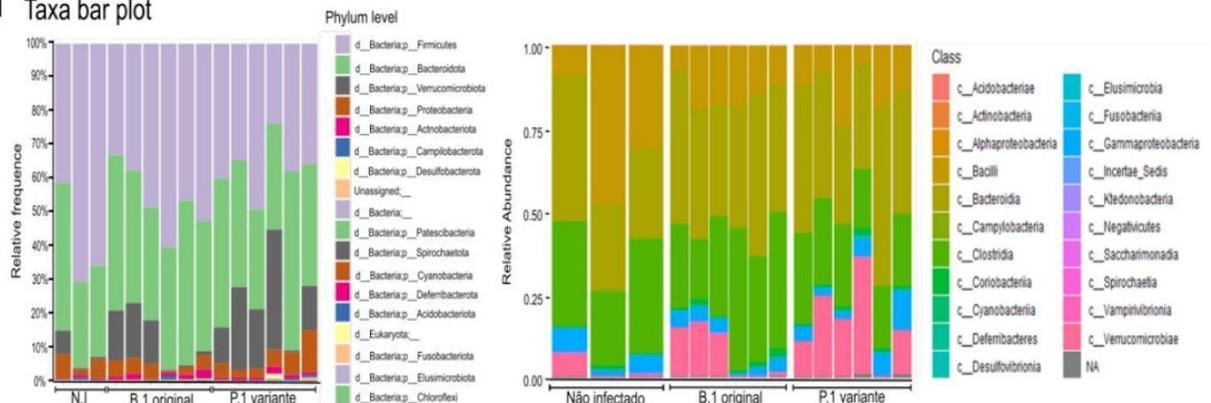
**b Beta Diversidade (Bray-Curtis distance)**



**c Beta Diversidade (Unweighted UniFrac distance)**



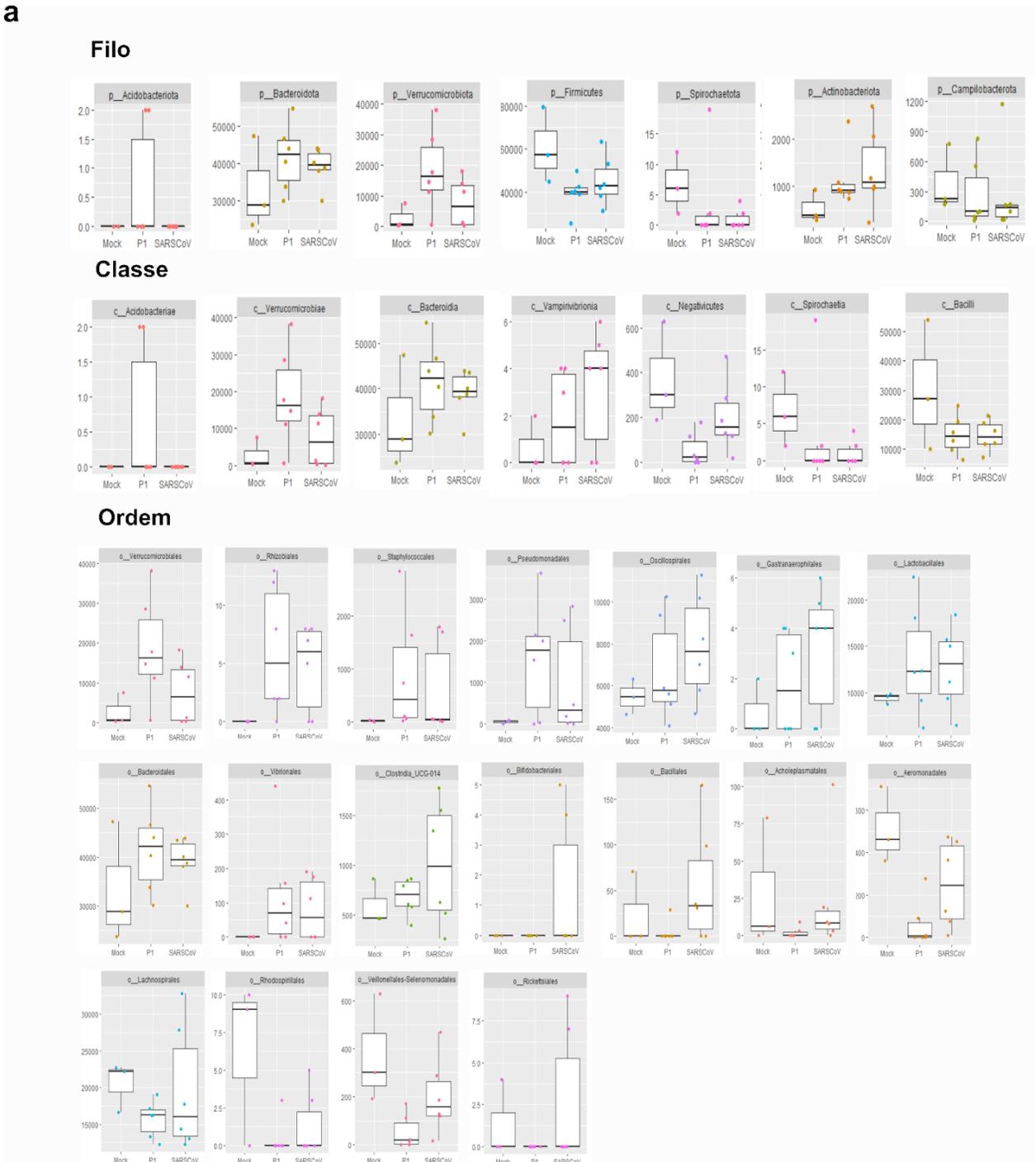
**d Taxa bar plot**



**Figura 17. Análise da composição da microbiota intestinal de camundongos infectados com SARS-CoV-2 original ou Variante P.1 em camundongos K18-hACE2.**

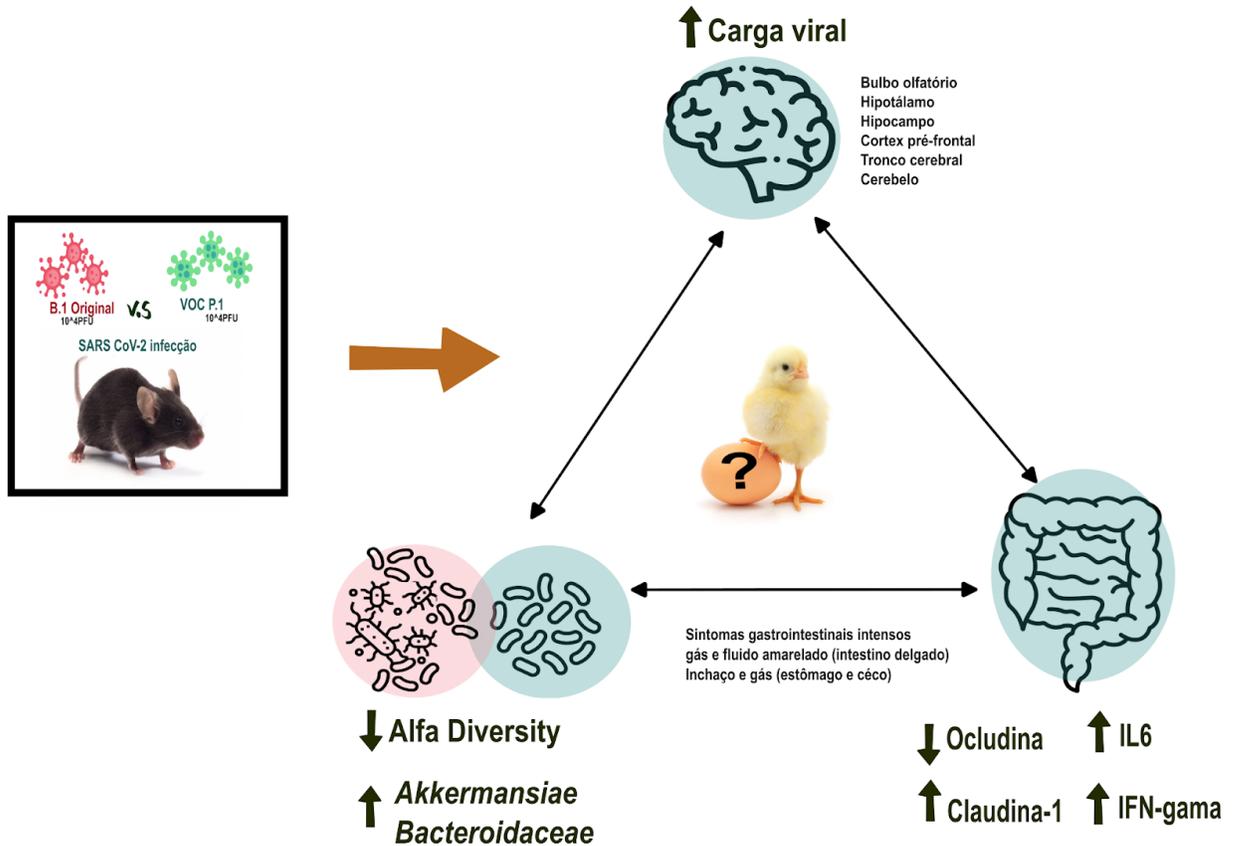
Análise de microbiota intestinal realizada por sequenciamento de DNA ribossomal 16S de amostras de conteúdo luminal coletadas do cólon 5 dias após a infecção por SARS-CoV-2 original ou pela variante P.1. **(a)** Alfa diversidade analisada por medida quantitativa do enriquecimento das comunidades (Shannon's diversity index), e qualitativa por medida do enriquecimento das comunidades considerando as relações filogenéticas incorporadas (Faith's phylogenetic diversity) e medida qualitativa do enriquecimento das comunidades (Observed features). \* $p < 0,05$  comparação entre todos os grupos; Kruskal-wallis. **(b)** Beta diversidade analisada por medida quantitativa da dissimilaridade (Bray-curtis distance). **(c)** Beta diversidade analisada por parâmetro qualitativo de medida de dissimilaridade entre as comunidades, considerando a relação filogenética incorporada entre elas (Unweighted UniFrac distance). **(d)** Abundância relativa de táxons ao nível de filo e classe representados em gráficos de barras. Não infectado  $n=3$  e infectados  $n=6$ .

a



**Figura 18. Abundância relativa de táxons nos níveis filo, classe ou ordem após 5 dias de infecção por SARS-CoV-2 original ou variante P.1.**

(a) Análise da microbiota intestinal por sequenciamento de 16S rDNA. Não infectado n=3 e infectados n=6.



**Figura 19. Causa ou consequência: Qual a relação entre as alterações da microbiota e componentes da barreira epitelial intestinal e o aumento da carga viral no cérebro durante infecção pela P.1?**

A infecção causada pela variante gama em comparação com a infecção do vírus original induziu alta mortalidade, que pode estar relacionada com maior carga viral no cérebro. A infecção pela variante gama gerou sintomas gastrointestinais intensos, disbiose e alterações em componentes da barreira epitelial intestinal. Todas essas alterações presentes na doença causada pela gama nos levam ao questionamento de causa ou consequência: as mudanças no intestino influenciam os níveis virais mais altos no cérebro ou os níveis mais altos no cérebro afetam as mudanças no intestino?

## 5.5. Discussão

Neste trabalho buscamos apresentar comparações clínicas e moleculares entre as infecções causadas pelo vírus SARS-CoV-2 do início da pandemia e pela variante gama em animais considerados modelo para Covid-19 grave. Os dados clínicos apontam uma maior gravidade para infecção por P.1, com drástica queda na sobrevivência a partir do 6 dpi, corroborando os dados de mortalidade previamente obtidos (MAO et al., 2021). Apesar disso, vale ressaltar que, em outro modelo experimental, hamsters, não houve diferença na gravidade da doença de animais infectados com a variante P.1 comparado aos infectados com a cepa antiga de SARS-CoV-2, segundo a evolução de perda de peso corporal (IMAI et al., 2021).

Apesar da infecção pela variante ter apresentado maior mortalidade do que a infecção pela cepa B.1, não houve diferença no tropismo avaliado no pulmão, coração, rim, cólon e conteúdo luminal. Contudo, observamos maior tropismo pela variante no cérebro para todas as regiões avaliadas. Em estudo que comparou o tropismo das linhagens P.1 e B.1.351 (variante beta) no tecido pulmonar de animais BALB/c e C57BL/6 também não foram observadas diferenças nas cargas virais no dia 3 após infecção (MONTAGUTELLI et al., 2021). O alto tropismo da variante gama/P.1 também foi observada no bulbo olfatório de hamsters comparado a outras linhagens, demonstrando assim ser um efeito independente da expressão do receptor ACE2 (humano e murino) em camundongos K18-hACE 2 (DE MELO et al., 2023). No entanto, vale ressaltar que a intensidade da invasão do SARS-CoV-2 no sistema nervoso central, é mais intensa em K18-hACE2 do que a observado em humanos, induzindo alta mortalidade durante infecção neste modelo experimental (FUMAGALLI et al., 2022; KUMARI et al., 2021).

Em camundongos K18-hACE2, as variantes alfa (B.1.17) e beta (B.1.351) causaram sintomas mais intensos como inchaço em estômago e intestino, além de infecção ocular e lesões de órgãos mais graves, com deposição de dímero D em órgãos vitais, comparadas a cepa original (RADVAK et al., 2021). Em necrópsia realizada em dois animais infectados pela variante P.1, foi identificada coagulação disseminada intravascular, e parada cardiorrespiratória como sendo a causa da morte (Anexo 3). Winkler e colegas observaram que em 2 de 9 animais K18-hACE2 infectados com  $2,5 \times 10^4$  PFU de SARS-CoV-2, em análise histológica do coração havia presença de sérias alterações, incluindo aumento de eosinófilos e presença de núcleos picnóticos. Essas alterações podem estar relacionadas com infarto do miocárdio associado a períodos longos de isquemia (KHAN et al., 2020). Em estudo no qual os pesquisadores infectaram animais K18-hACE2 com dose ainda maior de SARS-CoV-2 ( $1 \times 10^6$ ) não houve alterações cardíacas em análises histológicas (CAROSSINO et al., 2021). No primeiro semestre

do surgimento da pandemia de Covid-19, estudos já apontavam a miocardite como sendo fator importante presente em casos graves da doença, bem como seu impacto na mortalidade dos pacientes (GUO et al., 2020a; SHI et al., 2020; ZHENG et al., 2020). Ainda não foram bem esclarecidos os mecanismos relacionados aos danos ao tecido cardíaco observados na Covid-19. Contudo, as hipóteses propostas para explicar o surgimento de doença cardíaca aguda ou crônica em decorrência da infecção por SARS-CoV-2 envolvem questões relacionadas ao efeito direto do vírus no coração, como por exemplo maior tropismo, ou indiretos ao vírus, mas relacionadas à sua patologia, como inflamação sistêmica e hipóxia em decorrência da resposta imune, além do surgimento de evento trombótico e aumento de ácido láctico (TAJBAKSHI et al., 2021).

Corroborando a literatura atual, no quinto dia após a infecção, avaliado neste trabalho, não houve aumento de IL-6 no pulmão, tanto na infecção com o vírus original quanto com a variante P.1. Com relação às diferenças que a variante P.1 apresentou, quando comparado o perfil inflamatório pulmonar, observamos menores concentrações de IL-1 $\beta$  e CXCL-2, *versus* o apresentado no pulmão dos animais infectados com a cepa original. Em trabalho comparativo entre a P.1 e outras duas linhagens anteriores do SARS-CoV-2 não consideradas variantes de preocupação, em que foi utilizado hamsters, as alterações inflamatórias e na função pulmonar foram semelhantes entre os grupos, independentemente do tipo de cepa que os animais foram infectados (IMAI et al., 2021). Durante a infecção em humanos, a produção de IL-1 por monócitos e macrófagos é maior do que nestas mesmas células em indivíduos saudáveis ou infectados pelo vírus da influenza (MELMS, 2021). A quimiocina MIP-2 ou CXCL-2 é crucial para o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o tecido infectado, células importantes na resposta imune inata contra infecções. Pacientes infectados com SARS-CoV-2 apresentam aumento de CXCL-2 circulante (KHALIL; ELEMAM; MAGHAZACHI, 2021). Durante a infecção pelo vírus H1N1 a produção de CXCL-2 é garantida pelas células epiteliais e macrófagos dos compartimentos alveolar e intersticial (GRÉGOIRE et al., 2007). Tanto na infecção por influenza A, quanto por SARS-CoV-2, as células NK parecem ter papel importante no recrutamento de neutrófilos e macrófagos, via produção das quimiocinas CXCL-1 e CXCL-2 (ALON et al., 2021). Levando em consideração que a variante P.1 apresenta aspectos de antigenicidade diferentes das linhagens originais do SARS-CoV-2, mais estudos são necessários para verificar se isso poderia modificar o reconhecimento de padrões moleculares, de modo a interferir na ativação de vias relacionadas a produção de IL-1 $\beta$  e CXCL-2 (IMAI et al., 2021).

Com relação à expressão de ACE2 humano ao longo do trato intestinal de camundongos K18-hACE2, parece haver certa variabilidade, visto que Winkler e colegas

observaram maior expressão no cólon do que no intestino delgado, enquanto Carossino e colegas verificaram intensa expressão na camada apical da mucosa do intestino delgado e presença rara no cólon. Apesar da discrepância quanto a presença do receptor utilizado pelo vírus para adentrar as células do hospedeiro, a carga viral intestinal neste modelo animal foi baixa, comparada a outros órgãos extrapulmonares, e não foram observadas alterações morfológicas (HASSAN et al., 2020; MOREAU et al., 2020). Evidências histopatológicas de inflamação endotelial difusa na submucosa do intestino delgado de pacientes com Covid-19, bem como isquemia no mesentérico sugerem dano microvascular no intestino delgado de pacientes com Covid-19 grave (VARGA et al., 2020).

A infecção pela variante P.1 aumentou as concentrações da citocina IL-6 no cólon. Esta citocina foi encontrada em concentração duas vezes maior no cólon de animais infectados com P.1 em comparação às concentrações no cólon após infecção com SARS-CoV-2 original. A IL-6 participa da regulação/renovação de células intestinais em condições de homeostase, na qual atua de maneira autócrina entre células tronco via sinalização Wnt (GUO et al., 2020b). Além disso, a microbiota intestinal, mais precisamente *Bacteroidales*, parece ter papel regulador na produção de IL-6 por linfócitos intraepiteliais com receptor T beta (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>), via ativação de Myd88, de maneira a contribuir para regulação de componentes do muco e proteínas de junção (KUHN et al., 2018). Contudo, em condições patológicas, a IL-6 pode contribuir para a redução do controle de permeabilidade intestinal, por aumentar a expressão de claudina-2, proteína de membrana responsável por formar canais paracelulares envolvidos na passagem de água e cátions (SUZUKI; YOSHINAGA; TANABE, 2011). Diferentes células podem estar envolvidas na produção da IL-6 no intestino, como por exemplo, monócitos, macrófagos, linfócitos TCD4<sup>+</sup>, células dendríticas do tipo CD103<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup> ou células do músculo liso dependendo do tipo de estímulo inflamatório presente (GUO, Y. et al., 2020). Considerando o descrito por Kuhn e colegas, e a ausência de infiltrado inflamatório na mucosa intestinal dos animais infectados no presente estudo, é possível que haja relação entre as alterações apresentadas exclusivamente pelos animais infectados com a variante P.1, como alteração da microbiota intestinal, com o aumento de IL-6 no cólon e redução de componentes de controle de permeabilidade intestinal. Mais estudos são necessários para testar essa hipótese de relação entre composição e função da microbiota intestinal, produção de IL-6 e controle de permeabilidade intestinal durante infecções virais respiratórias.

A redução da expressão gênica de ocludina e aumento da claudina-1 durante infecção pela P.1 são evidências de um possível comprometimento de controle de barreira intestinal. Em estudo recente, pesquisadores observaram que pacientes que desenvolveram a forma grave da

COVID-19 apresentaram aumento de marcadores associados à perda de permeabilidade intestinal no início da doença (GIRON et al., 2021). Essas alterações ocorreram de modo independente de dano no epitélio intestinal e os autores sugerem o uso desses marcadores para predição de risco (GIRON et al., 2021). Vale ressaltar ainda que há evidências de que a disbiose do microbioma intestinal, a qual pode contribuir para a mudança de permeabilidade intestinal, está associada à translocação de bactérias para o sangue durante o COVID-19, causando infecções secundárias (BERNARD-RAICHON et al., 2022).

A redução da diversidade bem como alterações na abundância da família *Akkermansiaceae* tem sido reportados em análises da microbiota de pacientes com COVID-19 e em modelo de infecção com camundongo K18-hACE2 (BERNARD-RAICHON et al., 2022; SEIBERT et al., 2021). Camundongos não vacinados também apresentaram maior abundância de *Akkermansia* quando comparados ao grupo vacinado (CAO et al., 2021). A *Akkermansiaceae* pertence ao filo *Verrucomicrobia* e é possível que este aumento esteja relacionado com as alterações no número de células caliciformes, como foi observado no trabalho de Raichon e colegas. Tem sido documentado o papel da *Akkermansia muciniphila* na manutenção da integridade da barreira intestinal, modulação da resposta imune do hospedeiro e melhoria de várias vias metabólicas (CANI; DE VOS, 2017; PELLEGRINO et al., 2023). Entretanto, ainda não são claros os mecanismos por trás do aumento de *Akkermansia* induzido pela infecção com SARS-CoV-2. Seria esta uma resposta frente a disbiose? Uma tentativa de restabelecer a homeostase, principalmente com relação a proteção de barreira do epitélio intestinal?

Em conjunto, os dados do presente trabalho apontam diferenças na doença induzida pela variante P.1 em camundongos em relação à infecção por B.1. Estas podem ter conexão com a infecção neurológica grave, disbiose e alterações em componentes da barreira epitelial intestinal. Futuras investigações se fazem necessárias para explorar o eixo microbiota intestinal-cérebro durante a COVID-19 (Figura 19).

## **5.6. Conclusão**

A infecção com a variante gama em camundongos K18-hACE2 induziu alterações em componentes da barreira intestinal e na composição da microbiota que podem estar relacionadas com a maior letalidade observada durante a infecção em comparação com a cepa original B.1.

## CAPÍTULO 6 – DISCUSSÃO GERAL E PERSPECTIVAS

### 6.1. Qual a relevância dos ácidos graxos de cadeia curta durante a infecção por SARS- Cov-2?

Estudos pré-clínicos têm apontado efeitos positivos da suplementação de AGCC via oral ou do consumo de dieta rica em fibras no controle de infecções virais respiratórias. A suplementação com acetato ou dieta rica em celulose e pectina protegeu camundongos da infecção pelo Vírus sincicial respiratório, via ativação do receptor FFAR2 (*Free fatty acid receptor 2*) e produção de IFN- $\beta$  por células epiteliais pulmonares (ANTUNES et al., 2019). O tratamento com acetato durante a infecção por influenza protegeu os animais de infecção secundária bacteriana, reduzindo a carga bacteriana e inflamação pulmonar, além de ter reduzido também a mortalidade comparada ao grupo controle (SENCIO; MACHADO; TROTTEIN, 2021). Dieta rica em inulina ou o tratamento com butirato reduziu a infecção por influenza em camundongos, por modular a resposta de macrófagos e neutrófilos de maneira a promover a resolução da doença com menores danos ao tecido pulmonar (TROMPETTE et al., 2018).

No presente estudo, o tratamento com a mistura de acetato, propionato e butirato reduziu os níveis de transcrição de genes importantes para a detecção de moléculas virais, controle da entrada e replicação viral, como RIG1, TMPRSS2 e o receptor de IFN- $\lambda$ . Contudo, não alterou a carga viral das biópsias intestinais nem das células epiteliais intestinais. Apesar das limitações do trabalho como o pequeno tamanho das amostras e a falta de biópsias intestinais de pacientes com COVID-19, vale ressaltar que o uso de amostras humanas de pacientes não infectados foi relevante para estabelecer um potencial papel dos AGCC no primeiro ano da pandemia e não exclui a possibilidade de que os AGCC tenham um efeito significativo na infecção por SARS-CoV-2, principalmente, se aplicados em modelo *in vivo*. Brown e colegas ao avaliarem os efeitos do tratamento com AGCC por 14 dias antes da infecção, em diferentes modelos de roedores que foram infectados com pseudo vírus do SARS-CoV-2 ou pela Variante gama verificaram redução da carga viral nas vias aéreas e no intestino (BROWN et al., 2022). O efeito observado foi relacionado a regulação negativa da expressão do receptor ACE2 e melhora na função de imunidade adaptativa via receptores FFAR2 e FFAR3, além de descreverem uma nova função reguladora dos AGCC na resposta de coagulação sistêmica via regulação da proliferação de megacariócitos e renovação de plaquetas (BROWN et al., 2022).

Pacientes que recebem transplante alogênico de células-tronco hematopoiéticas durante tratamento de malignidades hematológicas apresentam maior risco de desenvolver doenças

respiratórias virais durante os primeiros meses após o transplante (SAHIN et al., 2016). Em estudo que avaliou a microbiota intestinal de pacientes que receberam transplante alogênico de células-tronco, observaram que os indivíduos com maior abundância de bactérias produtoras de butirato tiveram cinco vezes menos probabilidade de desenvolver infecções respiratórias (HAAK et al., 2018).

Em um estudo randomizado controlado por placebo com pacientes COVID-19, avaliaram a eficácia da suplementação com cápsulas simbióticas contendo *Lactobacillus (L.) rhamnosus*, *L. helveticus*, *L. casei*, *Bifidobacterium (B.) lactis*, *L. acidophilus*, *B. breve*, *L. bulgaricus*, *B. longum*, *L. plantarum*, *B. bifidum*, *L. gasseri* e *Streptococcus (S.) thermophilus* ( $10^9$  UFC), e frutooligosacarídeos (VAEZI et al., 2023). Foi observado que a terapia adjuvante simbiótica por 2 semanas pode ser eficaz para modular as respostas inflamatórias contra a infecção por COVID-19, de acordo com os níveis séricos de IL-6 (VAEZI, et al., 2023). Os principais efeitos observados do tratamento com probióticos foram a redução de sintomas clínicos como fadiga, disfunção olfatória e falta de ar, náusea e vômitos e outros sintomas gastrointestinais, além de redução da duração da doença (XAVIER-SANTOS et al., 2022).

Considerando a limitação da aplicação desse tipo de tratamento adjunto com probióticos em pacientes imunocomprometidos ou em uso de corticosteróides durante a fase aguda da infecção (XAVIER-SANTOS et al., 2022), além da evidente participação da microbiota intestinal em pacientes com complicações de longo prazo do COVID-19 (LIU et al., 2021), ressaltam a importância de aprofundar a compreensão dos aspectos ecológicos e metabólicos da microbiota intestinal frente a infecção pelo SARS-CoV 2. Portanto, se fazem necessários estudos que caracterizem esses aspectos a curto e longo prazo da infecção para garantir o aperfeiçoamento dos alvos terapêuticos.

## 6.2. Impacto da microbiota intestinal na patogênese da COVID-19: quais modelos experimentais utilizar?

O tratamento com antibióticos prejudica as respostas antivirais, tornando os camundongos mais suscetíveis à infecção por vírus respiratórios como influenza (ICHINOHE et al., 2014), vírus sincicial (DESSEIN et al., 2020) e outros tipo como vírus do Nilo Ocidental (WNV), Dengue e Zika (THACKRAY et al., 2018). Em um estudo de março de 2023, identificaram entre pacientes com COVID-19 leve a moderada, apresentaram maior carga bacteriana nas vias aéreas superiores, além de uma maior prevalência de genes de resistência antimicrobiana (MAHMUD et al., 2023). Os pesquisadores sugerem que automedicação com antibióticos combinada com prescrição excessiva pode estar contribuindo para o aumento da ocorrência de bactérias resistentes a antimicrobianos e que pessoas infectadas com SARS-CoV-2 correm maior risco de adquirir uma infecção secundária, o que seria difícil de tratar se os organismos infectantes tivessem um perfil de resistência a múltiplas drogas (MAHMUD et al., 2023).

Observamos que a depleção aguda da microbiota por antibióticos orais não teve impacto na mortalidade por SARS-CoV-2 em camundongos fêmeas que expressam o receptor ACE2 humano sob controle do promotor da citoqueratina-18 (K18-hACE 2). Contudo, a evolução da doença seguiu o mesmo curso de outros trabalhos que utilizaram o mesmo modelo experimental, onde camundongos infectados com  $5 \times 10^4$  CFUs começaram a sucumbir em 7-8 dias após a infecção e apenas 20% sobreviveram até o 12º dia (DONG et al., 2022; FUMAGALLI et al., 2022; YINDA et al., 2021). Apesar de não haver impacto significativo na sobrevivência, observamos que os camundongos tratados com antibióticos tiveram uma deterioração menos intensa dos sinais clínicos em comparação com os camundongos controle. Brow e colaboradores, apesar de não terem infectado animais após o uso crônico de Vancomicina, eles observaram que a antibioticoterapia reduziu drasticamente a abundância da espécie *Clostridia* e as concentrações de AGCC. Interessantemente, essas alterações causadas pelo antibiótico impactaram no aumento da expressão do ACE 2 principalmente no intestino, o que também foi observado em animais *Germ-free*. Desta forma, é possível que a cronicidade de um perfil disbiótico induzido pelo uso de antibiótico possa ter maiores impactos no desfecho da infecção por SARS CoV 2, comparado a um período mais curto.

Vários aspectos ainda precisam ser investigados no contexto do eixo intestino-pulmão durante a infecção por SARS-CoV-2. Por exemplo, a disbiose intestinal SARS-CoV-2 é secundária à inflamação sistêmica ou é um efeito direto do vírus nas células epiteliais intestinais, afetando assim a interação entre elas (e células imunes) e os componentes da

microbiota? Duas outras questões importantes que precisam ser abordadas neste contexto são (1) se a microbiota disbiótica associada a indivíduos diabéticos e obesos desempenha um papel neste processo e (2) se as intervenções dietéticas que são conhecidas por afetar a composição e função da microbiota podem ter impacto na progressão da doença. Muitas estratégias dietéticas que permitem verificar o papel da microbiota na regulação do sistema imunológico durante doenças respiratórias, como terapia probiótica (GARCIA-CASTILLO et al., 2020; HU et al., 2021c; SAGAR et al., 2014), transplante de microbiota intestinal (JANG et al., 2021), uso de fibras alimentares fermentáveis (prebióticos) (JANG et al., 2020, 2021; TROMPETTE et al., 2018) ou por meio de suplementação com compostos do metabolismo bacteriano (por exemplo, SCFAs) (ANTUNES et al., 2019; JANG et al., 2020; TROMPETTE et al., 2018) podem ser avaliados em estudos futuros sobre SARS-CoV-2. Com base nas limitações do presente estudo, podemos apontar estratégias experimentais que podem contribuir para maiores respostas em trabalhos futuros, como por exemplo, avaliar efeito da antibioticoterapia durante o curso da infecção ou tratamento com regimes de antibióticos mais potentes e comumente usados em pacientes com COVID-19, como a azitromicina. Além disso, verificar o efeito sob a composição da microbiota e permeabilidade intestinal durante infecção por outras variantes de preocupação do SARS-CoV-2 e em outros modelos animais como hamster, poderia ajudar a completar as respostas sobre o papel da microbiota durante a COVID-19.

### 6.3. Conclusão

Na primeira publicação, foi demonstrado que o tratamento com mix de AGCC apesar de reduzir a expressão de proteínas importantes para a entrada do vírus na célula hospedeira, não impactou na carga viral. Em trabalho posterior, verificamos que a depleção da microbiota intestinal por tratamento agudo com uma ampla gama de antibióticos orais não alterou a sobrevivência e teve apenas efeitos menores na resposta imune ao SARS-CoV-2 em camundongos K18-ACE2. E por fim, a infecção pela variante gama em K18-hACE2 induziu alterações em componentes da barreira intestinal e composição da microbiota que hipotetizamos estarem relacionadas com a maior gravidade e infecção neurológica pelo vírus. O presente estudo contribuiu com informações importantes sobre o papel da microbiota intestinal frente à COVID-19, e indica possível conexão entre o eixo cérebro-intestino durante infecção grave induzida pela variante gama em modelo murino.

## PRODUÇÕES DURANTE O DOUTORADO

1. Artigos originais com autoria de destaque (co-primeira ou primeira autora)
  - PASCOAL, Livia Bitencourt; RODRIGUES, Patrícia Brito et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1-9, 2021.
  - RODRIGUES, Patrícia Brito et al. Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE 2 Mice. **Cells**, v. 11, n. 16, p. 2572, 2022.
  
2. Artigo de coautoria
  - BOGARD, Gemma et al. "SARS-CoV-2 infection induces persistent adipose tissue damage in aged golden Syrian hamsters." **Cell death & disease** vol. 14,2 75. 1 Feb. 2023, doi:10.1038/s41419-023-05574-w.
  - TOBAR, Natália et al. Metformin acts in the gut and induces gut-liver crosstalk. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 120, n. 4, p. e2211933120, 2023.
  - CRUNFLI, Fernanda et al. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 35, p. e2200960119, 2022.
  - BRUNETTI, Natália S. et al. SARS-CoV-2 Uses CD4 to Infect T Helper Lymphocytes. **medRxiv**, p. 2020.09. 25.20200329, 2020.
  - FACHI, José Luís et al. Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 2020.
  
3. Patente
  - Trottein, François; De Rezende Rodovalho, Vinícius; Vinolo, M. A. R.; Sencio, Valentin; Rodrigues, P. B.; Heumel, S., 2023. "Indole-3-Propionic Acid As An Important Contributor To Viral Infection Outcomes And A Biomarker Of Viral Infection Severity". Número do registro: 23305245.5.

#### 4. Capítulo de livro

- RODRIGUES, Patrícia Brito et al. Intestinal Microbiota in the SARS-CoV-2 Infection: What Is Known?. **Identification of Biomarkers, New Treatments, and Vaccines for COVID-19**, p. 93-106, 2021.
- FERNANDES, Mariane Font et al. Effect of short chain fatty acids on age-related disorders. **Reviews on New Drug Targets in Age-Related Disorders**, p. 85-105, 2020.

#### 5. Apresentação oral em conferências

- Cell Symposia: Infection Biology in the Age of the Microbiome. June 7-9, 2023, Paris, France
- Annual Meetings of the French Society for Immunology (SFI) and the French Cytometry Association (AFC) (SFI-AFC 2022). 2022. (Congress).
- IV GBMeeting: Meeting of Graduate Studies in Genetics and Molecular Biology. 2022. (Meeting).
- 41st Congress of the Society of Cardiology of the State of São Paulo. Nutrition Symposium - Talk show: Possible cardioprotective effects of diet in patients with covid 19. 2021. (Symposium).
- II GBMeeting: Postgraduate Meeting in Genetics and Molecular Biology. 2020. (Meeting).

#### 6. Apresentação de pôster em conferências

- Cell Symposia: Infection biology in the age of the microbiome, France. (2023)
- XXXII Brazilian Congress of Virology. 2021. (Congress).
- FIFTH INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON INFLAMMATORY DISEASES - INFLAMMA V. 2019. (Symposium)
- XLIV Congress of the Brazilian Society of Immunology. 2019.

#### 7. Premiações

- 2nd place in the oral presentation category, IV GBMeeting: Meeting of the Graduate Program in Genetics and Molecular Biology (2022).
- Honorable Mention of the scientific dissemination contest - Video "Importance of the vaccine in the pandemic", III GBmeeting - Postgraduate in Genetics and Molecular Biology (Unicamp) (2021)

## REFERÊNCIAS

- AHLAWAT, S.; ASHA; SHARMA, K. K.  
<https://www.mendeley.com/reference-manager/library/all-references/>. *Virus Research*, v. 286, n. January, 2020.
- AKRAM, A.; MANNAN, N. Bangladesh Journal of Infectious Diseases Molecular Structure , Pathogenesis and Virology of SARS-CoV-2 : A Review. **J Infect Dis**, v. 7, n. July 2003, p. 536–540, 2020.
- ALBERCA, G. G. F. et al. Coronavirus disease-2019 and the intestinal tract: An overview. **World Journal of Gastroenterology**, v. 27, n. 13, p. 1255–1266, 2021.
- ALBRECHT, D. Vaccination, politics and COVID-19 impacts. **BMC Public Health**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2022.
- ALON, R. et al. Leukocyte trafficking to the lungs and beyond: lessons from influenza for COVID-19. **Nature Reviews Immunology**, v. 21, n. 1, p. 49–64, 2021.
- ALWINE, J. C. et al. A critical analysis of the evidence for the SARS-CoV-2 origin hypotheses. **Journal of Virology**, 27 abr. 2023.
- AMORIM, M. R. et al. Respiratory viral shedding in healthcare workers reinfected with SARS-CoV-2, Brazil, 2020. **Emerging Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 1737–1740, 2021.
- ANAND, S.; MANDE, S. S. Diet, microbiota and gut-lung connection. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. SEP, 2018.
- ANTUNES, K. H. et al. Microbiota-derived acetate protects against respiratory syncytial virus infection through a GPR43-type 1 interferon response. **Nature Communications**, v. 10, n. 1, p. 1–17, 2019.
- ARABI, Y. M. et al. Europe PMC Funders Group Middle East Respiratory Syndrome. v. 376, n. 6, p. 584–594, 2017.
- ARCE, V. M.; COSTOYA, J. A. SARS-CoV-2 infection in K18-ACE2 transgenic mice replicates human pulmonary disease in COVID-19. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 18, n. 3, p. 513–514, 2021.
- AUTHOR, F.; LEIDY, J. **Morphology of the Bacteria (Vibrio and Spirillum), an Early Research.--The Intestinal Flora**Source: Science. [s.l: s.n.].
- AZKUR, A. K. et al. Immune response to SARS-CoV-2 and mechanisms of immunopathological changes in COVID-19. **Allergy: European Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 75, n. 7, p. 1564–1581, 2020.

- BAGGEN, Jim et al. Cellular host factors for SARS-CoV-2 infection. **Nature microbiology**, v. 6, n. 10, p. 1219-1232, 2021.
- BALAPHAS, A. et al. Abdominal pain patterns during COVID-19: an observational study. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, 1 dez. 2022.
- BANHO, C. A. et al. Impact of SARS-CoV-2 Gamma lineage introduction and COVID-19 vaccination on the epidemiological landscape of a Brazilian city. **Communications Medicine**, v. 2, n. 1, 13 abr. 2022.
- BERG, G. et al. **Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges**. **Microbiome** BioMed Central Ltd, , 30 jun. 2020.
- BERGEN, N. et al. Global state of education-related inequality in COVID-19 vaccine coverage, structural barriers, vaccine hesitancy, and vaccine refusal: findings from the Global COVID-19 Trends and Impact Survey. **The Lancet Global Health**, v. 11, n. 2, p. e207–e217, 1 fev. 2023.
- BROWN, J. A. et al. Gut microbiota-derived metabolites confer protection against SARS-CoV-2 infection. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, 2022.
- BUDDEN, K. F. et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut-lung axis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 1, p. 55–63, 2017.
- BYNDLOSS, M. X.; BÄUMLER, A. J. **The germ-organ theory of non-communicable diseases**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 2018.
- CAMPBELL, C. et al. **Crosstalk between Gut Microbiota and Host Immunity: Impact on Inflammation and Immunotherapy**. **Biomedicine** MDPI, , 1 fev. 2023.
- CANI, P. D. et al. Involvement of gut microbiota in the development of low-grade inflammation and type 2 diabetes associated with obesity © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute © 2012 Landes Bioscience . Do not distribute. n. August, p. 279–288, 2012.
- CANI, P. D.; DE VOS, W. M. **Next-generation beneficial microbes: The case of Akkermansia muciniphila**. **Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 22 set. 2017.
- CARLSON, J. L. et al. **Health effects and sources of prebiotic dietary fiber**. **Current Developments in Nutrition** Oxford University Press, , 1 mar. 2018.
- CDC. Center for Diseases Control and Prevention. (2021) Scientific Brief: SARS CoV-2 Transmission. <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/science/science-briefs/SARS-CoV-2-transmission.html>> Acesso em 28 de julho de 2021.
- CHEMUDUPATI, M. et al. Butyrate Reprograms Expression of Specific Interferon-Stimulated Genes. **Journal of Virology**, v. 94, n. 16, 30 jul. 2020.
- CHEN, K. et al. Sars-cov-2 nucleocapsid protein interacts with rig-i and represses rig-mediated ifn- $\beta$  production. **Viruses**, v. 13, n. 1, p. 1–15, 2021.

- CHOW, Y. et al. Development of an epithelium-specific expression cassette with human DNA regulatory elements for transgene expression in lung airways (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transgenic mice intron enhancer cell specificity secreted alkaline phosphatase) **Medical Sciences**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[www.pnas.org](http://www.pnas.org)>.
- CHU, D.; WEI, L. Nonsynonymous, synonymous and nonsense mutations in human cancer-related genes undergo stronger purifying selections than expectation. **BMC Cancer**, v. 19, n. 1, 16 abr. 2019.
- CORRÊA, R. O. et al. **Butyrate: Connecting the gut-lung axis to the management of pulmonary disorders**. **Frontiers in Nutrition** Frontiers Media S.A., , 20 out. 2022.
- CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. Regulation of immune cell function by short-chain fatty acids. **Clinical and Translational Immunology**, v. 5, n. 4, p. 1–8, 2016.
- CYPRIAN, F. et al. SARS-CoV-2 and immune-microbiome interactions: Lessons from respiratory viral infections. **International Journal of Infectious Diseases** Elsevier B.V., , 1 abr. 2021.
- DANG, A. T.; MARSLAND, B. J. Microbes, metabolites, and the gut–lung axis. **Mucosal Immunology**, v. 12, n. 4, p. 843–850, 2019.
- DE MELO, Guilherme Dias et al. Neuroinvasion and anosmia are independent phenomena upon infection with SARS-CoV-2 and its variants. **Nature communications**, v. 14, n. 1, p. 4485, 2023.
- DE OLIVEIRA, G. L. V. et al. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. February, 2021.
- DE SOUZA, W. M. et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856–865, 1 ago. 2020.
- DESSEIN, R. et al. Antibiotic-related gut dysbiosis induces lung immunodepression and worsens lung infection in mice. **Critical Care**, v. 24, n. 1, 1 dez. 2020.
- DHAR CHOWDHURY, S.; OOMMEN, A. M. Epidemiology of COVID-19. **Journal of Digestive Endoscopy**, v. 11, n. 01, p. 03–07, mar. 2020.
- DIAO, B. et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. May, p. 1–7, 2020.
- DONALDSON, G. P.; LEE, S. M.; MAZMANIAN, S. K. **Gut biogeography of the bacterial microbiota**. **Nature Reviews Microbiology** Nature Publishing Group, , 16 dez. 2015.
- DONG, W. et al. The K18-Human ACE2 Transgenic Mouse Model Recapitulates Non-severe and Severe COVID-19 in Response to an Infectious Dose of the SARS-CoV-2 Virus. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.worldometers.info/coronavirus/>>.
- EURIDES, G.; MARQUES, C. **A Extensão Universitária no Cenário Atual da Pandemia do COVID-19**. [s.l.: s.n.].

- EVERARD, A.; CANI, P. D. **Diabetes, obesity and gut microbiota. Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology** Bailliere Tindall Ltd, , 2013.
- FACHI, J. L. et al. Acetate coordinates neutrophil and ILC3 responses against *C. difficile* through FFAR2. **Journal of Experimental Medicine**, v. 217, n. 3, 2 mar. 2020.
- FARHART, C. E. et al. Vax attacks: How conspiracy theory belief undermines vaccine support. Em: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Elsevier B.V., 2022. v. 188p. 135–169.
- FARIA, Nuno R. et al. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. **Virological**, v. 372, p. 815-821, 2021a.
- FARIA, N. R. et al. **Genomics and epidemiology of the P.1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil** *Méodie Monod*. 72,815-821(2021b).DOI:10.1126/science.abh2644.
- FERREIRA, C. M. et al. **The Central Role of the Gut Microbiota in Chronic Inflammatory Diseases. Journal of Immunology Research** Hindawi Limited, , 18 set. 2014.
- FLINT, H. J. et al. **Microbial degradation of complex carbohydrates in the gut. Gut Microbes**, jul. 2012.
- FUJINO, T. et al. Novel SARS-CoV-2 Variant in Travelers from Brazil to Japan. **Emerging infectious diseases**, v. 27, n. 4, p. 1243–1245, 2021.
- FUMAGALLI, V. et al. **Administration of aerosolized SARS-CoV-2 to K18-hACE 2 mice uncouples respiratory infection from fatal neuroinvasion** *Sci. Immunol.* [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.science.org>>.
- FUNK, T. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 variants of concern countries , weeks 38 / 2020 to 10 / 2021. **Eurosurveillance**, v. 26, n. 16, p. 1–10, 2021.
- FUZIO, D. et al. Inflammation as Prognostic Hallmark of Clinical Outcome in Patients with SARS-CoV-2 Infection. **Life**, v. 13, n. 2, 1 fev. 2023.
- GARCIA-CASTILLO, V. et al. Alveolar Macrophages Are Key Players in the Modulation of the Respiratory Antiviral Immunity Induced by Orally Administered *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 29 set. 2020.
- GOMES NAVECA, F. et al. **Spread of Gamma (P.1) Sub-Lineages Carrying Spike Mutations Close to the Furin Cleavage Site and Deletions in the N-Terminal Domain Drives Ongoing Transmission of SARS-CoV-2 in Amazonas, Brazil on behalf of Fiocruz COVID-19 Genomic Surveillance Network**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://info.gripe.fiocruz.br>>.
- GÓMEZ, C. E.; PERDIGUERO, B.; ESTEBAN, M. Emerging sars-cov-2 variants and impact in global vaccination programs against sars-cov-2/covid-19. **Vaccines**, v. 9, n. 3, p. 1–13, 2021.

- GRICE, E. A.; SEGRE, J. A. **The human microbiome: Our second genome. Annual Review of Genomics and Human Genetics**, set. 2012.
- GUPTA, A. et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 26, n. 7, p. 1017–1032, 2020.
- HAAK, B. W. et al. **Impact of gut colonization with butyrate-producing microbiota on respiratory viral infection following allo-HCT**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://ashpublications.org/blood/article-pdf/131/26/2978/1465991/blood828996.pdf>>.
- HAHN, G. et al. Genome-wide association analysis of COVID-19 mortality risk in SARS-CoV-2 genomes identifies mutation in the SARS-CoV-2 spike protein that colocalizes with P.1 of the Brazilian strain. **Genetic Epidemiology**, n. May, p. 1–9, 2021.
- HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409–424, 2021.
- HASSAN, A. O. et al. A SARS-CoV-2 Infection Model in Mice Demonstrates Protection by Neutralizing Antibodies. **Cell**, v. 182, n. 3, p. 744- 753.e4, 6 ago. 2020.
- HORSPOOL, A. M. et al. SARS-CoV-2 B.1.1.7 and B.1.351 variants of concern induce lethal disease in K18-hACE 2 transgenic mice despite convalescent plasma therapy. **bioRxiv : the preprint server for biology**, 5 maio 2021.
- HOU, K. et al. **Microbiota in health and diseases. Signal Transduction and Targeted Therapy** Springer Nature, , 1 dez. 2022.
- HU, X. et al. Akkermansia muciniphila Improves Host Defense Against Influenza Virus Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2 fev. 2021a.
- HU, X. et al. Akkermansia muciniphila Improves Host Defense Against Influenza Virus Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2 fev. 2021b.
- HU, X. et al. Akkermansia muciniphila Improves Host Defense Against Influenza Virus Infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2 fev. 2021c.
- ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract influenza A virus infection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 108, n. 13, p. 5354–5359, 2011.
- ICHINOHE, T. et al. Microbiota regulates immune defense against respiratory tract in influenza A virus infection - Supporting Information. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. Lcmv, p. 31–42, 2014.
- IMAI, M. et al. Characterization of a new SARS-CoV-2 variant that emerged in Brazil. v. 118, n. 27, p. 1–9, 2021.

- JAIN, V.; YUAN, J. M. **Predictive symptoms and comorbidities for severe COVID-19 and intensive care unit admission: a systematic review and meta-analysis.** *International Journal of Public Health* Springer, , 1 jun. 2020.
- JANG, Y. O. et al. Fecal microbial transplantation and a high fiber diet attenuates emphysema development by suppressing inflammation and apoptosis. **Experimental and Molecular Medicine**, v. 52, n. 7, p. 1128–1139, 2020.
- JANG, Y. O. et al. High-fiber diets attenuate emphysema development via modulation of gut microbiota and metabolism. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021.
- JONES, J. M. CODEX-aligned dietary fiber definitions help to bridge the “fiber gap”. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 1, 12 abr. 2014.
- KHALIL, B. A.; ELEMAM, N. M.; MAGHAZACHI, A. A. Chemokines and chemokine receptors during COVID-19 infection. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 19, p. 976–988, 2021.
- KIM, Y. C.; DEMA, B.; REYES-SANDOVAL, A. **COVID-19 vaccines: breaking record times to first-in-human trials.** *npj Vaccines* Nature Research, , 1 dez. 2020.
- KODIO, A.; MENU, E.; RANQUE, S. Eukaryotic and prokaryotic microbiota interactions. **Microorganisms**. MDPI AG, , 1 dez. 2020.
- KUMARI, P. et al. Neuroinvasion and encephalitis following intranasal inoculation of sars-cov-2 in K18-hACE 2 mice. **Viruses**, v. 13, n. 1, 2021.
- KUHN, K. A. et al. “Bacteroidales recruit IL-6-producing intraepithelial lymphocytes in the colon to promote barrier integrity.” **Mucosal immunology** vol. 11,2 (2018): 357-368.  
doi:10.1038/mi.2017.55.
- LAMERS, M. M. et al. SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. **bioRxiv**, v. 3, n. July, p. 50–54, 2020.
- LAN, T. C. T. et al. Secondary structural ensembles of the SARS-CoV-2 RNA genome in infected cells. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, 1 dez. 2022.
- LI, J. et al. Butyrate Regulates COVID-19-Relevant Genes in Gut Epithelial Organoids From Normotensive Rats. **Hypertension** Lippincott Williams and Wilkins, , 1 fev. 2021a.
- LI, S. et al. SARS-CoV-2: Mechanism of infection and emerging technologies for future prospects. **Reviews in Medical Virology**, v. 31, n. 2, 2021b.
- LIN, L. et al. Gastrointestinal symptoms of 95 cases with SARS-CoV-2 infection. **Gut**, v. 69, n. 6, p. 997–1001, 1 jun. 2020.
- LIU, B. N. et al. Gut microbiota in obesity. **World Journal of Gastroenterology** Baishideng Publishing Group Inc, , 7 jul. 2021.

- LIU, Q. et al. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. **Gut**, 2022.
- LOW, D. Y. et al. **Regional Diets Targeting Gut Microbial Dynamics to Support Prolonged Healthspan. Frontiers in Microbiology** Frontiers Media S.A., , 29 abr. 2021.
- LUCAS, C. et al. Longitudinal analyses reveal immunological misfiring in severe COVID-19. **Nature**, v. 584, n. 7821, p. 463–469, 2020.
- LUTZ, C. et al. COVID-19 preclinical models : human transgenic mice. p. 1–11, 2020.
- MAHMUD, A. SAYEED. M. et al. A multicentre study reveals dysbiosis in the microbial co-infection and antimicrobial resistance gene profile in the nasopharynx of COVID-19 patients. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, 13 mar. 2023.
- MAO, T. et al. against acute and chronic SARS-CoV-2 infection in mice. v. 14, 2021.
- MARIANO, G. et al. Structural Characterization of SARS-CoV-2: Where We Are, and Where We Need to Be. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. December, 2020.
- MARSLAND, B. J.; TROMPETTE, A.; GOLLWITZER, E. S. The gut-lung axis in respiratory disease. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 12, n. November, p. S150–S156, 2015.
- MCCRAY, P. B. et al. Lethal Infection of K18- hACE2 Mice Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus . **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 813–821, 15 jan. 2007.
- MELMS, J. C. A molecular single-cell lung atlas of lethal COVID-19. **Nature**, v. 595, n. July, 2021.
- MONTAGUTELLI, Xavier et al. The B1. 351 and P. 1 variants extend SARS-CoV-2 host range to mice. **BioRxiv** [Preprint], v. 13, n. 3, p. 283-298, 2021.
- MOREAU, G. B. et al. Evaluation of K18-hACE 2 Mice as a Model of SARS-CoV-2 Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 1215–1219, 2020.
- MURGOLO, N. et al. SARS-CoV-2 tropism, entry, replication, and propagation: Considerations for drug discovery and development. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 2, p. 1–18, 2021.
- NEVES, T. P. et al. LIGA ACADÊMICA DE SAÚDE E BIOTECNOLOGIALASBTECH NO CONTEXTO DA PANDEMIA (COVID-19). **Vivências**, v. 17, n. 33, p. 9–21, 21 jun. 2021.
- NIH - COVID-19 Treatment Guidelines Panel. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Treatment Guidelines. **National Institutes of Health**. Disponível em <https://www.covid19treatmentguidelines.nih.gov/>. Acesso em 16 de setembro de 2023.
- OECKINGHAUS, A., Hayden, M. & Ghosh, S. Crosstalk in NF-κB signaling pathways. **Nat Immunol** 12, 695–708 (2011). <https://doi.org/10.1038/ni.2065>.
- OLIVA, A. et al. Persistent Systemic Microbial Translocation and Intestinal Damage During Coronavirus Disease-19. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 14 jul. 2021.

- OREN, A.; GARRITY, G. M. Valid publication of the names of forty-two phyla of prokaryotes. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 71, n. 10, 2021.
- O'TOOLE, Á. et al. Tracking the international spread of SARS-CoV-2 lineages B.1.1.7 and B.1.351/501Y-V2. **Wellcome Open Research**, v. 6, 2021.
- PARADA VENEGAS, D. et al. Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. March, p. 277, 2019.
- PARK, Annsea; IWASAKI, Akiko. Type I and type III interferons—induction, signaling, evasion, and application to combat COVID-19. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 870-878, 2020.
- PASCOAL, L. B. et al. Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples. **Gut Microbes**, v. 13, n. 1, p. 1–9, 2021.
- PEIRIS, J. S. M.; GUAN, Y.; YUEN, K. Y. **Severe acute respiratory syndrome. Nature Medicine**, 2004.
- PHO (2021). June 2021: Updates to COVID-19 Variants: Terminology, Laboratory Testing and Reporting COVID-19. 19 June 2021. Disponível em:.. Acesso em 05 de agosto de 2021.
- PINART, M. et al. **Gut microbiome composition in obese and non-obese persons: A systematic review and meta-analysis. Nutrients MDPI**, 1 jan. 2022.
- PRATES, A. E. T. et al. Functional Immune Deficiency Syndrome vial Intestinal Infection in COVID-19. 2020.
- QIN, N. et al. Influence of H7N9 virus infection and associated treatment on human gut microbiota. **Scientific Reports**, v. 5, 22 out. 2015.
- REHMAN, Saif Ur et al. "Evolutionary Trajectory for the Emergence of Novel Coronavirus SARS-CoV-2." **Pathogens (Basel, Switzerland)** vol. 9,3 240. 23 Mar. 2020, doi:10.3390/pathogens9030240.
- RENATO, A. et al. Model-based evaluation of transmissibility and reinfection for the P . 1 variant of the SARS-CoV-2 Summary box What is already known about this topic ? 2021.
- RICARDO, A. et al. The emergence of novel SARS-CoV-2 variant P.1 in Amazonas (Brazil) was temporally associated with a change in the age and sex profile of COVID-19 mortality: A population based ecological study. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 1, p. 100021, 2021.
- RINNINELLA, E. et al. What is the healthy gut microbiota composition? A changing ecosystem across age, environment, diet, and diseases. **Microorganisms**, v. 7, n. 1, 1 jan. 2019.
- ROCCO, P. R. M. et al. Early use of nitazoxanide in mild Covid-19 disease: randomised, placebo-controlled trial. **European Respiratory Journal**, p. 2003725, 2020.

- RODRIGUES, Patrícia Brito et al. "Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE2 Mice." **Cells** vol. 11,16 2572. 18 Aug. 2022, doi:10.3390/cells11162572.
- ROMANO, C. M. et al. Sars-cov-2 reinfection caused by the p.1 lineage in araraquara city, sao paulo state, brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 63, 2021.
- ROSSEELS, Valérie et al. A non-invasive intranasal inoculation technique using isoflurane anesthesia to infect the brain of mice with rabies virus. **Journal of virological methods**, v. 173, n. 1, p. 127-136, 2011.
- SABINO, Ester C. et al. Resurgence of COVID-19 in Manaus, Brazil, despite high seroprevalence. **The Lancet**, v. 397, n. 10273, p. 452-455, 2021.
- SAGAR, S. et al. Bifidobacterium breve and Lactobacillus rhamnosus treatment is as effective as budesonide at reducing inflammation in a murine model for chronic asthma. **Respiratory Research**, v. 15, n. 1, 16 abr. 2014.
- SAHIN, U. et al. **An overview of infectious complications after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.** **Journal of Infection and Chemotherapy** Elsevier B.V., , 1 ago. 2016.
- SALAZAR, N. et al. Age-associated changes in gut microbiota and dietary components related with the immune system in adulthood and old age: A cross-sectional study. **Nutrients**, v. 11, n. 8, p. 1–11, 2019.
- SALMAN, M. K.; MAURIELLO, G. Special Issue "Probiotics and Their Metabolism": Editorial. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 687, 8 mar. 2023.
- SCHIRMER, M. et al. Linking the Human Gut Microbiome to Inflammatory Cytokine Production Capacity. **Cell**, v. 167, n. 4, p. 1125- 1136.e8, 3 nov. 2016.
- SCHNEIDER, T. The holobiont self: understanding immunity in context. **History and Philosophy of the Life Sciences**, v. 43, n. 3, 1 set. 2021.
- SEIBERT, B. et al. Mild and Severe SARS-CoV-2 Infection Induces Respiratory and Intestinal Microbiome Changes in the K18-hACE 2 Transgenic Mouse Model. 2021.
- SENCIO, V.; MACHADO, M. G.; TROTTEIN, F. The lung–gut axis during viral respiratory infections: the impact of gut dysbiosis on secondary disease outcomes. **Mucosal Immunology**, v. 14, n. 2, p. 296–304, 2021.
- SILVAS, J. A. et al. Contribution of SARS-CoV-2 Accessory Proteins to Viral Pathogenicity in K18 Human ACE2 Transgenic Mice. **Journal of Virology**, v. 95, n. 17, 10 ago. 2021.
- SIMON, J. C. et al. Host-microbiota interactions: From holobiont theory to analysis. **Microbiome**, v. 7, n. 1, 11 jan. 2019.

- SWANSON, K. S. et al. **The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of synbiotics.** *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* Nature Research, , 1 nov. 2020.
- TAVARES, N. M. *Imunopatogênese da*. p. 1–28, 2020.
- THACKRAY, L. B. et al. Oral Antibiotic Treatment of Mice Exacerbates the Disease Severity of Multiple Flavivirus Infections. *Cell Reports*, v. 22, n. 13, p. 3440- 3453.e6, 27 mar. 2018.
- THRIENE, K.; MICHELS, K. B. **Human Gut Microbiota Plasticity throughout the Life Course.** *International Journal of Environmental Research and Public Health* MDPI, , 1 jan. 2023.
- TROMPETTE, A. et al. Dietary Fiber Confers Protection against Flu by Shaping Ly6c<sup>+</sup> Patrolling Monocyte Hematopoiesis and CD8<sup>+</sup> T Cell Metabolism. *Immunity*, v. 48, n. 5, p. 992- 1005.e8, 2018.
- VAN DER HEE, B.; WELLS, J. M. **Microbial Regulation of Host Physiology by Short-chain Fatty Acids.** *Trends in Microbiology* Elsevier Ltd, , 1 ago. 2021.
- VAEZI, Mahsa et al. The effect of synbiotic adjunct therapy on clinical and paraclinical outcomes in hospitalized COVID-19 patients: A randomized placebo-controlled trial. *Journal of Medical Virology*, v. 95, n. 2, p. e28463, 2023.
- VARGA, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *The Lancet*, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2020.
- VELAZQUEZ-SALINAS, L. et al. Positive Selection of ORF1ab, ORF3a, and ORF8 Genes Drives the Early Evolutionary Trends of SARS-CoV-2 During the 2020 COVID-19 Pandemic. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 23 out. 2020.
- VENEGAS, D. P. et al. Short Chain Fatty Acids ( SCFAs ) -Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. v. 10, n. March, 2019.
- VIANA, S. D.; NUNES, S.; REIS, F. **ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities – Role of gut microbiota dysbiosis.** *Ageing Research Reviews* Elsevier Ireland Ltd, , 1 set. 2020.
- WANG, P. et al. Increased resistance of SARS-CoV-2 variant P.1 to antibody neutralization. *Cell Host and Microbe*, v. 29, n. 5, p. 747- 751.e4, 12 maio 2021.
- WANG, Dawei et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus–infected pneumonia in Wuhan, China. *Jama*, v. 323, n. 11, p. 1061-1069, 2020.
- WINKLER, E. S. et al. SARS-CoV-2 infection of human ACE2-transgenic mice causes severe lung inflammation and impaired function. *Nature Immunology*, v. 21, n. 11, p. 1327–1335, 2020.
- WHOa - World Health Organization. Naming the coronavirus disease (COVID-2019) and the virus that causes it. <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-t>

[he-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](#). <Acesso em 15 de maio de 2023>.

WHO<sup>b</sup> - WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. <https://covid19.who.int/>. <Acesso em 15 de maio de 2023>.

WHO<sup>c</sup> COVID-19 Weekly Epidemiological Update . <  
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports> > Acesso em 23 de julho de 2021.

WHO<sup>d</sup> COVID-19 Weekly Epidemiological Update . <  
<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus2019/situation-reports> > Acesso em 23 de julho de 2021.

WHO<sup>e</sup>, 2020. Coronavirus disease (COVID-19). Acesso em 02 de agosto de 2021

WHO<sup>f</sup> (2021). Tracking SARS CoV-2 variants. Disponível em: Acesso em 05 de agosto de 2021.

XAVIER-SANTOS, D. et al. **Evidences and perspectives of the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as adjuvants for prevention and treatment of COVID-19: A bibliometric analysis and systematic review. Trends in Food Science and Technology** Elsevier Ltd, , 1 fev. 2022.

XIAO, F. et al. Evidence for Gastrointestinal Infection of SARS-CoV-2. **Gastroenterology**, v. 158, n. 6, p. 1831- 1833.e3, 1 maio 2020.

YAMADA, T. et al. RIG-I triggers a signaling-abortive anti-SARS-CoV-2 defense in human lung cells. **Nature Immunology**, v. 22, n. 7, p. 820–828, 2021.

YAMADA, T., Takaoka, A. Innate immune recognition against SARS-CoV-2. *Inflamm Regen* 43, 7 (2023). <https://doi.org/10.1186/s41232-023-00259-5>

YANG, B. et al. Lactobacillus reuteri FYNLJ109L1 attenuating metabolic syndrome in mice via gut microbiota modulation and alleviating inflammation. **Foods**, v. 10, n. 9, 1 set. 2021.

YANG, X. et al. Ecological change of the gut microbiota during pregnancy and progression to dyslipidemia. **NPJ biofilms and microbiomes**, v. 9, n. 1, p. 14, 1 dez. 2023.

YAP, J. K. Y.; MORIYAMA, M.; IWASAKI, A. Inflammasomes and Pyroptosis as Therapeutic Targets for COVID-19. **The Journal of Immunology**, v. 205, n. 2, p. 307–312, 2020.

YEOH, Y. K. et al. Gut microbiota composition reflects disease severity and dysfunctional immune responses in patients with COVID-19. **Gut**, v. 70, n. 4, p. 698–706, 1 abr. 2021.

YINDA, C. K. et al. K18-hACE 2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 1, p. 1–21, 2021.

- YONKER, L. M. et al. Multisystem inflammatory syndrome in children is driven by zonulin-dependent loss of gut mucosal barrier. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 14, 1 jul. 2021.
- ZHENG, J. et al. COVID-19 treatments and pathogenesis including anosmia in K18-hACE 2 mice. **Nature**, v. 589, n. 7843, p. 603–607, 28 jan. 2021.
- ZHOU, L. et al. SARS-CoV-2 Targets by the pscRNA Profiling of ACE2, TMPRSS2 and Furin Proteases. **iScience**, v. 23, n. 11, p. 101744, 2020.
- ZUO, T. et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. **Gastroenterology**, v. 159, n. 3, p. 944- 955.e8, 1 set. 2020.

## ANEXOS

## Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP

CERTIFICADO CEUA nº 155/2021



### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Comparação do tropismo e patogenicidade da cepa P1 e B1 em camundongos K18 ACE2 humanizado: Papel da microbiota intestinal**, registrada com o nº **5792-1/2021**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Marco Aurélio Ramirez Vinolo e Patrícia Brito Rodrigues, ARILSON BERNARDO DOS SANTOS PEREIRA GOMES, TATIANA DANDOLINI SACCON, Gabriela Fabiano de Sousa, Stefanie Primon Muraro**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em reunião de **17/06/2021**.

Finalidade:	( ) Ensino ( X ) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/08/2021 a 01/08/2023
Vigência da autorização para manipulação animal:	17/06/2021 a 01/08/2023
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas

CERTIFICADO CEUA nº 155/2021

Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo transgênico / K18-hACE2
No. de animais:	12
Idade/Peso:	2.00 Meses / 20.00 Gramas
Sexo:	12 Fêmeas
Origem:	CEMIB
Biotério onde serão mantidos os animais:	Biotério de Camundongos do DGEMI e DBBT/IB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA, SISBIO** ou **CIBio** e é restrita a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, **04 de agosto de 2021**.

Prof. Dr. Wagner José Fávoro  
Presidente

Rosângela dos Santos  
Secretária Executiva

**IMPORTANTE:** Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

**Declaração de direitos autorais****Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **"PAPEL DA MICROBIOTA INTESTINAL NA INFECÇÃO POR SARS-CoV-2"**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 11 de Agosto de 2023.



Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) autor(a): **Patricia Brito Rodrigues**

RG n.º 47.665.130-X

Assinatura : \_\_\_\_\_

Nome do(a) orientador(a): **Marco Aurélio Ramirez Vinolo**

RG n.º 33.269.470-7

## Laudo necropsia animais K18-hACE 2 infectados pela variante P.1



ANÁLISES CLÍNICAS E BANCO  
DE SANGUE VETERINÁRIO

(19) 3291-7771  
(19) 9 9141-0220  
contato@hemoclinpet.com.br  
www.hemoclinpet.com.br  
R Jorge Miranda, 119 - Botafogo  
Campinas-SP CEP: 13020190

Paciente: Rato 1/ P1 - Variante 43 Sexo: F N° Registro.: 0005576  
Espécie.: MUS MUSCULUS Instituição: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP FUNCAMP  
Setor...: IB - UNICAMP Solicitante: PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO

### LAUDO DE NECRÓPSIA

#### MACROSCOPIA:

##### 1. Avaliação externa:

\* Sem particularidades.

##### 2. Avaliação interna:

###### Cabeça e pescoço:

\* Cérebro edemaciado.

###### Cavidade Torácica:

\* Pulmões: Edemaciados com áreas esbranquiçadas.

\* Traquéia/ Esôfago: Externamente sem particularidades.

###### Cavidade abdominal:

\* Coração: Sem particularidades.

\* Fígado/Vesícula biliar/ Pâncreas/Baço: Apresentam alterações necróticas e frequentes áreas em processo de desintegração (pós-mortem?/fixação?).

\* Estômago: Sem particularidades contendo média quantidade de volume líquido.

\* Intestino: Por toda sua extensão apresenta desintegração estrutural que se fez mais presente aos cortes (pós-mortem?/fixação?).

\* Cavidade Peritônea: Sem evidência de ascite.

\* Rins: Edemaciados.

\* Bexiga: Sem particularidades.

#### MICROSCOPIA: Os cortes histológicos mostram:

\* Cérebro: Apresenta hipóxia aguda; hiperemia, edema cerebral e presença de micro trombos subcorticais.

\* Pulmões: Apresentam hiperplasia de pneumócitos; dano alveolar difuso com exsudato, congestão capilar, frequentes áreas com extravazamento de líquido aquoso para o espaço intersticial (edema), abundante reação de fibroblastos com escassa reação inflamatória composta principalmente por linfócitos e raros neutrófilos. Observa-se formação de micro-trombos por todo o parênquima.

\* Coração: Apresenta congestão capilar com formação de trombos e áreas com perda da estriação transversal.

\* Rins: Túbulos apresentando tiroidização, anudeados (necrose tubular aguda) e congestão capilar.

\* Extensa área de necrose no córtex (pós-mortem/fixação).

\* Fígado: Apresenta áreas de congestão capilar com focos de hemorragia e necrose de hepatócitos nos bordos (pós-mortem).

\* Baço: Não definição das polpas branca e vermelha, onde observa-se menor quantidade de glóbulos vermelhos no parênquima.

\* Esôfago e estômago: Sem particularidades.

\* Pâncreas e vesícula biliar: Necrose isquêmica (pós-mortem?/fixação?).

\* Bexiga: Sem particularidades.

Os resultados dos testes laboratoriais sobre a influência de estados fisiológicos, patológicos e uso de medicamentos. Bem como o Médico Veterinário Clínico tem condições de interpretar corretamente estes laudos. O IMANLAS possui uma assessoria científica qualificada para a emissão de resultados com o Médico Veterinário solicitante. A presente análise tem o seu valor restrito à análise entregue ao IMANLAS.

SARA PANERARI  
PATOLOGISTA  
CRMV SP = 30632



ANÁLISES CLÍNICAS E BANCO  
DE SANGUE VETERINÁRIO

(19) 3291-7771  
(19) 9 9141-0220  
contato@hemoclinpet.com.br  
www.hemoclinpet.com.br  
R. Jorge Miranda, 119 - Botafogo  
Campinas-SP CEP: 13020160

Paciente: Rato 1/ P1 - Variante 43 Sexo: F N° Registro.: 0005576  
Espécie.: MUS MUSCULUS Instituição: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP FUNCAMP  
Setor...: IB - UNICAMP Solicitante: PROP. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO

**DIAGNÓSTICO:**

- Pulmão de choque/SARS.
- Edema agudo pulmonar.
- Enfizema pulmonar.
- Necrose tubular aguda.
- CID ( Coagulação intravascular disseminada).

**CAUSA MORTIS:**

- Parada cardiorespiratória.

Os resultados dos testes laboratoriais sofrem influência de estados fisiológicos, patológicos e uso de medicamentos. Somente o Médico Veterinário Clínico tem condições de interpretar corretamente estes laudos. O IMANLAB possui uma assessoria científica qualificada para discussão de resultados com o Médico Veterinário solicitante. A presente análise tem o seu valor restrito à amostra entregue ao IMANLAB.

SARA PANERARI  
PATOLOGISTA  
CRMV SP = 30632



ANÁLISES CLÍNICAS E BANCO  
DE SANGUE VETERINÁRIO

(19) 3291-7771  
(19) 9 9141-0220  
contato@hemoclinpet.com.br  
www.hemoclinpet.com.br  
R. Jorge Miranda, 119 - Botafogo  
Campinas-SP CEP: 13020-190

Paciente: Rato 2/ D1 - Variante 42 SEXO: F N° Registro.: 0005577  
Espécie.: MUS MUSCULUS Instituição: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP FUNCAMP  
Setor...: IB - UNICAMP Solicitante: PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO

## LAUDO DE NECRÓPSIA

### MACROSCOPIA:

#### 1. Avaliação externa:

\* Sem particularidades.

#### 2. Avaliação interna:

##### Cabeça e pescoço:

\* Cérebro edemaciado.

##### Cavidade Torácica:

\* Pulmões: Edemaciados com áreas esbranquiçadas.

\* Traquéia/ Esôfago: Externamente sem particularidades.

##### Cavidade abdominal:

\* Coração: Sem particularidades.

\* Fígado/Vesícula biliar/ Pâncreas/Baço: Apresentam alterações necróticas e frequentes áreas em processo de desintegração (pós-mortem?/fixação?).

\* Estômago: Sem particularidades contendo média quantidade de volume líquido.

\* Intestino: Por toda sua extensão apresenta desintegração estrutural que se fez mais presente aos cortes (pós-mortem?/fixação?).

\* Cavidade Peritônea: Sem evidência de ascite.

\* Rins: Edemaciados.

\* Bexiga: Sem particularidades.

### MICROSCOPIA: Os cortes histológicos mostram:

\* Cérebro: Apresenta hipóxia aguda; hiperemia, edema cerebral e presença de micro trombos subcorticais.

\* Pulmões: Apresentam hiperplasia de pneumócitos; dano alveolar difuso com exsudato, congestão capilar, frequentes áreas com extravasamento de líquido aquoso para o espaço intersticial (edema), abundante reação de fibroblastos com escassa reação inflamatória composta principalmente por linfócitos e neutrófilos e formação de micro-trombos por todo o parênquima. Observa-se lobo pulmonar, acometimento difuso onde os alvéolos se encontram preenchidos por exsudato fibrinopurulento constituído por piócitos e septos interalveolares necróticos.

\* Coração: Apresenta congestão capilar com área de extensa hemorragia ocupando todas as câmaras com perda da estriação transversal.

\* Rins: Túbulos apresentando tiroidização, anucleados (necrose tubular aguda), congestão capilar, formação de micro-trombos no córtex e (necrose isquêmica em bordos/pós-mortem).

\* Fígado: Apresenta áreas de congestão capilar com focos de hemorragia e necrose isquêmica (em bordos do parênquima/pós-mortem).

\* Baço: Não definição das polpas branca e vermelha, onde observa-se menor quantidade de glóbulos vermelhos no parênquima.

\* Esôfago e estômago: Sem particularidades.

\* Pâncreas e vesícula biliar: Necrose isquêmica (pós-mortem?/fixação?).

\* Bexiga: Sem particularidades.

Os resultados dos testes laboratoriais sobre influência de estados fisiológicos, patológicos e uso de medicamentos. Bem como o Médico Veterinário (Gênero) tem condições de interpretar corretamente estes dados. GIMANLAB possui uma assessoria científica qualificada para a discussão de resultados com o Médico Veterinário solicitante. A presente análise tem o seu valor restrito à amostra entregue ao MANLAB.

  
SARA PANERARI  
PATOLOGISTA  
CRMV SP = 30632



ANÁLISES CLÍNICAS E BANCO  
DE SANGUE VETERINÁRIO

(19) 3291-7771  
(19) 9 9141-0220  
contato@hemoclinpet.com.br  
www.hemoclinpet.com.br  
R. Jorge Miranda, 119 - Botafogo  
Campinas-SP CEP: 13620190

Paciente: Rato 2/ P1 - Variante 42 Sexo: F N° Registro.: 0005577  
Espécie.: MUS MUSCULUS Instituição: FUNDAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA UNICAMP FUNCAMP  
Setor...: IB - UNICAMP Solicitante: PROF. DR. MARCO AURÉLIO RAMIREZ VINOLO

**DIAGNÓSTICO:**

- Pulmão de choque/SARS.
- Edema agudo pulmonar.
- Enfizema pulmonar.
- Pneumonia lobar supurativa.
- Necrose tubular aguda.
- CID ( Coagulação intravascular disseminada).

**CAUSA MORTIS:**

- Parada cardiorespiratória.

Os resultados dos testes laboratoriais sofrem influência de estados fisiológicos, patológicos e uso de medicamentos. Bem como o Médico Veterinário Clínico tem condições de interpretar corretamente estes laudos. O IMANLAB possui uma assessoria científica qualificada para discussão de resultados com o Médico Veterinário solicitante. A presente análise tem o seu valor restrito à amostra entregue ao IMANLAB.

SARA PANERARI  
PATOLOGISTA  
CRMV SP = 30632

## Autorização das editoras

Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples: Gut Microbes: V...

[Home](#) > [All Journals](#) > [Gut Microbes](#) > [List of Issues](#) > [Volume 13, Issue 1](#) > [Microbiota-derived short-chain fatty aci ...](#)

 [Log in](#) | [Register](#)  [Cart](#)

**Gut Microbes**   
Volume 13, 2021 - Issue 1

 Open access

7,589 31 104  
Views CrossRef citations to date Altmetric

Brief Report

# Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples

**Lívia Bitencourt Pascoal** , **Patrícia Brito Rodrigues**, **Lívia Moreira Genaro**, **Arlson Bernardo dos Santos Pereira Gomes**, **Daniel Augusto Toledo-Teixeira**, **Pierina Lorencini Parise**, ...[show all](#)

Pages 1-9 | Received 29 Oct 2020, Accepted 24 Dec 2020, Published online: 08 Feb 2021

 Cite this article 7 <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.1874740> 

[Full Article](#) > [Figures & data](#) - [References](#)  [Citations](#)  [Metrics](#) [Licensing](#) / [Reprints & Permissions](#)

[View PDF](#)  [View EPUB](#)

## Reprints and Permissions

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons CC BY license, which permits unrestricted use, distribution, reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article in part or whole.

## Related research

Recommended articles

People also read

Cited by  
31

[Gut microbiota-derived short-chain fatty acids and kidney diseases](#) >

Lingzhi Li et al.  
Drug Design, Development and Therapy  
Published online: 11 Dec 2017

[The intestinal microbiota, energy balance, and malnutrition: emphasis on the role of short-chain fatty acids](#) >

Kristina S. Fluitman et al.  
Expert Review of Endocrinology & Metabolism  
Published online: 26 Apr 2017

[Low serum levels of short-chain fatty acids after lactulose ingestion may indicate impaired colonic fermentation in patients with irritable bowel syndrome](#) >

Ragnhild Undseth et al.  
Clinical and Experimental Gastroenterology  
Published online: 18 Dec 2022


[Journals \(/about/journals\)](/about/journals)
[Topics \(/topics\)](/topics)
[Information \(/authors\)](/authors)
[Author Services \(/authors/english\)](/authors/english)
[\(help - desktop layout - cookie\)](#)
[Initiatives \(/about/initiatives\)](/about/initiatives)
[About \(/about\)](/about)
[Sign In / Sign Up \(/user/login\)](/user/login)
[Submit \(https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/upload\)](https://susy.mdpi.com/user/manuscripts/upload)

#### Search for Articles:






#### Advanced Search

## Copyrights

### Copyright and Licensing

For all articles published in MDPI journals, copyright is retained by the authors. Articles are licensed under an open access Creative Commons CC BY 4.0 license, meaning that anyone may download and read the paper for free. In addition, the article may be reused and quoted provided that the original published version is cited. These conditions allow for maximum use and exposure of the work, while ensuring that the authors receive proper credit.

In exceptional circumstances articles may be licensed differently. If you have specific condition (such as one linked to funding) that does not allow this license, please mention this to the editorial office of the journal at submission. Exceptions will be granted at the discretion of the publisher.

### Reproducing Published Material from other Publishers

It is absolutely essential that authors obtain permission to reproduce any published material (figures, schemes, tables or any extract of a text) which does not fall into the public domain, or for which they do not hold the copyright. Permission should be requested by the authors from the copyright holder (usually the Publisher, please refer to the imprint of the individual publications to identify the copyright holder).



Permission **is required** for:

<https://www.mdpi.com/authors/rights>