



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

LARISSA DA SILVA SOUZA

**AVALIAÇÃO DO BACTERIOMA FECAL E CORRELAÇÃO COM
MARCADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS EM PACIENTES
INFECTADOS PELO SARS-CoV-2**

Botucatu
2025

Larissa da Silva Souza

**AVALIAÇÃO DO BACTERIOMA FECAL E CORRELAÇÃO COM
MARCADORES INFLAMATÓRIOS SISTÊMICOS EM PACIENTES
INFECTADOS PELO SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu, para obtenção do título de Mestre em Biologia Geral e Aplicada.

Área de concentração: Biologia de Microrganismos e Imunidade

Financiamento: FAPESP – Processo 2023/03745-9

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Gislane Lelis Vilela de Oliveira

Botucatu
2025

S729a

Souza, Larissa da Silva

Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em paciente infectados pelo SARS-CoV-2 / Larissa da Silva Souza. -- Botucatu, 2025
58 f. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Botucatu
Orientadora: Gislane Lelis Vilela de Oliveira

1. COVID-19. 2. Marcadores inflamatórios. 3. Microbiota. 4. Eixo intestino-pulmão. 5. Permeabilidade intestinal.

Impacto potencial desta pesquisa

A tese intitulada *“Avaliação do bacterioma fecal e correlações com marcadores inflamatórios em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2”* apresenta um importante potencial de impacto científico, social e econômico. Do ponto de vista científico, contribui para o avanço do conhecimento sobre a interação entre a microbiota intestinal e a resposta imunológica na COVID-19 e condição pós-COVID, apontando possíveis biomarcadores e estratégias terapêuticas inovadoras. No âmbito social, oferece subsídios para a melhoria no diagnóstico e tratamento de sintomas persistentes, promovendo uma melhor qualidade de vida aos pacientes afetados. Já no aspecto econômico, os resultados podem favorecer a implementação de intervenções mais eficazes e de baixo custo, como o uso de probióticos, colaborando para a redução da sobrecarga nos sistemas de saúde pública.

Potential impact of this research

The thesis entitled *“Evaluation of the fecal bacteriome and correlations with inflammatory markers in patients infected with SARS-CoV-2”* presents significant scientific, social, and economic impact potential. From a scientific perspective, it advances knowledge on the interaction between the gut microbiota and the immune response in COVID-19 and post-COVID conditions, highlighting possible biomarkers and innovative therapeutic strategies. Socially, it provides support for improving the diagnosis and treatment of persistent symptoms, thereby promoting better quality of life for affected patients. Economically, the findings may support the implementation of more effective and low-cost interventions, such as the use of probiotics, helping to reduce the burden on public healthcare systems.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2

AUTORA: LARISSA DA SILVA SOUZA

ORIENTADORA: GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Biologia Geral e Aplicada, área: Biologia de Micro-organismos e Imunidade pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. GISLANE LELIS VILELA DE OLIVEIRA (Participação Presencial)
Departamento de Genética e Microbiologia e Imunologia / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Profa. Dra. EVANDRA STRAZZA RODRIGUES SANDOVAL (Participação Virtual)
Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo - FMRP/USP

Profa. Dra. CLELIA AKIKO HIRUMA LIMA (Participação Presencial)
Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp

Botucatu, 14 de julho de 2025



Documento assinado digitalmente
FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Data: 15/07/2025 13:17:26 -0300
Verifique em: <https://validar.jbr.gov.br>

FLÁVIA DANIELI MARTINS GODINHO
Assistente Técnico Administrativo I da Seção Técnica de Pós-Graduação
Instituto de Biociências de Botucatu – UNESP

Instituto de Biociências - Câmpus de Botucatu -
Rua Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, s/nº, 18618689
<https://www.ibb.unesp.br/#/ensino/pos-graduacao/programas-stricto-sensu/pg-biologia-geral-e-aplicada/CNPJ:48031918002259>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me permitir estar cumprindo mais uma etapa da minha vida.

Agradeço a minha família, principalmente aos meus pais Rosângela e Fernando e a minha irmã Lívia por todo apoio e confiança em cada escolha que tomei. Por sempre acreditarem em mim, por me proporcionarem todo o suporte e por me ajudarem com todas as minhas escolhas. Obrigado por todo o amparo e todo o amor dado. Sem eles nada disso seria possível.

Agradeço ao meu noivo Paulo, por todo suporte nesse processo e paciência, e sempre me deu forças para continuar quando precisei.

Agradeço aos pacientes que aceitaram participar do projeto, aos hospitais e a todos os envolvidos no recrutamento dos pacientes, pois sem eles não seria possível a realização deste trabalho.

Agradeço à minha orientadora, Professora Gislane Lelis Vilela de Oliveira, pela oportunidade de me inserir no Laboratório de Imunomodulação e Microbiota – LIM, por ter me ajudado a realizar o sonho de entrar no mundo da ciência e da pesquisa. Por confiar no meu potencial, pois mesmo sem me conhecer me deu a oportunidade de fazer parte do lab LIM. E por último, por me acompanhar no meu primeiro congresso que foi o primeiro de muitos.

Agradecimento especial ao Professor Josias Rodrigues pela colaboração no projeto e oportunidade de aprender sobre a técnica de sequenciamento 16S.

Agradeço aos Professores Ary, Eduardo, Maurício, Rodrigo, João Pessoa, Paulo, Terezinha, Lurdinha e Vera, seja pelo empréstimo de algum material ou pela utilização de equipamentos.

Agradeço a todos os colegas do Lab LIM que me forneceram suporte durante todo esse processo, pelas risadas e cafés compartilhados. Luiza, Danielle, Xandinho, Bianca, Jefferson e Nathalia.

Agradeço a todas as técnicas do departamento, Larissa, Aline e Ivana.

Agradeço a todos os colegas do departamento pelas conversas e auxílios.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processo nº 2023/03745-9.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa, sob o processos nº 88887.915062/2023-00 e 88887.901679/2023-00.

FINANCIAMENTO DO PROJETO

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2023/03745-9, e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 88887.901679/2023-00 e 88887.915062/2023-00.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.
(Marthin Luther King)

RESUMO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o SARS-CoV-2 infectou mais de 778 milhões de pessoas mundialmente, com mais de 7 milhões de óbitos. O Brasil foi um dos países mais afetados, com mais de 39 milhões de casos confirmados e 716.238 mortes. A doença compreende um amplo espectro de manifestações clínicas, incluindo desde pacientes assintomáticos a pacientes críticos, com envolvimento não só do trato respiratório, mas também do gastrointestinal. A microbiota intestinal desempenha um papel fundamental no eixo intestino-pulmão, influenciando as respostas imunes locais e sistêmicas. A disbiose intestinal, com redução da diversidade e função da microbiota, têm sido relacionada à patogênese da COVID-19 e evidências sugerem que essas disfunções podem não apenas influenciar a gravidade da doença, mas também impactar desfechos a longo prazo. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar o bacterioma fecal em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e correlacionar à marcadores inflamatórios sistêmicos e dados clínicos. Esse estudo foi aprovado pelo comitê de ética em pesquisa da UNESP (nº 4.310.336/2020) e todos os pacientes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram incluídas amostras de sangue e fezes de pacientes com COVID-19 ($n = 79$), condição pós-COVID-19 (CPC; $n = 141$) e indivíduos controles ($n = 97$). O DNA foi extraído das fezes e o bacterioma foi avaliado por sequenciamento 16S. As citocinas no plasma foram quantificadas por citometria de fluxo e os níveis plasmáticos de proteína C reativa, zonulina e TGF- β por ensaio imunoenzimático. A detecção de IgA e calprotectina nas fezes foram realizadas por ELISA. Observamos diferenças significativas ($p < 0,05$) nas métricas de diversidade (Richness, Chao1, Shannon e Faith) em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, quando comparados aos controles, bem como diferentes agrupamentos nas análises de beta diversidade. Em relação à análise de abundância diferencial e distribuição taxonômica, observamos diferenças significativas entre os grupos infectados pelo SARS-CoV-2 e os controles. Detectamos altas concentrações das citocinas inflamatórias IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- γ e de zonulina no plasma dos pacientes. Alguns gêneros diferencialmente aumentados na COVID-19 apresentaram correlação com os níveis de proteína C reativa. Da mesma forma, alguns táxons apresentaram correlação com o aumento das concentrações de zonulina, incluindo *Enterobacteriaceae* e *Escherichia-Shigella*, sugerindo o papel da disbiose intestinal na disfunção da barreira, favorecendo a translocação bacteriana e a inflamação sistêmica. Nossos resultados reforçam a importância do eixo intestino-pulmão e o papel da microbiota intestinal na modulação das respostas imunes e na manutenção da integridade da barreira intestinal, sugerindo a capacidade de modular a imunidade frente ao SARS-CoV-2 por meio da microbiota intestinal.

Palavras-chaves: COVID-19, condição pós-COVID-19, eixo intestino-pulmão, bacterioma, permeabilidade intestinal, citocinas inflamatórias

ABSTRACT

COVID-19 is an infectious disease caused by the coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome 2 (SARS-CoV-2). According to the World Health Organization, SARS-CoV-2 has infected over 778 million people worldwide, with more than 7 million deaths. Brazil has been one of the most affected countries, with over 39 million confirmed cases and 716,238 deaths. The disease presents a wide spectrum of clinical manifestations, ranging from asymptomatic individuals to critically ill patients, affecting not only the respiratory tract but also the gastrointestinal system. The gut microbiota plays a crucial role in the gut-lung axis, influencing both local and systemic immune responses. Intestinal dysbiosis, characterized by reduced diversity and function of the microbiota, has been implicated in the pathogenesis of COVID-19, and evidence suggests that these microbial disturbances may influence not only disease severity but also long-term outcomes. Thus, the aim of this study was to evaluate the fecal bacteriome in patients infected with SARS-CoV-2 and correlate it with systemic inflammatory markers and clinical data. This study was approved by the UNESP Research Ethics Committee (no. 4.310.336/2020), and all participants signed informed consent forms. Blood and stool samples were collected from patients with COVID-19 ($n = 79$), post-COVID-19 condition (PCC; $n = 141$), and control individuals ($n = 97$). DNA was extracted from fecal samples, and the bacteriome was assessed by 16S sequencing. Cytokines in plasma were measured by flow cytometry, and plasma levels of C-reactive protein (CRP), zonulin, and TGF- β were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Detection of fecal sIgA and calprotectin was also performed by ELISA. We observed significant differences ($p < 0.05$) in diversity metrics (Richness, Chao1, Shannon, and Faith) in SARS-CoV-2-infected patients compared to controls, as well as distinct clustering in beta diversity analyses. Differential abundance and taxonomic distribution analyses revealed significant differences between the SARS-CoV-2-infected group and controls. Elevated concentrations of inflammatory cytokines IL-2, IL-6, IL-17A, IFN- γ , and zonulin were detected in patient plasma. Some bacterial genera that were differentially increased in COVID-19 showed correlations with CRP levels. Likewise, certain taxa correlated with increased zonulin levels, including *Enterobacteriaceae* and *Escherichia-Shigella*, suggesting the role of intestinal dysbiosis in barrier dysfunction, promoting bacterial translocation and systemic inflammation. Our results highlight the importance of the gut-lung axis and the role of the gut microbiota in modulating immune responses and maintaining intestinal barrier integrity, suggesting that the gut microbiota may influence immunity against SARS-CoV-2.

Keywords: COVID-19, post-COVID-19 condition, gut-lung axis, bacteriome, intestinal permeability, inflammatory cytokines

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de diversidade alfa do bacterioma intestinal de indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC). (A) Riqueza; (B) Índice Chao1; (C) Diversidade de Shannon; (D) Diversidade filogenética de Faith. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$.

Figura 2: Análise de diversidade beta do bacterioma intestinal de indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC) usando métricas UniFrac ponderadas e não ponderadas. (A,D) Distâncias do centroide; (B,C,E,F) Análise de coordenadas principais com diferentes agrupamentos. . ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$.

Figura 3: Distribuição taxonômica e abundância relativa do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC). (A-C) Abundâncias de táxons (D-I) Análise de abundância diferencial de gêneros. . ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$.

Figura 4: Distribuição taxonômica e abundância diferencial do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda(A) e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC)(B). Análise de abundância diferencial de filo. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$. As proporções médias foram transformadas pela raiz quadrada e as diferenças foram expressas com intervalos de confiança de 95%.

Figura 5: Distribuição taxonômica e abundância diferencial do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda(A) e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC)(B). Análise de abundância diferencial de família. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$. As proporções médias foram transformadas pela raiz quadrada e as diferenças foram expressas com intervalos de confiança de 95%.

Figura 6: Concentrações plasmáticas de zonulina (A), IgA secretora fecal (B) e calprotectina fecal (C) em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (CPC). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da media.

Figura 7: Marcadores inflamatórios presente no sangue. (A) Concentrações da proteína C reativa em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda. Concentração plasmática das citocinas em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes em condição pós-COVID-19 (CPC) (B) IL-2, (C) IL-6, (D) IL-17A e (E) IFN- γ . Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

Figura 8: Correlações entre táxons bacterianos e dados clinicolaboratoriais em pacientes com COVID-19 aguda. (A) Proteína C-reativa com gêneros diferencialmente aumentados. (B-C) Níveis plasmáticos de zonulina com famílias e gêneros diferencialmente aumentados. (D-E) Níveis fecais de sIgA com alguns gêneros diferencialmente aumentados. (F-H) Concentrações plasmáticas de IL-6, IL-2 e IFN- γ com táxons diferencialmente aumentados.

Figura 9: Estratificação das concentrações plasmáticas de IL-6, (A) dosagem conforme a gravidade da COVID-19 (leve, moderada e grave); (B) Níveis plasmáticos de IL-6 estratificados segundo os dias pós-covid (D+30 a D $\geq$ 180), em comparação ao grupo controle(CTL). Os resultados estão expressos

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: : Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e controles.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAPES- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CPC ou PCC - Condição pós-COVID-19

DNA -Ácido dextroribonucleico

DO - Densidade óptica

DPOC- Doença pulmonar obstrutiva crônica

ECA2- Enzima conversora de angiotensina tipo 2

ELISA- do inglês *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FCS - Furina polibásica

IBB - Instituto de biociências de Botucatu

IFN- α - Interferon alfa

IFN- β - Interferon beta

IFN- γ - Interferon alfa

IgA -Imunoglobulina A

IgG- Imunoglobulina G

IgM -Imunoglobulina M

IL - Interleucina

IMC - Índice de Massa Corporal

JAK-STAT – do inglês *Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway*

MDA5- Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma

NF- κ B -Fator nuclear kappa B

NLRP3 - Proteína 3 contendo domínio NOD, LRR e pirina (INFLAMOSSOMO)

OMS -Organização Mundial da saúde

OTU- Unidades taxonômicas operacionais

PAMP- Padrões moleculares associados a patógenos

PCR -Proteína c reativa

PCR- Reação em Cadeia da Polimerase

RBD- do inglês *Receptor-binding domain*

RLRs -Receptores RIG-I-Like

RNA- Ácido ribonucleico

ROS -Espécies reativas de oxigênio

RT-PCR - Reação de Transcriptase combinada com a Reação em Cadeia da

Polimerase

S- Glicoproteína *spike*

SARS-COV-2 - Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

SDRA -Síndrome do desconforto respiratório agudo

SIgA -Imunoglobulina A secretora

SpO₂- Saturação de oxigênio

TLR2 -Receptores *Toll-Like* tipo 2

TLRs- Receptores *Toll-Like*

TNF- Fator de necrose tumoral

UNESP- Universidade estadual paulista

UTI - Unidades de terapia intensiva

ZO-1 - Zonulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
1.1 Resposta imune ao vírus SARS-CoV-2	17
1.2 Microbiota intestinal na COVID-19.....	20
1.3 Permeabilidade intestinal na COVID-19	22
1.4 Justificativa	23
2 OBJETIVO	24
2.1 Objetivos específicos.....	24
3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1 Delineamento do estudo, aspectos éticos e instituições envolvidas	24
3.2 Casuística, coleta de amostras e biossegurança.....	25
3.3 Extração de DNA, construção de bibliotecas e sequenciamento 16S.....	26
3.4 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo.....	27
3.5 Dosagem de proteína C reativa (PCR) e zonulina (ZO-1) e Fator de crescimento transformador beta(TGF- β) por ELISA	28
3.6 Dosagem de IgA secretora e calprotectina nas fezes.....	29
3.7 Análise de bioinformática e estatística.....	30
3.8 Gestão de dados	31
4 RESULTADOS	31
4.1 Dados demográficos e clínicos dos pacientes	31
4.2 Perfil do bacterioma em pacientes infectados pelo vírus SARS-CoV-2	34
4.3 Avaliação da saúde intestinal nos pacientes.....	39
4.4 Avaliação de marcadores inflamatórios no sangue.....	40
4.5 Correlações entre o bacterioma e marcadores inflamatórios presente no sangue e fezes.....	41
4.6 Análise estratificada dos marcadores inflamatórios e de saúde intestinal.	43
5 DISCUSSÃO	45
6 CONCLUSÃO.....	50
7 REFERÊNCIAS.....	50
Atividades acadêmicas vinculadas ao projeto.....	57

PRÓLOGO

A realização deste projeto de mestrado proporcionou uma valiosa oportunidade para investigar os marcadores inflamatórios sistêmicos e intestinais na COVID-19 aguda e na condição pós-COVID, correlacionando-os com o perfil do bacterioma fecal. A pesquisa aqui apresentada não apenas contribui para a compreensão dos mecanismos envolvidos na resposta imune e na desregulação da microbiota intestinal frente ao SARS-CoV-2, mas também reforça a importância do eixo intestino-pulmão na modulação da imunidade em doenças infecciosas.

Além do desenvolvimento deste estudo, participei de diversas atividades complementares de cunho científico e de extensão universitária, as quais ampliaram minha formação acadêmica e contribuíram significativamente para meu crescimento pessoal e profissional. Essas experiências me permitiram aprimorar habilidades técnicas, fortalecer o pensamento crítico e compreender a importância da ciência como ferramenta de transformação social.

Chegar a esta etapa é, para mim, motivo de gratidão e orgulho. Compartilho agora os frutos dessa trajetória, construída com dedicação, perseverança e o apoio de todos que estiveram ao meu lado ao longo desse processo.

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o SARS-CoV-2 infectou mais de 778 milhões de pessoas mundialmente, com mais de 7,1 milhões de óbitos (World Health Organization, 2025). O Brasil foi um dos países mais afetados, com mais 39 milhões de casos confirmados e 716.238 mortes (Ministério da Saúde, 2025).

A infecção pelo vírus ocorre por meio da entrada viral através da enzima conversora de angiotensina 2, presente no trato respiratório, que atua como porta de entrada para o SARS-CoV-2. No entanto, o processo infeccioso pode afetar diversos sistemas do organismo, incluindo o gastrointestinal, cardiovascular, renal, hematológico e nervoso, manifestando-se em um amplo espectro de gravidade, que varia desde casos assintomáticos até quadros com sintomas leves, moderados ou graves (Gheorghita *et al.*, 2024). O forma leve da doença é definida por pacientes que não apresentam dispneia nem evidências radiológicas de acometimento do trato respiratório inferior, embora possam manifestar sintomas como febre, tosse, faringite, mal-estar, cefaleia, náuseas ou vômitos. A forma moderada inclui indivíduos com sinais clínicos e achados radiológicos de envolvimento do trato respiratório inferior, mantendo, contudo, uma saturação periférica de oxigênio (SpO₂) superior a 94%. A forma grave caracteriza-se por taquipneia (frequência respiratória > 30 incursões por minuto), infiltrados pulmonares acometendo mais de 50% do parênquima, saturação de oxigênio < 94% e relação entre a pressão parcial de oxigênio arterial e a fração inspirada de oxigênio (PaO₂/FiO₂) inferior a 300 mmHg (Maison *et al.*, 2025). A presença de comorbidades é mais comum entre pacientes com COVID-19 grave, incluindo doenças cardiovasculares, hipertensão, diabetes, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), neoplasias, doenças cerebrovasculares e doença renal crônica. Além disso, estudos relataram que a obesidade (IMC ≥ 30) foi associada a doença mais grave e piores desfechos em pacientes com COVID-19 (Zhang *et al.*, 2022).

A condição pós-COVID-19 (CPC) é uma doença debilitante complexa. O diagnóstico de CPC é feito com base na duração e ocorrência dos sintomas após a infecção inicial por COVID-19 (Tamariz *et al.*, 2024). Os sintomas podem ser multissistêmicos e ter efeitos duradouros que persistem além de 4 semanas após a infecção até vários anos e envolvem deficiências físicas, cognitivas e de saúde mental (Santos *et al.*, 2024). Os fatores frequentemente associados a uma prevalência maior de sintomas persistentes incluíram sexo feminino, idade avançada, doença grave durante a fase aguda da COVID-

19, múltiplas comorbidades, uma duração prolongada de internação hospitalar e um alto índice de massa corporal (Lau *et al.*, 2024). Os pacientes com CPC apresentam sintomas variáveis e persistentes após a infecção, com duração de 2–3 meses após a resolução da infecção aguda por COVID-19, que não podem ser atribuídos a diagnósticos alternativos (Chuang *et al.*, 2024). A prevalência global estimada da CPC varia de 6% a 50%, afetando mais de 65 milhões de pessoas em todo o mundo (Soriano *et al.*, 2022; Davis *et al.* 2023; Oelsner *et al.*, 2024). A sintomatologia sendo persistente e heterogênea, com envolvimento de múltiplos sistemas orgânicos, manifestando fadiga, mal-estar generalizado e febre de baixa intensidade relacionada ao quadro pós-agudo da infecção. As manifestações neurológicas são igualmente prevalentes, incluindo dificuldade de concentração, cefaleia, alterações do paladar e do olfato, comprometimento cognitivo, déficits de memória e episódios de tontura. No âmbito cardiopulmonar, dispneia, redução da tolerância ao esforço e palpitações. Ademais, além das manifestações somáticas, esses indivíduos podem desenvolver sintomas neuropsiquiátricos, como transtorno de estresse pós-traumático, ansiedade e depressão (Mohd Yussoff *et al.*, 2025).

Embora a patogênese subjacente da CPC permaneça obscura, as hipóteses atuais incluem a persistência de vírus ou remanescentes virais em tecidos; desenvolvimento ou agravamento da autoimunidade; disbiose intestinal; reativação de infecções virais latentes não SARS-CoV-2 e danos aos tecidos causados por inflamação crônica (Klein *et al.*, 2023). Sabemos que na COVID-19 aguda tem a participação da tempestade de citocinas, componente importante na gravidade da doença e evidências tem mostrado disfunção do sistema imune também na CPC.

1.1 RESPOSTA IMUNE AO VÍRUS SARS-COV-2

A transmissão do vírus ocorre por contato direto ou indireto (por meio de fômites), por pequenas gotículas transportadas pelo ar (aerossóis) ou por gotículas maiores. A infecção também pode ocorrer pelo contato com as mucosas dos olhos, ouvidos, nariz ou boca de um paciente com COVID-19 (Chuang *et al.*, 2024). A entrada do SARS-CoV-2 nas células das vias aéreas requer clivagem mediada por furina no sítio de clivagem polibásico da furina (FCS), localizado na junção S1–S2, permitindo a fusão da membrana viral com a célula hospedeira. O FCS é, portanto, um determinante-chave das altas taxas de transmissão do SARS-CoV-2, contribuindo para sua disseminação eficiente em humanos (Carabelli *et al.*, 2023). Embora o trato respiratório humano seja o principal alvo do vírus devido à sua transmissibilidade aérea, a expressão da enzima conversora de angiotensina tipo 2 (ECA2) é ainda maior nos rins e no trato gastrointestinal do que

nos pulmões. Assim, órgãos extrapulmonares como rins, intestino delgado, pâncreas, vasos sanguíneos, testículos e outros tecidos podem ser alvos adicionais para o SARS-CoV-2 (Aiello; Najafi – Fard; Goletti, 2023).

A glicoproteína *spike* (S) do SARS-CoV-2 medeia a entrada do vírus na célula hospedeira (Garay *et al.*, 2024). Ela apresenta duas subunidades, a S1 contém o domínio de ligação ao receptor ECA-2 (RBD-*Receptor-binding domain*), e a S2 está envolvida na fusão da membrana viral com a membrana do hospedeiro. Após a entrada na célula, o RNA viral é liberado no citoplasma, e utiliza a maquinaria celular para sua replicação, formando novos vírions que são liberados para infectar outras células (Jamilloux *et al.*, 2020; Lamers; Haagmans, 2022; Walls *et al.*, 2020).

No caso do SARS-CoV-2, acredita-se que os intermediários de replicação baseados em reconhecimento do RNA representem o principal dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) viral, reconhecido pelos receptores de padrões citoplasmáticos RIG-I e Toll (RLRs e TLRs, respectivamente). Os RLRs compreendem uma família de helicases de ligação de RNA que incluem duas sentinelas intracelulares centrais, RIG-I e MDA5, além de uma terceira RLR chamada LGP2 (Minkoff; Tenover, 2023). O TLR2 detecta a proteína do envelope SARS-CoV-2 para iniciar uma resposta imune antes da entrada e replicação viral, causando a liberação de TNF e IFN- γ . O TLR3 interage com o dsRNA viral e sua ativação recruta proteínas adaptadoras como o TRIF e induz fatores de transcrição como IRF3 e NF- κ B. Além disso, aumenta a expressão de NLRP3, permitindo o recrutamento de proteínas adaptadoras como ASC e caspase-1, induzindo a formação do inflamassoma. Essas respostas estimulam a produção de muitas citocinas próinflamatórias, incluindo os interferons do tipo I (IFN- α e IFN- β), além do TNF, IL-1 β e IL-18 (Maison; Deng; Gerschenson, 2023).

A resposta tardia ou mínima ao interferon facilita a infecção do vírus nas células epiteliais alveolares, onde a replicação viral e a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) resultam em danos e morte das células alveolares. A perda de células alveolares tipo 1 e 2 contribui para a ruptura do epitélio alveolar, iniciando uma resposta inflamatória em cascata envolvendo citocinas e quimiocinas como IL-1, IL-6 e TNF. Em células epiteliais alveolares próximas, as citocinas próinflamatórias podem ativar a via JAK-STAT ou resultar na translocação de NF- κ B para o núcleo, levando à produção escalonada de citocinas inflamatórias (Yu *et al.*, 2024). Essas citocinas desempenham papéis importantes nos mecanismos efetores antivirais, mas algumas evidências indicam que a inflamação neutrofílica pode realmente exacerbar os danos aos tecidos e aumentar a replicação viral (Wellford; Moseman, 2023). Os linfócitos T CD4 Th1 envolvidos na

resposta antiviral apresentam fenótipo de exaustão celular e muitos linfócitos T CD8 citotóxicos entram em apoptose, não eliminando os reservatórios virais (Chen; Wherry, 2020; Sette; Crotty, 2021). Além disso, foi observada depleção dos centros germinativos no baço e nos linfonodos devido à morte celular induzida pelo excesso de TNF e IFN- γ , favorecendo a linfopenia observada em pacientes e interferindo na resposta imune humoral (Karki *et al.*, 2021; Qi *et al.*, 2022; Pozdnyakova *et al.*, 2025).

Estudos recentes mostraram que pacientes com COVID-19 grave/crítica apresentam níveis séricos elevados de IL-6, IL-1 β , IL-18 e autoanticorpos dirigidos contra os interferons do tipo I (Bastard *et al.*, 2021, Laing *et al.*, 2020; Lopez *et al.*, 2021; Qin *et al.*, 2020). Estudos demonstraram que uma das principais causas da síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e da falência múltipla de órgãos seja a tempestade de citocinas (Pilla Reddy *et al.*, 2023).

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode comprometer a função imunológica, levando a um estado inflamatório que pode persistir por meses em pacientes com condição pós-COVID-19 (CPC) (Hurme *et al.*, 2025, Phetsouphanh *et al.*, 2022). Pacientes com CPC exibiram inflamação sistêmica e desregulação imunológica. Isso foi evidenciado por diferenças globais na distribuição de subconjuntos de células T, sugerindo respostas imunes contínuas, bem como por alterações específicas por sexo em subconjuntos citotóxicos. Os pacientes exibiram frequências aumentadas de células T CD4 + com potencial migratório para tecidos inflamados e células T CD8+ específicas ao SARS-CoV-2 exauridas, além de níveis mais elevados de anticorpos contra o SARS-CoV-2 e uma descoordenação entre suas respostas imunes específicas de células T e B. (Yin *et al.*, 2024). Estudos relataram anormalidades em marcadores imunológicos e mediadores inflamatórios em indivíduos com CPC. Por exemplo, um estudo em 20 pacientes hospitalizados com COVID-19 mostrou que pacientes com CPC tinham células T circulantes diminuídas, particularmente células T CD8+, que eram cruciais para a eliminação viral (Mohan *et al.*, 2023).

Alterações na microbiota intestinal em pacientes com COVID-19 podem levar à disfunção do eixo intestino–pulmão, causando disbiose e consequente desregulação imunológica que afeta tanto a frequência de células T CD8+ circulantes quanto a resposta antiviral no sistema respiratório (An Y *et al.*, 2024). O “status imunológico” do paciente pode determinar a resposta imune frente ao SARS-CoV-2 e tanto a imunidade quanto a resposta clínica podem ser impactadas pelo desequilíbrio da microbiota intestinal (Oliveira *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2024). Há um eixo microbiota-sistema imune de mucosas e um eixo intestino-pulmão que conectam todas as interações nestes órgãos/sistemas (Budden

et al., 2017; Dang; Marsland, 2019). O eixo intestino-pulmão refere-se à independência anatômica do intestino e dos pulmões, mas a existência de interações complexas entre eles em termos de fisiologia e patologia. Essas interações envolvem não apenas a relação hospedeiro-microrganismo, mas também a interação entre diferentes comunidades microbianas. O eixo intestino-pulmão funciona por meio de regulação local e efeitos distais, afetando a progressão de doenças respiratórias pela modulação de respostas imunes e inflamatórias (Zhang *et al.*, 2024a). A disbiose intestinal pode induzir distúrbios pulmonares e infecções respiratórias, causando desregulação imunológica, hormonal e metabólica local ou de longo alcance. A microbiota intestinal promove a produção do fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), que ativa a sinalização da quinase regulada por sinal extracelular em macrófagos alveolares, fortalecendo as defesas das vias respiratórias. Mais especificamente, a translocação de bactérias microbianas desreguladas e seus metabólitos derivados pode desempenhar um papel potencial na infecção por SARS-CoV-2 (An *et al.*, 2024).

1.2 MICROBIOTA INTESTINAL NA COVID-19

O comprometimento da função da barreira intestinal é um fator central que leva ao desequilíbrio da microbiota e à translocação de substâncias inflamatórias, induzindo uma resposta imune sistêmica exacerbada e contribuindo para as sequelas relacionadas à COVID-19. Diversos componentes do sistema imunológico intestinal são afetados por mediadores inflamatórios, pela quimiotaxia de células imunes e pela secreção de anticorpos na COVID-19, resultando na disfunção da barreira imunológica intestinal (Chang; Bai; You, 2022).

Com a COVID-19, o eixo intestino-pulmão ganhou ainda mais destaque (Allali *et al.*, 2021; Mahmoodpoor; Shamekh; Sanaie, 2022). A microbiota do trato gastrointestinal (TGI) é um dos principais componentes desse eixo, influenciando respostas imunológicas locais e sistêmicas, tanto no TGI quanto nos pulmões (Khezri; Varzandeh; Ghasemnejad-Berenji, 2023). As interações bidirecionais entre as mucosas respiratória e gastrointestinal participam das respostas imunes saudáveis ou patológicas ao SARS-CoV-2 (Farsi *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022).

Estudos experimentais demonstraram que os sinais fornecidos pela microbiota intestinal atuam em múltiplos níveis na mucosa respiratória estimulando um estado antiviral em células da imunidade inata no pulmão, favorecendo o controle da replicação viral no início da infecção (Abt *et al.*, 2012; Villena; Kitazawa, 2020). Quanto mais equilibrada for essa resposta imune inata, mais eficiente será a resposta adaptativa, tanto

celular e humoral, nos estagios tardios da infecção (Bradley *et al.*, 2019). A redução da diversidade e função da microbiota intestinal está associada ao aumento da mortalidade por infecções respiratórias e à desregulação da resposta imune, com maior secreção de IFN- γ , IL-6, CCL2, além da diminuição de células T reguladoras no pulmão e trato gastrointestinal (Ichinohe *et al.*, 2011; Villena; Kitazawa, 2020).

Diversos estudos relataram alterações significativas da microbiota intestinal (bacterioma/micobioma) de pacientes com COVID-19 aguda, incluindo redução da riqueza e diversidade microbiana e predominância de agentes oportunistas (Zuo *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2021; Yeoh *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2022; Yokoyama *et al.*, 2024; Shimizu *et al.*, 2024). Alguns trabalhos identificaram uma "impressão digital" da microbiota associada tanto à gravidade da doença quanto à mortalidade, sugerindo um possível papel preditivo da composição microbiana em pacientes hospitalizados (Bucci *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024). A disbiose intestinal persiste mesmo após a negatização do PCR para SARS-CoV-2 e a resolução dos sintomas respiratórios. Além disso, observa-se redução da abundância de microrganismos benéficos, como *Faecalibacterium prausnitzii*, espécie que favorece um microambiente anti-inflamatório no intestino e cuja presença correlaciona-se inversamente com a gravidade da doença (Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2020; Nagata *et al.*, 2023).

Os estudos anteriores sobre a microbiota intestinal na COVID-19 aguda incluem amostras reduzidas, variando de 15 a 30 pacientes (Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2020a, 2020b). Já os estudos com pacientes pós-COVID já publicados avaliaram a microbiota intestinal em cerca de 30 a 100 indivíduos (Chen *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Yeoh *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022).

O SARS-CoV-2 reconhece e invade células através do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), afetando funções imunológicas e metabólicas. Esse receptor é altamente expresso nas células intestinais, que constituem um importante local de entrada do vírus. Após a invasão, o SARS-CoV-2 se replica nas células epiteliais intestinais, provocando sintomas gastrointestinais. A entrada do vírus na corrente sanguínea pode provocar ativação excessiva de plaquetas e citocinas inflamatórias, resultando na perturbação do microambiente intestinal e perda da barreira intestino-sangue, agravando a disbiose intestinal. (Qiu Y *et al.*, 2020).

Pacientes com COVID-19 apresentam diversidade microbiana significativamente reduzida, diminuição da abundância de bactérias comensais e aumento de patógenos oportunistas, em comparação com indivíduos saudáveis. Tal disbiose pode persistir

mesmo após a recuperação da COVID-19 (Gang et al., 2022). Estudos confirmaram em pacientes com CPC, uma redução persistente da diversidade alfa (avaliada pelos índices de Shannon e Chao-1) e diferentes agrupamentos da microbiota intestinal em comparação aos controles. A diversidade alfa mede o nível de diversidade dentro de amostras individuais, incluindo índices de riqueza (índice de Chao-1) e de uniformidade (índice de Shannon)(Ancona *et al.*, 2023). Essas alterações na microbiota podem estar subjacentes aos sintomas crônicos, evidenciando que o microbioma intestinal está diretamente correlacionado com a condição de saúde do hospedeiro na fase pós-COVID (Ailioaie, L; Ailioaie, C ; Litscher, 2023). Notavelmente, mais de 20% dos adultos com COVID-19 não se recuperam completamente após três meses, e o desequilíbrio da microbiota intestinal persiste mesmo após a negatificação do SARS-CoV-2 e a resolução dos sintomas respiratórios (Yeoh *et al.*, 2021; AN *et al.*, 2024). A microbiota intestinal alterada causa aumento da expressão de vários mediadores, incluindo a zonulina, cuja elevação indica ruptura das junções estreitas e, conseqüentemente, o aumento da permeabilidade intestinal.

1.3 PERMEABILIDADE INTESTINAL NA COVID-19

O trato gastrointestinal pode ser diretamente infectado pelo SARS-CoV-2 ou secundariamente afetado pela viremia e pela liberação de mediadores inflamatórios que causam a entrada viral do epitélio respiratório (Khezri; Varzandeh; Ghasemnejad -Berenji, 2023). A função de barreira intestinal prejudicada na infecção por SARS-CoV-2 é um fator-chave que leva à translocação excessiva de microorganismos e endotoxinas, desencadeando uma intensa resposta imune sistêmica e culminando no desenvolvimento da síndrome da sepse viral, com graves sequelas (Eleftheriotis *et al.*, 2023). Quando microorganismos ou produtos microbianos translocam através de locais de barreira, respostas inflamatórias aos antígenos são tipicamente induzidas(Brooks et al., 2024). A zonulina é encontrada na estrutura das junções estreitas (*Tight Junctions* - TJ) do intestino, envolvida na transição paracelular. Quando liberada em grandes quantidades no lúmen intestinal, ela se liga a receptores nas superfícies apicais das células epiteliais intestinais, promovendo a desintegração da integridade das junções estreitas e aumentando a permeabilidade intestinal, o que permite a passagem contínua de antígenos do intestino para a submucosa (Okuyucu *et al.*, 2022).

Foi levantada a hipótese de que o SARS-CoV-2 pode migrar dos pulmões para outros tecidos, incluindo o trato gastrointestinal, utilizando células do sistema imunológico

como rota de transporte (Palomino-Kobayashi *et al.*, 2022). É intrigante considerar que a interrupção da barreira intestinal pelo SARS-CoV-2 pode levar à elevação sistêmica de lipopolissacarídeos bacterianos e peptidoglicanos, promovendo o aumento da inflamação. Dessa forma, a permeabilidade intestinal aumentada e a disbiose podem contribuir para a tempestade de citocinas observada em pacientes com COVID-19 grave (Penninger; Grant; Sung, 2021).

1.4 JUSTIFICATIVA

A COVID-19 é uma doença infecciosa causada pelo coronavírus associado a síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Segundo a Organização Mundial de Saúde, o SARS-CoV-2 infectou mais de 778 milhões de pessoas mundialmente, com mais de 7,1 milhões de óbitos (World health organization, 2025). O Brasil foi um dos países mais afetados, com mais 39 milhões de casos confirmados e 716.238 mortes (Ministério da Saúde, 2025). Embora os riscos para algumas condições diminuam após o primeiro ano de infecção, muitos permanecem até dois anos após a infecção inicial, especialmente entre indivíduos que foram hospitalizados durante a fase aguda da doença. Cerca de 25% da carga cumulativa de dois anos de incapacidade e doença atribuída ao SARS-CoV-2 se concentra no segundo ano após a infecção inicial (Cai *et al.*, 2024).

A incidência global cumulativa da CPC é de cerca de 400 milhões de indivíduos, o que corresponde a um impacto econômico anual estimado em cerca de US\$ 1 trilhão — valor equivalente a aproximadamente 1% da economia global. Diversas vias mecanicistas estão implicadas na CPC, incluindo persistência viral, desregulação imunológica, disfunção mitocondrial, desregulação do sistema complemento, inflamação endotelial e disbiose intestinal. A CPC pode ter impactos devastadores nas vidas individuais e, devido à sua complexidade e prevalência, também gera grandes repercussões para os sistemas de saúde e economias, chegando a ameaçar o progresso em direção ao alcance dos objetivos de desenvolvimento individual de cada paciente (Al-Aly *et al.*, 2024).

Até o momento, não há estudos avaliando alterações na microbiota intestinal durante a COVID-19 na população brasileira, tampouco investigando o impacto desse possível desequilíbrio na permeabilidade intestinal e na produção sistêmica de citocinas inflamatórias. Considerando que cerca de 39 milhões de brasileiros foram infectados e podem apresentar sequelas, é plausível propor que terapias baseadas na modulação da microbiota intestinal e no restabelecimento das condições de homeostase intestinal e imunológica possam ser uma importante ferramenta para restringir as manifestações clínicas na condição pós-COVID-19 (Gharajeh *et al.*, 2022; Zhao *et al.*, 2022).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar o bacterioma fecal e marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

2.1 Objetivos específicos

1. Comparar a composição do bacterioma fecal em pacientes com COVID-19 e condição pós-COVID-19 ao grupo controle;
2. Avaliar a concentração de citocinas inflamatórias e proteína C reativa na circulação sistêmica de pacientes com COVID-19, condição pós-COVID-19 e grupo controle;
3. Avaliar a concentração de zonulina na circulação sistêmica de pacientes com COVID-19, condição pós-COVID-19 e grupo controle;
4. Avaliar os níveis de IgA secretora e calprotectina nas fezes de pacientes com COVID-19, condição pós-COVID-19 e grupo controle;
5. Avaliar as correlações dos resultados obtidos para o bacterioma fecal, marcadores sistêmicos e fecais da inflamação com dados clínicos dos pacientes com COVID-19 e condição pós-COVID-19.

3 CASUÍSTICA, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Delineamento do estudo, aspectos éticos e instituições envolvidas

Este estudo observacional prospectivo multicêntrico foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Biociências (processo nº 4.310.336/2020) (Anexos 2). Todos os indivíduos incluídos neste estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 3).

A seleção e o recrutamento de pacientes com COVID-19 aguda foi realizado através da colaboração com o Prof. Dr. Carlos Magno Castelo Branco Fortaleza, do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, com o Prof. Dr. João Luiz Brisotti do Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, Secretaria de Saúde de Barretos, e com o Instituto de Hematologia de São José do Rio Preto.

A amostragem incluída no projeto foi por conveniência, de acordo com a possibilidade de acesso aos pacientes pelos pesquisadores envolvidos nas instituições parceiras, de outubro de 2020 a dezembro de 2021, utilizando a vacinação como critério de exclusão.

3.2 Casuística, coleta de amostras e biossegurança

Foram incluídos 220 pacientes, maiores de 18 anos, diagnosticados com COVID-19, através de avaliação clínica (sintomáticos entre 3-7 dias) e teste laboratorial padrão-ouro (RT-qPCR positivo para SARS-CoV-2 em secreção de nasofaringe). Os pacientes com COVID-19 foram recrutados em enfermarias, unidades de pronto atendimento e unidades de terapia intensiva (UTI) nas instituições colaboradoras do projeto. Os pacientes foram classificados em três grupos de gravidade com base na apresentação clínica: Leve (isolamento e recuperação domiciliar, com sintomas como febre, tosse, dor de garganta, cefaleia, fadiga ou perda de olfato e paladar); Moderada (evidência de acometimento do trato respiratório inferior, com saturação de oxigênio <94%, manejada com oxigenoterapia não invasiva); e Grave (necessidade de suporte respiratório avançado, incluindo oxigenoterapia invasiva, admissão em unidade de terapia intensiva ou ventilação mecânica (Gandhi *et al.*, 2020; Berlin *et al.*, 2020).

Os dados clínicos de todos os pacientes foram registrados, incluindo dados demográficos, antropométricos, testes realizados para COVID-19 (RT-PCR), dosagens de proteína C reativa, resultado da tomografia computadorizada de tórax (quando realizada), presença de comorbidades e medicamentos de uso contínuo, sintomas detalhados, dias de internação, número de dias na UTI, necessidade de suporte de oxigênio não-invasivo ou invasivo, sequelas/sintomas persistentes pós-COVID-19.

Indivíduos controles, maiores de 18 anos ($n = 97$), com testes negativos para COVID-19, foram incluídos no grupo controle (critérios de inclusão). Critérios de exclusão como doenças inflamatórias intestinais, cirurgias do trato gastrointestinal (bariátrica, colecistectomia, apendicectomia), uso de anti-inflamatórios/laxantes e antibióticos e imunossupressores nos últimos 60 dias foram aplicados ao grupo controle.

As amostras de sangue periférico foram coletadas por profissionais de saúde treinados, tomando todos os cuidados relacionados à segurança de todos os envolvidos na pesquisa, como utilização de aventais descartáveis, óculos de proteção, máscaras e luvas descartáveis. As amostras de fezes foram coletadas no momento da hospitalização e nos períodos pós-COVID-19 pelos próprios indivíduos, familiares ou profissionais de saúde treinados com todas as medidas de biossegurança. As amostras de fezes foram coletadas em frasco coletor universal e armazenadas em freezer -80°C. Todas as amostras de sangue, fezes, plasma e DNA foram armazenadas em um Biorepositório na UNESP até a finalização do projeto de pesquisa.

3.3 Extração de DNA, construção de bibliotecas e sequenciamento 16S

O DNA das 129 amostras de fezes foram extraídos utilizando o kit comercial *QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha). Primeiramente, foi adicionado aproximadamente 200 mg de fezes em um fálcon contendo 2 mL de tampão de lise (*InhibitEX Buffer*) e após as amostras foram homogenizadas em vortex e incubadas a 95°C por 5 minutos para que ocorra a lise das bactérias Gram-positivas. Depois do tempo de incubação as amostras foram centrifugadas 1 minuto em *full speed* e 200 µL do sobrenadante foi coletado em um eppendorf contendo 200 µL do *Buffer AI* e 15 µL da proteinase K, a amostra foi incubada novamente a 70°C por 10 minutos e após o tempo de incubação foi adicionado 200 µL de etanol e as amostras foram passadas em vortex novamente, 600 µL do conteúdo foi transferido para a *spin* coluna e após foi centrifugada a *full speed* por 1 minuto, depois da centrifugação o filtrado foi descartado e outro tubo de coleta foi adicionado ao filtro para a adição de 500 µL do *Buffer AW1* e novamente o tubo foi centrifugado em *full speed* por 1 minuto, depois da centrifugação o filtrado foi descartado e outro tubo de coleta foi adicionado ao filtro para a adição de 500 µL do *Buffer AW2* e novamente o tubo foi centrifugado em *full speed* por 3 minutos, depois da centrifugação o filtrado foi descartado e outro tubo de coleta foi adicionado ao filtro e foi centrifugado em *full speed* por 1 minuto sem a adição de nenhum buffer, ao final o filtro foi colocado no tubo de eppendorf devidamente nomeado com 200 µL do *Buffer ATE* e foi centrifugado em *full speed* por 1 minuto, o filtro foi descartado e o DNA presente no tubo foi armazenado no freezer a -30° de acordo com o protocolo do fabricante. A concentração inicial de DNA e a razão A260/A280 foram determinadas por espectrofotômetro *NanoDrop ND-1000* (Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA).

Para a construção das bibliotecas, a região V6 do 16S bacteriano foram amplificadas por PCR, utilizando os primers 1061R_A_Bc(CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC TCAG-NNNNNNNNN*-GATCRRACGAGCTGACGAC) e 784F trP1(CCTCTCTATG GGCAGTCGGTGATAGGATTAGATACCCTGGTA), os produtos de PCR derivados da amplificação de sequências de 16S rRNA foram purificados por separação eletroforética em um gel de agarose a 2% e o uso de um *Wizard SV Gen PCR Clean-Up System* (Promega, Charbonnières, França), seguido por uma etapa de purificação adicional envolvendo as esferas de purificação de DNA *Agencourt AMPure XP* (Beckman Coulter Genomics GmbH, Bernried, Alemanha) para remover dímeros de primer. A concentração de DNA da biblioteca de sequência amplificada foi estimada por meio da *Multitape Station* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). A partir da concentração

e do tamanho médio de cada biblioteca de amplicon, a quantidade de fragmentos de DNA por microlitro foi calculada e as bibliotecas para cada execução foram diluídas para moléculas de DNA 3E9 antes da amplificação clonal. A PCR emulsão foi realizada usando o *Ion OneTouch 200 Template Kit v2 DL* (Life Technologies, Monza, Itália) de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento das bibliotecas de *amplicon* foi realizado em um chip 316 usando o sistema *Ion Torrent PGM* e empregando o kit *Ion Sequencing 200* (Life Technologies) de acordo com as instruções do fornecedor (Candon et al., 2015). Arquivos *FASTQ* separados por código de barras foram enviados individualmente para o pré-processador de sequenciamento de próxima geração (NGS) *RipSeq* (iSentio). Este software permite a remoção de leituras curtas e o corte de primers antes que leituras idênticas sejam recolhidas em grupos separados que são posteriormente agrupados em unidades taxonômicas operacionais (OTUs) com base em um limite de similaridade configurável. A variante de sequência mais dominante de cada OTU é selecionada e listada junto com as sequências representativas das outras OTUs daquela amostra em um arquivo *FASTA* (Kommedal et al., 2014). As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Guariz Pinheiro da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP de Jaboticabal.

3.4 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo

Amostras de sangue periférico de pacientes com COVID-19 e controles foram colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA (Tubos BD Vacutainer® EDTA K2, 1 x 4 mL). As amostras foram centrifugadas a 2.000g por 10 minutos. As concentrações plasmáticas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF foram realizadas por citometria de fluxo (FACSCanto II) utilizando-se o *BD™ Cytometric Bead Array (CBA)* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas para a construção da curva padrão, que variava de 0 a 1:256 dos padrões Th1/Th2/Th17 liofilizados. Após o preparo da curva foi realizado a mistura das beads, elas foram primeiramente agitadas em vortex e agrupadas em um mesmo tubo falcon, depois foram centrifugadas a 200g por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado, o pellet foi ressuspensionado com *Serum Enhancement Buffer* e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, protegidos da luz. Foram adicionados 50 μ L das diluições padrão de citocinas e 50 μ L de cada amostra aos tubos devidamente rotulados, após 28 μ L do reagente de detecção PE foi adicionado a todos os tubos e incubado à temperatura ambiente protegidos de luz por 3 horas. Após a incubação foi adicionada 800 μ L de *Wash Buffer* a cada tubo de ensaio e foram centrifugados a 200g por 5 minutos, depois da centrifugação

o sobrenadante foi descartado e foi resuspendido com 200µL de *Wash Buffer*. A aquisição dos resultados foram realizadas em citômetro de fluxo *FacsCanto II* (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) e os resultados foram expressos após conversão da intensidade média de fluorescência em pg/mL. Esta etapa foi realizada em colaboração com o Laboratório de Citometria de Fluxo do Departamento de Genética, Microbiologia e Imunologia do IBB/UNESP.

3.5 Dosagem de proteína C reativa (PCR), zonulina (ZO-1) e Fator de crescimento transformador beta (TGF-β) por ELISA

Amostras de sangue periférico de pacientes com COVID-19 e controles foram colhidas em tubos contendo o anticoagulante EDTA (Tubos BD Vacutainer® EDTA K2, 1 x 4 mL). As amostras foram centrifugadas a 2.000g por 10 minutos. O plasma foi utilizado para a detecção das concentrações de PCR utilizando o kit comercial *Human C-Reactive Protein ELISA Kit* (Elabscience, Bethesda, MD, EUA). Foram realizadas diluições seriadas para a construção da curva padrão, que variava de 0 a 25 ng/mL de PCR.

A dosagem sérica de zonulina foi realizada por ensaio imunoenzimático, com utilização de kit comercial *Human Zonulin ELISA kit* (Elabscience, Bethesda, MD, EUA). Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas para a construção da curva padrão, que variava de 0 a 50 ng/mL de zonulina.

A dosagem sérica de TGF-β foi realizada por ensaio imunoenzimático, com utilização de kit comercial *Human TGF-β ELISA kit* (Elabscience, Bethesda, MD, EUA). Primeiramente, foram realizadas diluições seriadas para a construção da curva padrão, que variava de 0 a 2000 ng/mL.

Tanto para a dosagem de PCR, zonulina e TGF-β foram adicionados 100 µL das amostras de plasma (sem diluir) e dos pontos da curva padrão às placas. Após um período de incubação de 90 minutos a 37°C, foram acrescentados 100 µL de anticorpos l;marcados (*Biotinylated detection antibody working solution*) e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após este período, quatro sequências de lavagens com 350 µL de tampão foram realizadas para remover ligações inespecíficas. Então, foram adicionados 100 µL do conjugado (*HRP conjugate working solution*) seguidos de incubação de 30 minutos a 37°C. Os poços da placa foram lavados novamente por cinco vezes (com 350 µL de tampão) e 90 µL do substrato foi adicionado e incubado por 15 minutos a 37°C, protegidos da luz. A solução de parada foi acrescentada (50 µL) a cada poço da placa e a densidade óptica (DO) foi lida a 450 nm em espectrofotômetro (BioTek

microplaca EPOCH2NS).

As curvas de calibração foram construídas em planilhas do excel utilizando-se a fórmula $y = ax + b$, sendo x e y duas variáveis dependentes (DO e concentração). As concentrações foram calculadas convertendo a densidade óptica (variável x) em ng/mL (variável y).

3.6 Dosagem de IgA secretora e calprotectina nas fezes por ELISA

A dosagem de IgA secretora foi realizada por ensaio imunoenzimático, utilizando-se o kit comercial *Human IgA (Immunoglobulin A) kit* (Elabscience, Bethesda, MD, EUA). A dosagem de calprotectina nas fezes dos pacientes e controles foi realizada utilizando o kit comercial, de acordo com o protocolo do fabricante (*Human CALP ELISA Kit*, DBR Biotech).

Primeiramente 200 mg das amostras de fezes foram suspendidas em PBS (0,01M, Ph=7,4), foram homogeneizadas no vortex e ficaram no gelo por 15 minutos. Após, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 5000xg na temperatura de 2 – 8 °C e o sobrenadante foi coletado após a centrifugação para a realização do ELISA. Para a realização do ensaio, foram realizadas diluições seriadas para a construção da curva padrão, que variava de 0 a 100 ng/mL de sIgA. Foram adicionados 100 µL das amostras de fezes (diluídas) e dos pontos da curva padrão às placas. Após um período de incubação de 90 minutos a 37°C, foram acrescidos 100 µL de anticorpos marcados (*Biotinylated detection antibody working solution*) e a placa foi novamente incubada por 1 hora a 37°C. Após este período, três sequências de lavagens com 350 µL de tampão foram realizadas para remover ligações inespecíficas. Então, foram adicionados 100 µL do conjugado (*HRP conjugate working solution*) seguidos de incubação de 30 minutos a 37°C. Os poços da placa foram lavados novamente por cinco vezes (com 350 µL de tampão) e 90 µL do substrato foi adicionado e incubado por 15 minutos a 37°C, protegidos da luz. A solução de parada foi acrescida (50 µL) a cada poço da placa e a densidade óptica (DO) foi lida a 450 nm em espectrofotômetro (BioTek microplaca EPOCH2NS).

As curvas de calibração foram construídas em planilhas do excel utilizando-se a fórmula $y = ax + b$, sendo x e y duas variáveis dependentes (DO e concentração). As concentrações foram calculadas convertendo a densidade óptica (variável x) em ng/mL (variável y). A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda 450 nm e os resultados expressos em µg/mL.

3.7 Análise de bioinformática e estatística

A qualidade inicial das sequências foi aferida utilizando o programa *FastQC* (v.0.11.9) (Andrews, 2010). As leituras foram então submetidas ao *pipeline* “DADA2” (v.1.22.0) (Callahan et al., 2016) por meio do pacote correspondente no programa estatístico *R* (v.4.1.2) (R Core Team, 2023). As etapas de controle de qualidade incluíram truncagem de tamanho (*truncLen* = 250), remoção da extremidade inicial (*trimLeft* = 10) e filtragem de qualidade (*maxEE* = 2) pela função *filterAndTrim*. As sequências variantes de amplicons (ASVs) foram identificadas para cada amostra, e as possíveis sequências quiméricas foram filtradas utilizando a função *removeBimeraDenovo*. A classificação taxonômica foi realizada através da função *assignTaxonomy*, utilizando o banco de dados de referência RDP (v.18) (Cole, 2004). As ASVs também foram alinhadas com *BLAST* (Altschul et al., 1990) contra o banco de dados *NCBI RefSeq 16S rRNA*.

A relação filogenética entre as ASVs foi estabelecida com o algoritmo *Neighbor-Joining* por meio da função *NJ* e validada estatisticamente pelo método *bootstrap* com a função *bootstrap.pml*, ambas do pacote *R phangorn* (v.2.10.0) (Schliep, 2011). As contagens, anotações taxonômicas e a árvore filogenética foram exportadas no formato *phyloseq* (Pacote *R phyloseq*) (v.1.38.0) (McMurdie; Holmes, 2013). O objeto *phyloseq* foi transformado em dados composicionais pela função *phyloseq_standardize_otu_abundance* do pacote *metagMisc*(v.0.04) (Mikryukov, 2022) para as análises subsequentes.

A cobertura do sequenciamento foi avaliada através das curvas de rarefação, geradas com a função *amp_rarecurve* do pacote *ampvis2* (v.2.7.17) (Andersen et al., 2018). Para a alfa diversidade, estimaram-se a riqueza observada e índices de diversidade (Shannon, Gini-Simpson e Faith's Phylogenetic Diversity) com a função *alpha* do pacote *microbiome* (v.1.16.0) (Lahti; Shetty, 2012). A beta diversidade foi analisada por meio dos índices de dissimilaridade de Bray-Curtis, Jaccard e UniFrac (Weighted e Unweighted), obtidos pela função *distance* do pacote *phyloseq*. A dispersão das amostras dentro de cada grupo também foi avaliada.

As métricas de alfa diversidade, dispersão das distâncias e abundâncias relativas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis ($P < 0,05$). Quando os dados apresentaram significância, as médias foram comparadas pelo teste post-hoc de Wilcoxon pareado a 5% de probabilidade ($p < 0,05$). Para avaliar as diferenças na beta diversidade entre os grupos, utilizou-se a Análise de Variância Multivariada Permutacional

(PERMANOVA) pela função *adonis2* do pacote *vegan* (v.2.6.4) (Oksanen et al., 2022). A análise post-hoc foi realizada com a função *pairwise.adonis* (*R package pairwiseAdonis*) (v.0.4) (Arbizu, 2017). As distâncias multidimensionais foram ordenadas por Análise de Coordenadas Principais (PCoA). As representações gráficas das análises foram geradas no programa “R” com o uso do pacote *ggplot* (v.3.5.1) (Wickham, 2016).

Para os demais dados, a amostra foi caracterizada através de tabelas de frequências para as variáveis categóricas e usando medidas de tendência central (média, mediana) e de dispersão (desvio padrão, mínimo e máximo) para as quantitativas. Para verificar a distribuição normal das variáveis quantitativas foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Wilk (*GraphPad Prism 8*). Foram utilizados os testes de Kruskal-Wallis e comparações múltiplas de Dunn para verificar diferenças entre as concentrações de citocinas, zonulina e sIgA entre pacientes com COVID-19, CPC e controles, com nível de significância de 0,05. Para a correlação dos dados do bacterioma fecal e citocinas, zonulina e proteína C reativa foi utilizado o Coeficiente de Correlação de Spearman.

3.8 Gestão de dados

Todos os dados gerados foram depositados no Repositório Institucional da UNESP (<https://hdl.handle.net/11449/310336>) e os dados brutos do sequenciamento foram depositados no repositório NCBI Sequence Read Archive (SRA), sob o número BioProject PRJNA1189098.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS DOS PACIENTES

Foram incluídos 220 pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, dos quais 79 estavam na fase aguda e 141 na condição pós-COVID-19 (CPC), distribuídos entre os quatro centros participantes: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Botucatu, Hospital Santa Casa de Misericórdia de Ribeirão Preto, Secretaria de Saúde de Barretos e Instituto de Hematologia de São José do Rio Preto.

O grupo controle (CTL) foi composto por 97 indivíduos, sendo 85% de mulheres e 15% de homens, com idade média de 44 anos. No grupo com COVID-19 aguda, a distribuição revelou que 58% dos pacientes avaliados eram do sexo feminino e 42% do sexo masculino. A idade variou de 19 a 86 anos, com média de 52 anos. Em relação à forma aguda da doença, os pacientes foram classificados como leves ($n = 28$), moderados ($n = 41$) e graves ($n = 10$), apresentando manifestações clínicas como: cefaleia (dor de

cabeça) em 46,53% dos pacientes; ageusia (perda do paladar), 35,64%; mialgia (dor muscular), 35,64%; odinofagia (dor de garganta), 22,77%; dispneia (falta de ar), 16,83%; diarreia, 14,85%; tosse, 6,93%; anosmia (perda completa do olfato), 6,93%; febre, 5,94%; e náusea, 5,94%.

No grupo CPC, 62% dos pacientes eram do sexo feminino e 38% do sexo masculino, a idade dos pacientes variou entre 18 anos e 79 anos, com idade média de 41 anos, sendo classificados como casos leves ($n = 114$), moderados ($n = 13$) e graves ($n = 15$) quando os pacientes estavam com a condição aguda da doença. Os enfermos com a condição pós-COVID-19 relataram que tiveram os seguintes sintomas durante o período agudo da doença, sendo cerca de 46,52% dos pacientes relataram tosse, 43,75% febre, 41,66 % dispneia (termo médico usado para falta de ar), 39,58% mialgia (presença de dor muscular), 31,25% cefaleia (dor de cabeça), 29,16% diarreia, 21,52% anosmia (perda completa do olfato), 17,36% odinofagia (dor de garganta), 14,58% ageusia (perda do paladar) e 6,25% náusea. Na CPC a variação em dias de permanência de sintomas variou entre 27 dias até 230 dias, apresentando sequelas após a resolução da COVID-19, como: cansaço, queda capilar, unhas fracas, formigamento dos membros, memória ruim, perda do paladar e olfato sem retorno completo e parosmia, porém nós não temos os dados das sequelas de todos os pacientes, pois a maioria das coletas foram realizadas em 2020 e a condição pós-covid ainda não era descrita.

O agravamento da COVID-19 depende de diversos fatores, como idade, condição física e comorbidades. O índice de massa corporal (IMC) variou de baixo peso a obesidade grau II na condição aguda da doença. Cerca de 1,98% dos pacientes estavam abaixo do peso ($IMC < 18,5$); 41,58% eram eutróficos ($IMC < 25$); 28,71% apresentavam sobrepeso ($IMC < 29,9$); e 27,72% eram obesos ($IMC \geq 30$). Entre os pacientes com a forma leve, 2,32% estavam abaixo do peso, 39,55% eram eutróficos, 32,55% apresentavam sobrepeso e 25,58% eram obesos, sendo 63,63% com obesidade grau I, 36,36% com obesidade grau II e nenhum caso de obesidade grau III. Dentre os pacientes com a forma moderada, 2,08% estavam abaixo do peso, 43,76% eram eutróficos, 27,08% apresentavam sobrepeso e 27,08% eram obesos, sendo 76,92% com obesidade grau I, 15,38% com obesidade grau II e 7,69% com obesidade grau III. Por fim, entre os pacientes com a forma grave, 40% eram eutróficos, 20% apresentavam sobrepeso e 40% eram obesos, sendo 25% com obesidade grau I, 25% com obesidade grau II e 50% com obesidade grau III. Em relação ao índice de massa corporal (IMC), na CPC a classificação variou entre baixo peso a obesidade grau III apresentando média de 28,66, cerca de 0,69% dos pacientes estavam abaixo do peso ($IMC < 18,5$), 26,38% eram eutróficos (IMC

<25), 34,02%% estavam com sobrepeso (IMC < 29,9) e 38,88% com obesidade (IMC >30). A forma da doença variou entre leve, moderada e grave, a predominância foi da forma leve com 79,17%, a forma moderada apresentou 9,72% e a grave 11,11%. Dentre os pacientes com a forma leve, 0,69 % estavam abaixo do peso, 52,79 % dos pacientes eram eutróficos, 22,91 % estavam com sobrepeso e 23,61% eram obesos, sendo 78,78% com obesidade grau I, 18,18% obesidade grau II e 3,04% obesidade grau III. Dentre os pacientes com a forma moderada, 7,14% dos pacientes eram eutróficos, 14,28% estavam com sobrepeso e 78,58% eram obesos, sendo 30% com obesidade grau I, 40% obesidade grau II e 30% obesidade grau III. Dentre os pacientes com a forma grave, 12,5 % dos pacientes eram eutróficos, 31,25 % estavam com sobrepeso e 56,25% eram obesos, sendo 66,66% com obesidade grau I, 33,33% obesidade grau II e nenhum paciente apresentou obesidade grau III.

As concentrações de proteína C reativa (PCR) foram significativamente mais altas nos pacientes com COVID-19 aguda, quando comparadas com os pacientes com CPC ($P < 0,001$). A **Tabela 1** resume os aspectos clínicos e demográficos dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e dos indivíduos controle.

Tabela 1: Dados clínicos e demográficos dos pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e dos controles.

	COVID-19 (n = 79)	CPC (n = 141)	CTL (n = 97)
Sexo			
Feminino/Masculino	46 F/ 33 M	88 F/ 53 M	83 F/ 14 M
Idade (anos)			
Média ± DP	51,8 ± 16,3	40,8 ± 13,9	43,8 ± 13,6
IMC (Kg/m²)			
Média ± DP	28,6 ± 6,2	29,1 ± 5,4	25,2 ± 4,8
PCR (mg/dL)			
Média ± DP	78,6 ± 67,0	8,4 ± 9,6	-

F: feminino; M: masculino; DP: desvio padrão; IMC: índice de massa corporal; PCR: proteína C reativa.

Outro fator influente sobre a evolução da doença foram as comorbidades relatadas pelos pacientes. Verificou-se que, na condição aguda da doença, houve predomínio de obesidade (26,73%), hipertensão (25,74%), diabetes (15,84%), transplante renal (6,93%), hipotireoidismo (1,98%), asma (0,99%) e arritmia (0,99%). As principais comorbidades relatadas pelos pacientes com CPC foram obesidade com (38,88%), hipertensão (18,05%), hipotireoidismo (7,63%), rinite alérgica (5,5%), arritmia (4,16%), depressão (3,47%), enxaqueca (2,77%), asma (2,77%) e diabetes (2,08%).

Para o tratamento da COVID-19 aguda foram utilizados diferentes tipos de medicamentos, de acordo com as necessidades clínicas de cada paciente, como antibióticos, antitérmicos, antigripais, antivirais, entre outras classes. Os antibióticos foram os mais consumidos, com aproximadamente 57,63% dos pacientes fazendo uso, sendo a ceftriaxona utilizada por 31,94% e a azitromicina por 25,69%. Em seguida, destacou-se o uso do anti-inflamatório e imunossupressor dexametasona (29,86%). Cerca de 8,33% dos pacientes utilizaram colchicina, medicamento geralmente prescrito para controlar a dor e a inflamação em episódios agudos de gota, mas cujo uso foi relatado entre os pacientes com COVID-19. Além disso, 3,47% utilizaram metilprednisolona, um corticosteroide com ação anti-inflamatória; 2,77% fizeram uso de enoxaparina, indicada para o tratamento de trombose venosa; antialérgicos e antigripais foram consumidos por 2,97% dos pacientes; e o fármaco antiviral oseltamivir foi utilizado por 0,69%. Os pacientes com CPC fizeram uso quando apresentavam sintomas da COVID-19 aguda. O antibiótico foi a classe de medicamento, especificamente a azitromicina, relatado por 69,44% dos pacientes, seguido da ivermectina com 34,02%, usado contra várias espécies de parasitas e vermes, 19,44% utilizaram dexametasona, 14,58% os antialérgicos, 6,94% hidroxicloroquina, indicado para tratamento de doenças reumáticas e dermatológicas, 4,86% usaram Oseltamivir com função antiviral, 1,38% colchicina e 0,69% os antigripais.

4.2 PERFIL DO BACTERIOMA EM PACIENTES INFECTADOS PELO SARS-CoV-2

Para investigar alterações significativas no bacterioma intestinal de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, realizamos o sequenciamento 16S e avaliamos as métricas de diversidade alfa e beta. Observamos diferenças significativas ($P < 0,001$) nos índices de riqueza, Chao1, Shannon ($P = 0,010$) e diversidade filogenética de Faith nas amostras dos pacientes (COVID-19 e CPC) em comparação ao grupo controle (**Figura 1A-D**). Adicionalmente, detectamos diferenças significativas ($P < 0,001$) nas comunidades microbianas dos pacientes com COVID-19 e CPC, em relação aos controles, com diferentes agrupamentos na análise de coordenadas principais (**Figura 2A-F**).

Em relação à análise de abundância relativa e distribuição taxonômica, observamos diferenças significativas ($P < 0,001$) entre os grupos COVID-19 e CPC em relação aos controles nos filos Bacteroidota (anteriormente denominado Bacteroidetes) (22,4% vs. 21,9% vs. 73,3%) e Bacillota (anteriormente denominado Firmicutes) (67,9% vs. 68,6% vs. 24,2%) (**Figura 3A**). Além disso, observamos redução na abundância das famílias *Prevotellaceae* (4,4% vs. 5,1% vs. 31,2%) e *Bacteroidaceae* (12,3% vs. 11,7% vs. 28,7%)

nos grupos COVID-19 e CPC, bem como um aumento das famílias *Ruminococcaceae* (31,5% vs. 24,9% vs. 12,2%) e *Lachnospiraceae* (28,8% vs. 30,4% vs. 8,9%), em comparação com o grupo controle. A família *Enterobacteriaceae* também apresentou aumento significativo ($P = 0,013$) no grupo COVID-19 (4,6% vs. Controles 0,28%) (**Figura 3B**). Por fim, os gêneros *Bacteroides* (8,9% vs. 7,5% vs. 21,6%), *Prevotella* (3,7% vs. 4,5% vs. 29,7%) e *Alistipes* (2,0% vs. 1,8% vs. 5,4%) estavam significativamente reduzidos nos grupos COVID-19 e CPC, enquanto *Blautia* (7,1% vs. 6,4% vs. 0,71%), *Agathobacter* (4,1% vs. 7,1% vs. 0,85%) e *Escherichia-Shigella* (0,64% vs. 0,50% vs. 0,19%) apresentaram aumento, em relação aos controles (**Figura 3C-I**).

A análise de abundância diferencial entre os grupos revelou alterações significativas na composição da microbiota fecal em nível de filo. Em comparação ao grupo controle (CTL), indivíduos com COVID-19 aguda apresentaram redução significativa na proporção do filo Bacteroidetes ($p = 2,21e^{-7}$) e aumento nas proporções dos filos Firmicutes ($p = 2,95e^{-6}$) e Actinobacteria ($p = 2,60e^{-4}$). De forma semelhante, o grupo CPC também apresentou diminuição de Bacteroidetes ($p = 1,52e^{-13}$) e aumento de Firmicutes ($p = 1,21e^{-12}$) e Actinobacteria ($p = 1,24e^{-9}$), em relação aos controles (**Figura 4A – B**).

A análise de abundância diferencial da microbiota intestinal revelou alterações significativas na composição bacteriana entre os grupos estudados. Na comparação entre indivíduos controles (CTL) e pacientes com COVID-19, observou-se redução nas proporções médias relativas de famílias como *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* e *Rikenellaceae* no grupo COVID-19. Por outro lado, famílias como *Ruminococcaceae* e *Lachnospiraceae* apresentaram maior abundância relativa nesse grupo. Essas diferenças foram estatisticamente significativas ($p < 0,05$), conforme indicado pelos intervalos de confiança de 95% para as proporções médias. De forma semelhante, a comparação entre controles (CTL) e indivíduos com COVID persistente (CPC) demonstrou disbiose intestinal mais acentuada. Famílias como *Peptostreptococcaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae* e *Bifidobacteriaceae* apresentaram maior abundância no grupo CPC, enquanto *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae* e *Rikenellaceae* foram significativamente reduzidas (**Figura 5A-B**). Esses achados indicam que tanto a infecção aguda por SARS-CoV-2 quanto a CPC estão associadas a alterações na composição da microbiota intestinal, caracterizadas por perda de famílias comensais e enriquecimento de famílias potencialmente patobiontes. As diferenças foram altamente significativas, com valores de p inferiores a 0,001 para diversas famílias bacterianas. As proporções médias foram transformadas pela raiz quadrada e as diferenças foram expressas com intervalos de confiança de 95%.

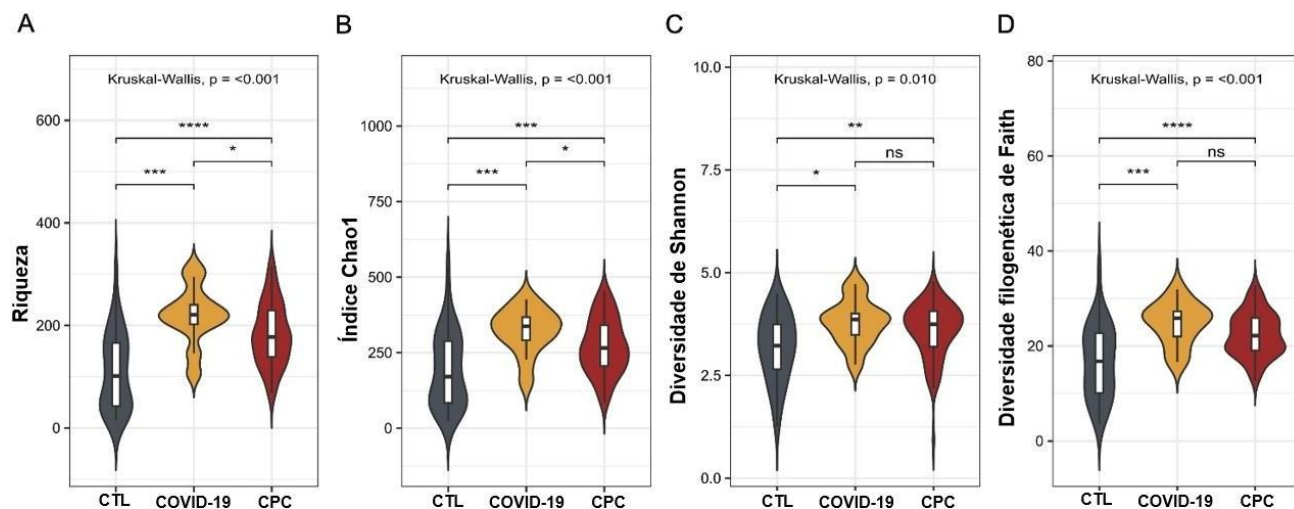


Figure 1: Análise de diversidade alfa do bacterioma intestinal de indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC). (A) Riqueza; (B) Índice Chao1; (C) Diversidade de Shannon; (D) Diversidade filogenética de Faith. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$.

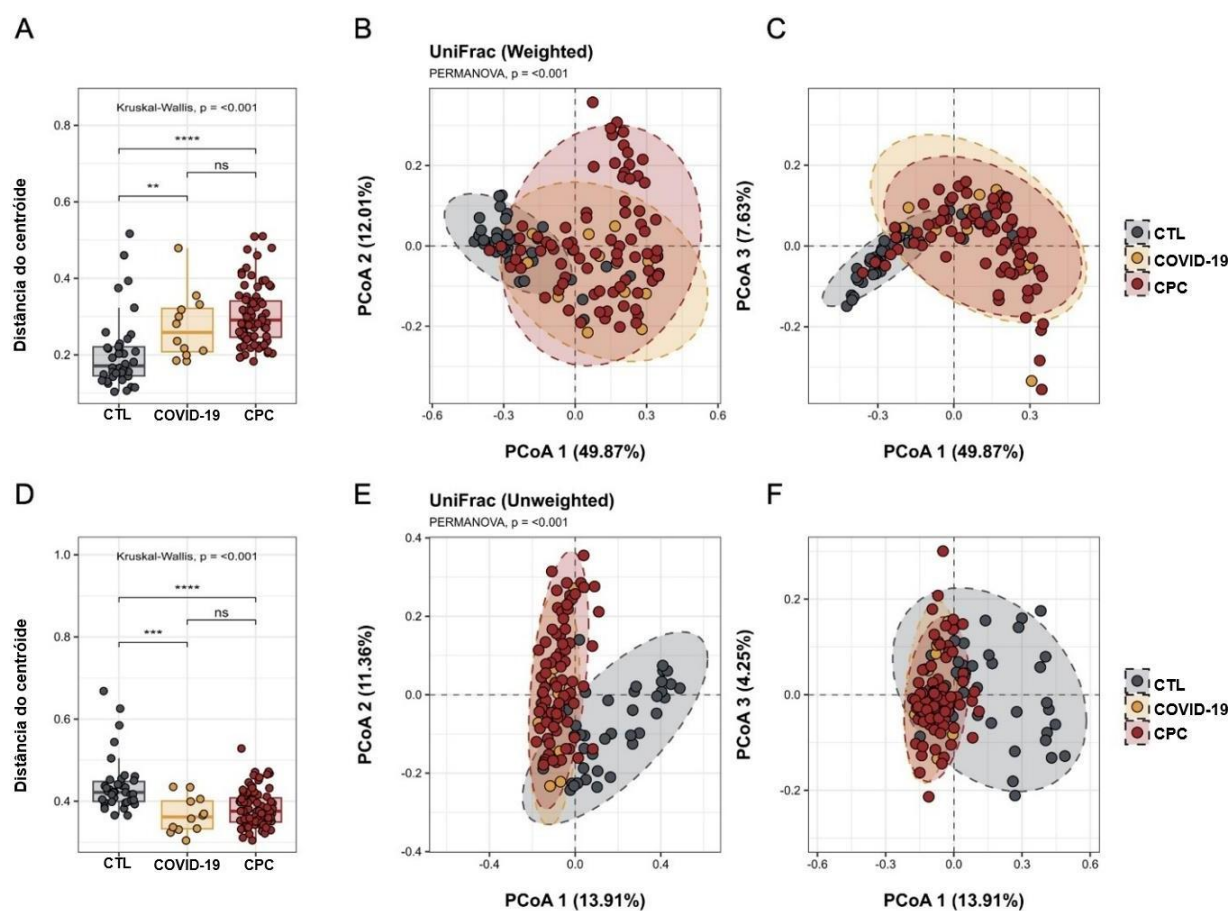


Figura 2: Análise de diversidade beta do bacterioma intestinal de indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC) usando métricas UniFrac ponderadas e não ponderadas. (A,D)

Distâncias do centroide; (B,C,E,F) Análise de coordenadas principais com diferentes agrupamentos. . ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, ns: $p \geq 0.05$.

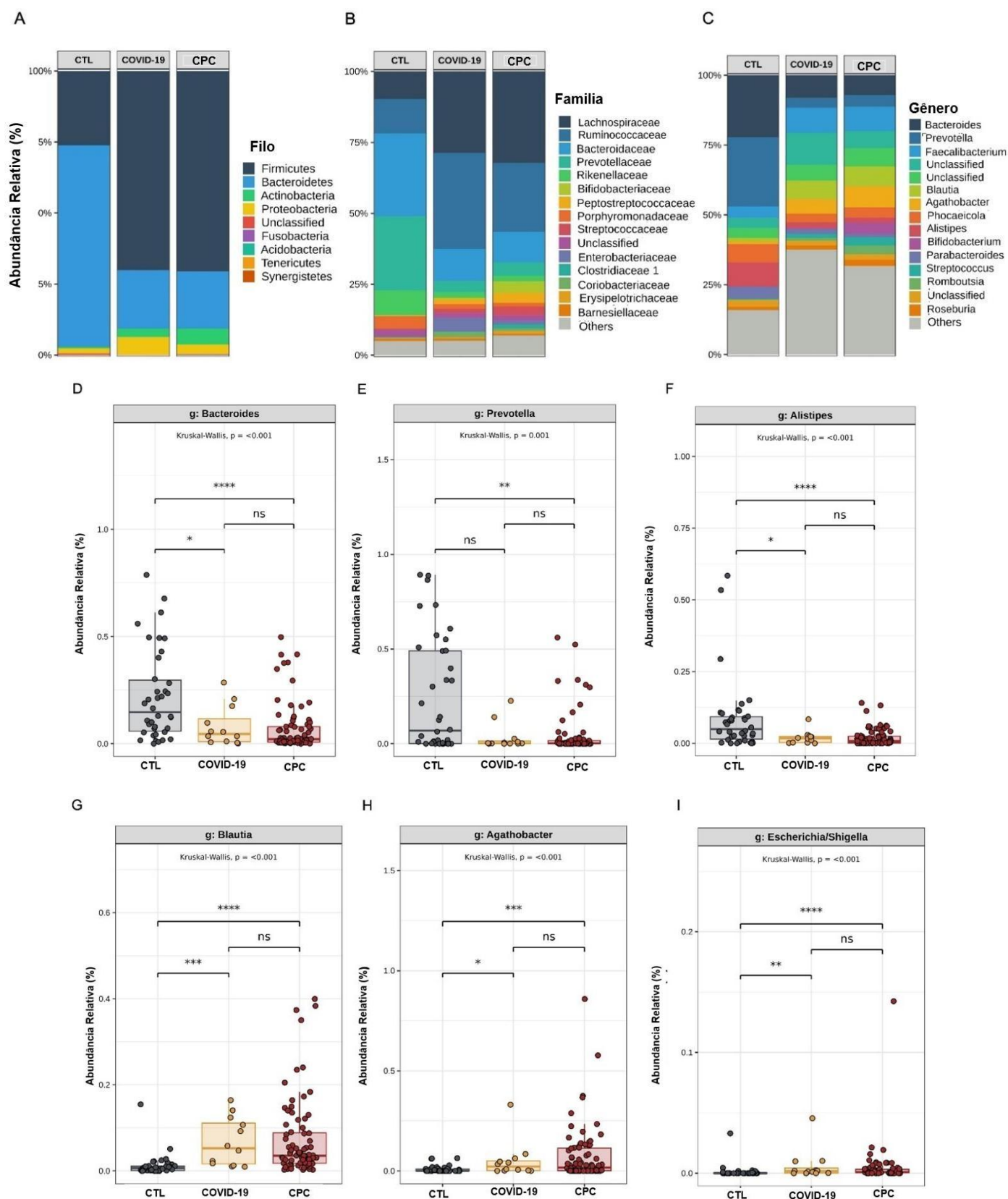


Figura 3: Distribuição taxonômica e abundância relativa do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC). (A-C) Abundâncias de táxons (D-I) Análise de abundância diferencial de gêneros. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$.

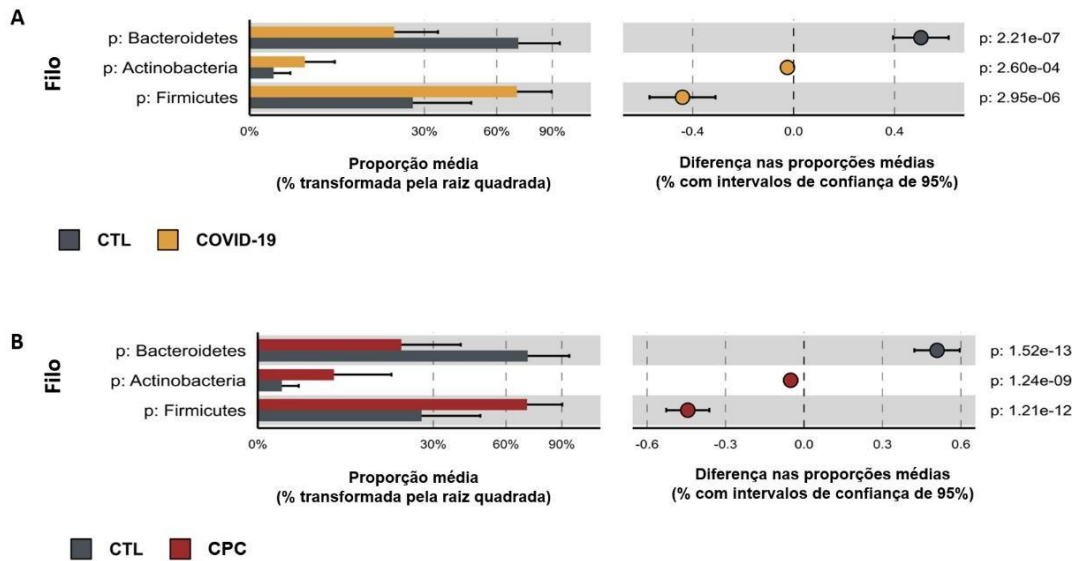
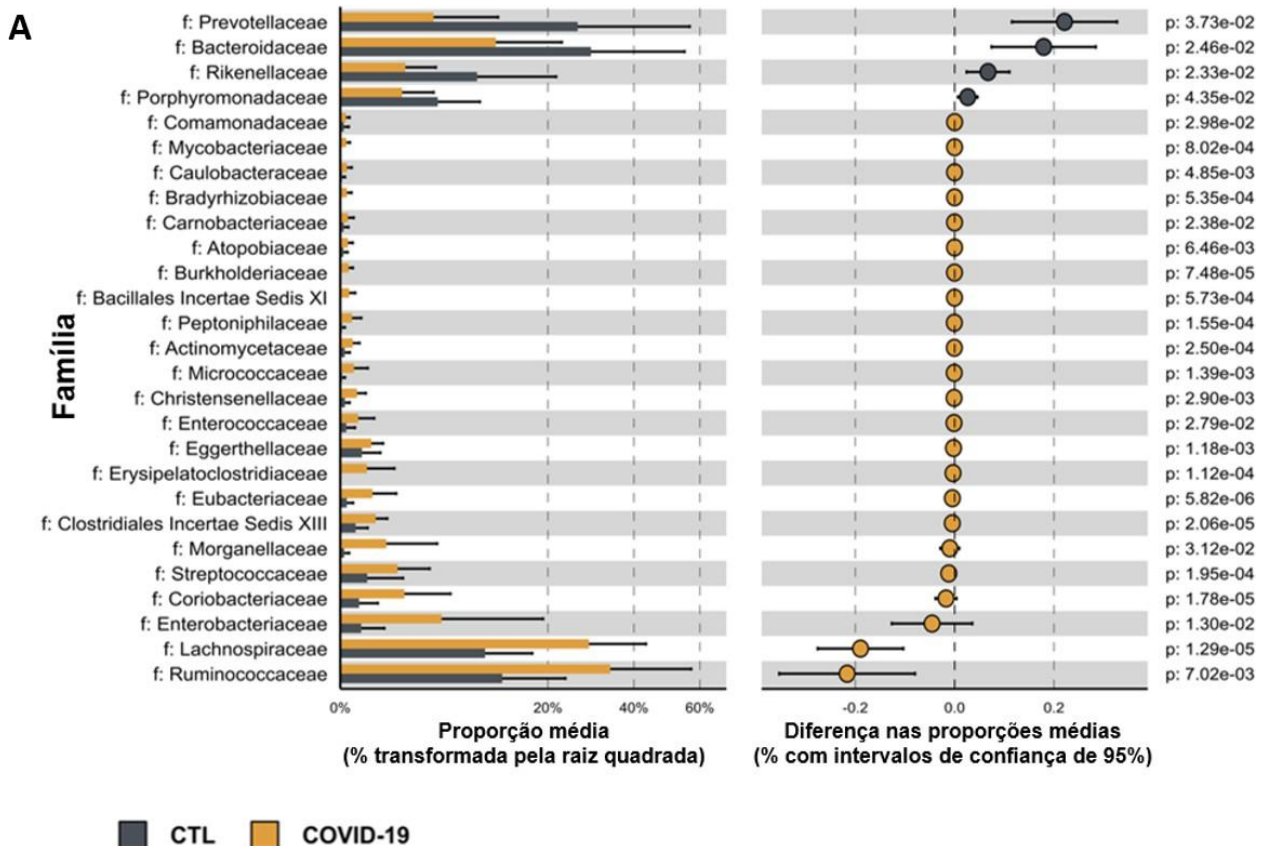


Figura 4: Distribuição taxonômica e abundância diferencial do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda(A) e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC)(B). Análise de abundância diferencial de filo. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$. As proporções médias foram transformadas pela raiz quadrada e as diferenças foram expressas com intervalos de confiança de 95%.



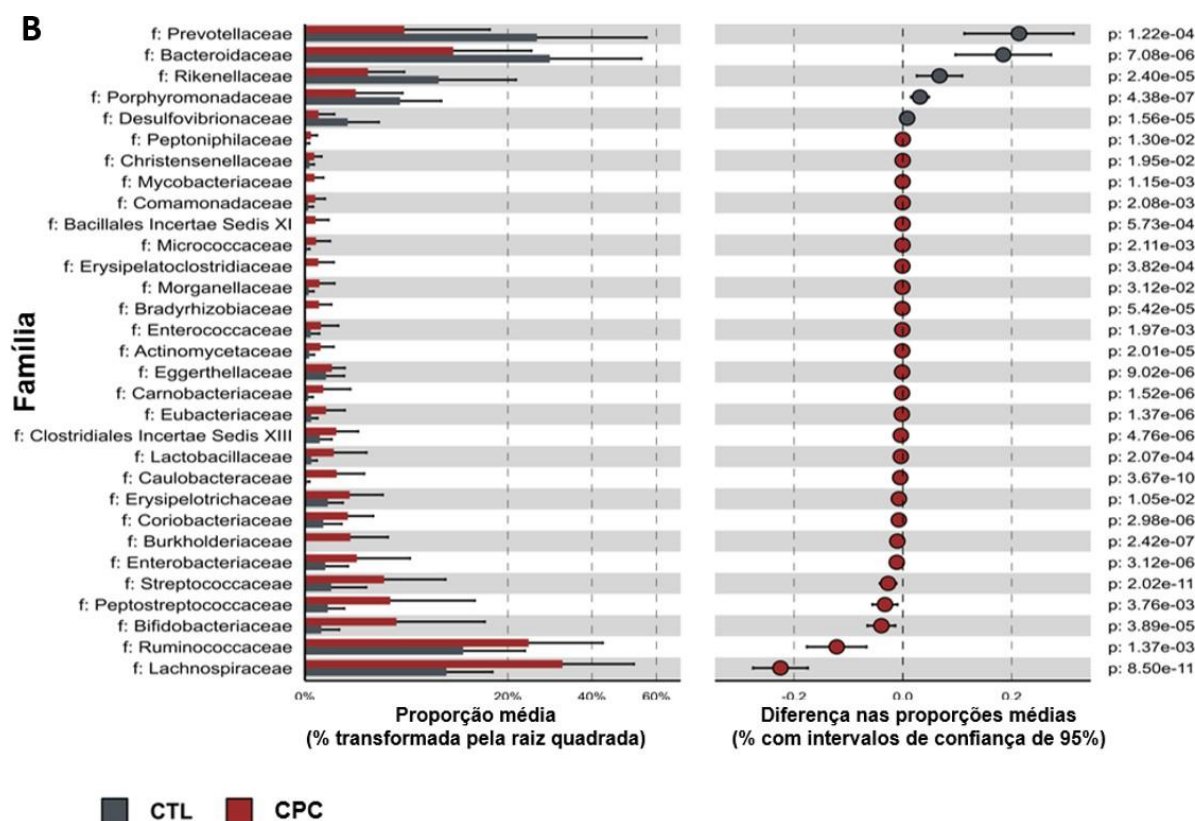


Figura 5: Distribuição taxonômica e abundância diferencial do bacterioma intestinal em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda(A) e pacientes com condição pós-COVID-19 (PCC)(B). Análise de abundância diferencial de família. ****: $p < 0.0001$, ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, ns: $p \geq 0.05$. As proporções médias foram transformadas pela raiz quadrada e as diferenças foram expressas com intervalos de confiança de 95%.

4.3 AVALIAÇÃO DA SAÚDE INTESTINAL NOS PACIENTES

Considerando as alterações detectadas no bacterioma intestinal de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, procedemos à análise da integridade funcional da barreira intestinal por meio da quantificação dos níveis plasmáticos de zonulina, da IgA secretora e da calprotectina fecal. Identificamos um aumento significativo ($p < 0,001$) nas concentrações plasmáticas de zonulina em pacientes com COVID-19 ($60 \pm 3,9$ ng/ml) e com CPC ($64 \pm 0,9$ ng/ml), quando comparados ao grupo controle (19 ± 3 ng/ml) (**Figura 6A**). Por outro lado, os níveis fecais de IgA secretora em pacientes com COVID-19 (220 ± 29 ng/ml) e CPC (214 ± 11 ng/ml) não apresentaram diferenças significativas em relação ao grupo controle (184 ± 13 ng/ml) (**Figura 6B**). De maneira semelhante, as concentrações de calprotectina nas amostras fecais de pacientes com COVID-19 ($8,323 \pm 11,48$) e CPC ($6,919 \pm 8,364$) não mostraram alterações estatisticamente significativas comparadas ao grupo controle ($3,406 \pm 4,951$) (**Figura 6C**).

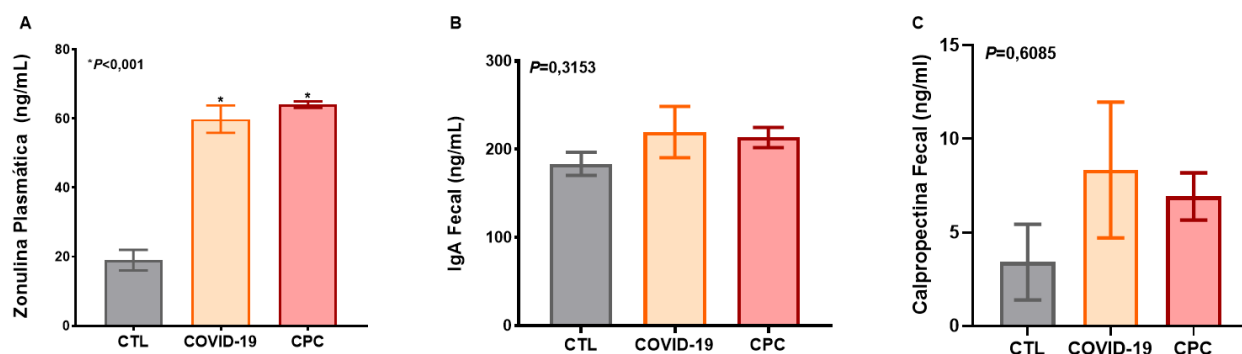


Figura 6: Concentrações plasmáticas de zonulina (A), IgA secretora fecal (B) e calprotectina fecal (C) em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes com condição pós-COVID-19 (CPC). Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.4 AVALIAÇÃO DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS NO SANGUE

A avaliação dos marcadores inflamatórios indicou uma ativação exacerbada do sistema imunológico em pacientes com COVID-19. A concentração de proteína C reativa (PCR) esteve significativamente aumentada nos indivíduos com infecção aguda ($117,9 \pm 8,77$ mg/L), quando comparada ao grupo controle ($63,57 \pm 9,55$ mg/L). Para investigar a produção de citocinas circulantes nesses pacientes e nos indivíduos controle, realizamos a quantificação das concentrações plasmáticas de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ , TGF- β e TNF. Observamos aumentos significativos nas concentrações de IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ em pacientes com COVID-19 (IL-2: $1,6 \pm 0,46$ pg/mL; IL-6: $9,7 \pm 2,0$ pg/mL; IL-17A: 84 ± 20 pg/mL; IFN- γ : $0,66 \pm 0,20$ pg/mL) e CPC (IL-2: $0,67 \pm 0,23$ pg/mL; IL-6: $3,5 \pm 0,56$ pg/mL; IL-17A: $29 \pm 6,0$ pg/mL; IFN- γ : $0,57 \pm 0,16$ pg/mL), quando comparados ao grupo controle (IL-2: $0,38 \pm 0,05$ pg/mL; IL-6: $1,4 \pm 0,25$ pg/mL; IL-17A: $0,40 \pm 0,20$ pg/mL; IFN- γ : $0,34 \pm 0,09$ pg/mL) (**Figura 7A-E**). Em contrapartida, não foram detectadas

diferenças significativas nas concentrações de IL-4, IL-10, TGF- β e TNF entre os pacientes infectados pelo SARS-CoV-2 e nos controles.

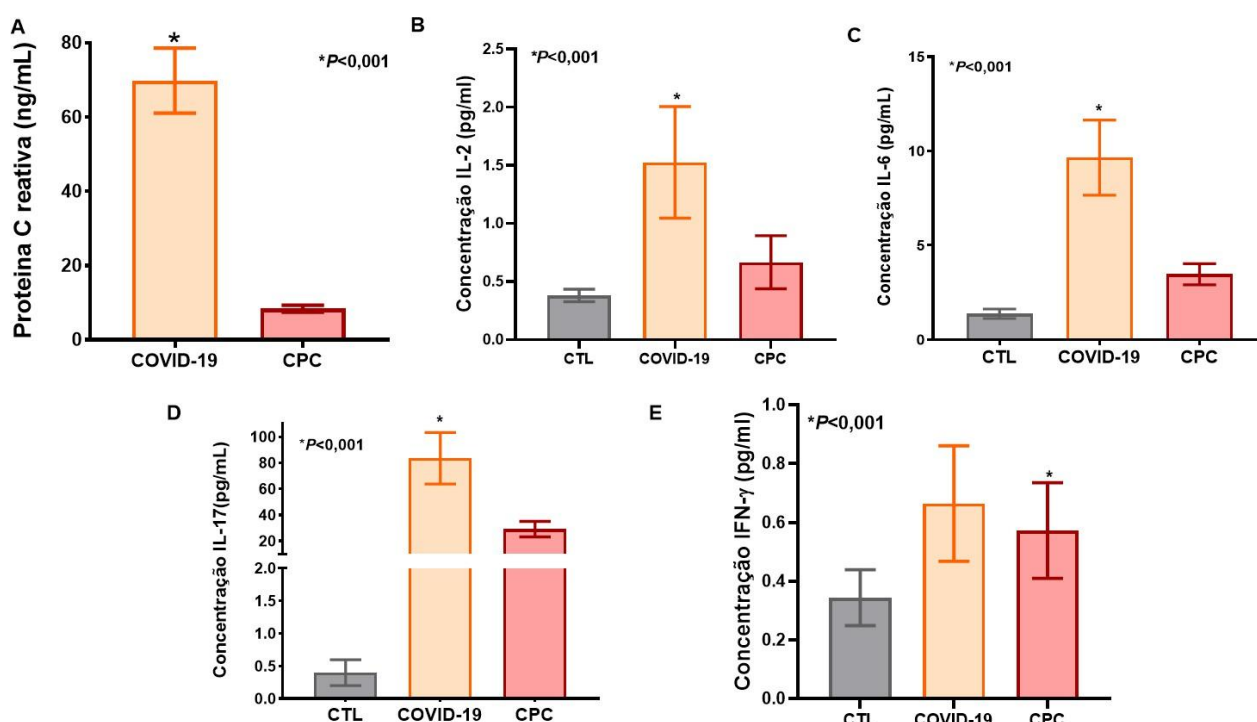


Figura 7: Marcadores inflamatórios presente no sangue. (A) Concentrações da proteína C reativa em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda. Concentração plasmática das citocinas em indivíduos controles (CTL), pacientes com COVID-19 aguda e pacientes em condição pós-COVID-19 (CPC) (B) IL-2, (C) IL-6, (D) IL-17A e (E) IFN- γ . Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

4.5 CORRELAÇÕES ENTRE O BACTERIOMA E MARCADORES INFLAMATÓRIOS

Diante das diferenças significativas identificadas no bacterioma intestinal de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2, realizamos uma investigação para avaliar possíveis correlações entre os táxons bacterianos e parâmetros clínicos e laboratoriais. Em pacientes com CPC, não foram observadas correlações moderadas ou fortes entre a composição taxonômica e os dados clínicos e laboratoriais. Por outro lado, em pacientes com COVID-19, alguns gêneros bacterianos que apresentaram aumento diferencial mostraram correlação significativa com os níveis de proteína C reativa, incluindo *Schaalia* ($r = -0,87$; $p < 0,001$), *Ihubacter* ($r = -0,85$; $p < 0,001$), *Lactonifactor* ($r = 0,78$; $p = 0,004$), *Neglecta* ($r = 0,67$; $p = 0,014$) e *Granulicatella* ($r = -0,54$; $p = 0,046$) (**Figura 8A**).

Em relação à permeabilidade intestinal, identificamos que alguns táxons diferencialmente aumentados em pacientes com COVID-19 apresentaram correlação significativa com as concentrações de zonulina. Destacam-se as correlações positivas com *Enterobacteriaceae* ($r = 0,94$; $p = 0,008$), *Escherichia-Shigella* ($r = 0,88$; $p = 0,016$) e

Peptoniphilus ($r = 0,77$; $p = 0,05$), bem como correlações negativas com *Ruminococcaceae* ($r = -0,88$; $p = 0,016$) e *Intestinimonas* ($r = -0,92$; $p = 0,011$) (**Figura 8B-C**). Embora não tenhamos detectado diferenças nos níveis fecais de IgA entre pacientes e controles, observamos algumas correlações inversas moderadas a fortes com alguns táxons diferencialmente aumentados na COVID-19, incluindo *Bacillota* ($r = 0,54$; $p = 0,035$), *Prevotellaceae* ($r = -0,62$; $p = 0,017$), *Schaalia* ($r = -0,83$; $p < 0,001$), *Granulicatella* ($r = -0,65$; $p = 0,013$), *Actinomyces* ($r = -0,55$; $p = 0,035$), *Ihubacter* ($r = -0,53$; $p = 0,038$), *Collinsella* ($r = -0,51$; $p = 0,045$). Além disso, observamos uma forte correlação positiva dos níveis de IgA com o filo *Bacillota* ($r = 0,54$; $p = 0,035$) e o gênero *Lactonifactor* ($r = 0,79$; $p = 0,002$) (**Figura 8D-E**).

Alguns gêneros diferencialmente expressos em pacientes com COVID-19 apresentaram correlação significativa com as concentrações de IL-6, incluindo correlação positiva com *Gemella* ($r = 0,58$; $p = 0,025$) e correlações negativas com *Lactonifactor* ($r = -0,58$; $p = 0,025$) e *Anaerobutyricum* ($r = -0,52$; $p = 0,042$) (**Figura 8F**). De maneira semelhante, identificamos correlações positivas entre determinados gêneros e as concentrações de IL-2, destacando-se *Erysipelatoclostridium* ($r = 0,77$; $p = 0,003$), *Anaerostipes* ($r = 0,58$; $p = 0,025$), *Eggerthella* ($r = 0,56$; $p = 0,032$), *Ruthenibacterium* ($r = 0,55$; $p = 0,032$) e *Anaerobutyricum* ($r = 0,52$; $p = 0,042$) (**Figura 8G**). Adicionalmente, observamos correlações positivas entre os níveis plasmáticos de IFN- γ e os táxons *Bacillota* ($r = 0,70$; $p = 0,006$) e *Lachnospiraceae* ($r = 0,55$; $p = 0,034$) (**Figura 8H**).

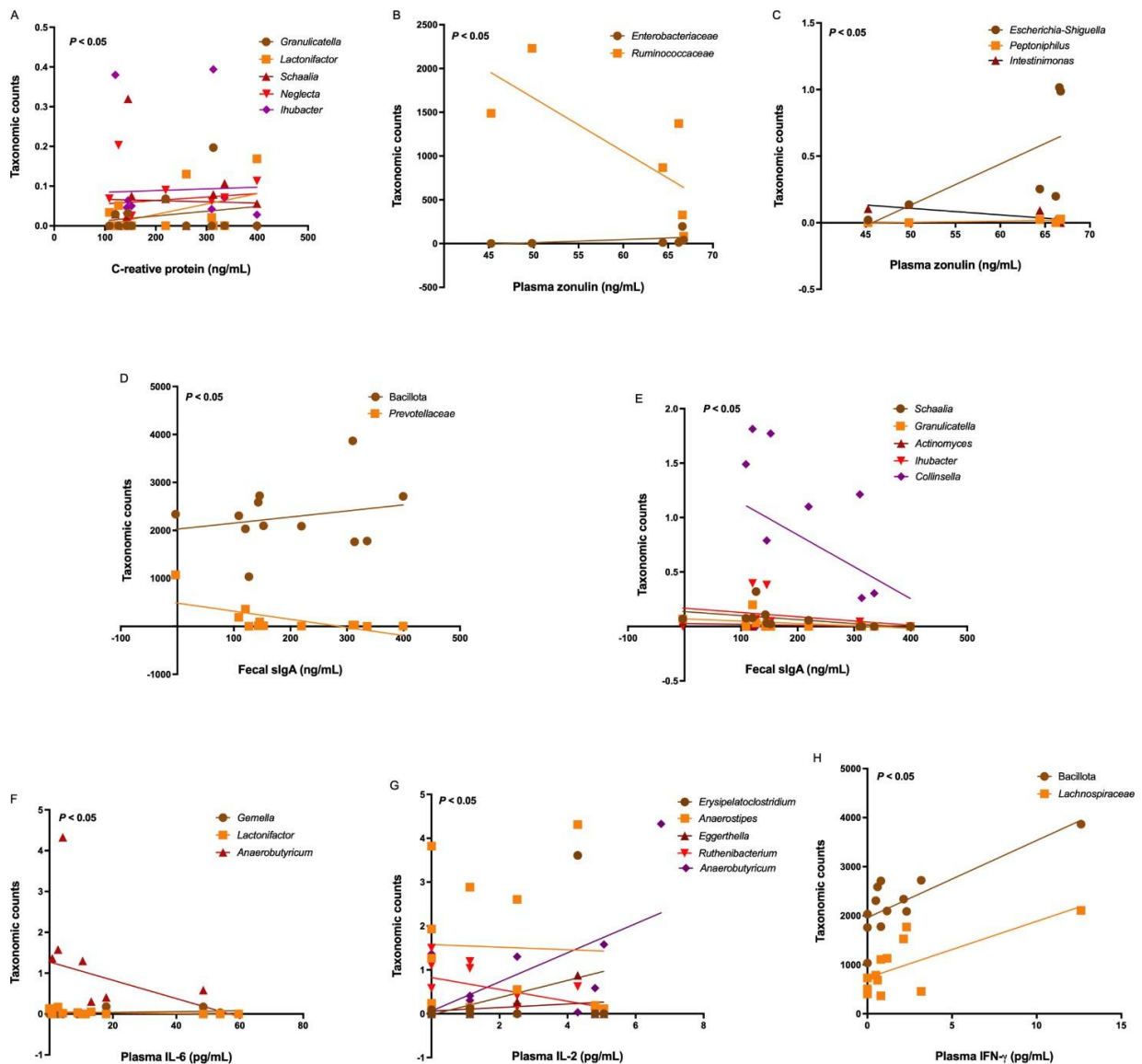


Figura 8: Correlações entre táxons bacterianos e dados clinicolaboratoriais em pacientes com COVID-19 aguda. (A) Proteína C-reativa com gêneros diferencialmente aumentados. (B-C) Níveis plasmáticos de zonulina com famílias e gêneros diferencialmente aumentados. (D-E) Níveis fecais de sIgA com alguns gêneros diferencialmente aumentados. (F-H) Concentrações plasmáticas de IL-6, IL-2 e IFN- γ com táxons diferencialmente aumentados.

4.6 ANÁLISE ESTRATIFICADA DOS MARCADORES INFLAMATÓRIOS E DE SAÚDE INTESTINAL

Os marcadores inflamatórios e de saúde intestinal foram estratificados conforme a idade dos pacientes, a forma clínica da COVID-19 aguda (leve, moderada e grave), o sexo (feminino e masculino) e o número de dias pós-COVID (D+30 até D $\geq$ 180). Em relação à idade, observam-se diferenças significativas nas concentrações das citocinas IL-6 e IL-17A, especialmente na faixa etária de 51-60 anos nos pacientes com COVID-19 (IL-6: $10,42 \pm 1,17$; IL-17A: $338 \pm 142,7$) quando comparada aos pacientes com CPC (IL-6: $2,65 \pm 1,02$; IL-17A: $25,01 \pm 10,68$) e aos controles (IL-6: $1,08 \pm 0,29$; IL-17A: $0,30 \pm$

0,30). Na faixa etária de de 40 a 50 anos, também foi detectado aumento significativo da IL-6 em pacientes com COVID-19 (IL-6: $33,50 \pm 20,33$) em comparação aos pacientes com CPC (IL-6: $4,14 \pm 1,52$) e ao grupo controle (IL-6: $0,88 \pm 0,24$) (**Figura 9A-B**). Quanto à permeabilidade intestinal, os níveis de zonulina foram aumentados na faixa etária de 30-40 anos nos pacientes com CPC (Zo-1: $192,8 \pm 20,12$) quando comparado aos pacientes com COVID-19 (Zo-1: $181,5 \pm 38,21$) e aos controles (Zo-1: $2,25 \pm 0,91$). Da mesma forma, em indivíduos acima de 52 anos, as concentrações de zonulina foram elevadas nos pacientes com CPC (Zo-1: $237,2 \pm 21,50$), em relação aos pacientes com COVID-19 (Zo-1: $249,4 \pm 53,12$) e aos controles (Zo-1: $2,37 \pm 0,69$) (**Figura 9C**). Destaca-se que a citocina IL-6 apresentou concentrações mais elevadas nos pacientes com a forma moderada da doença (IL-6: $21,05 \pm 8,04$), em comparação àqueles com formas leve (IL-6: $4,62 \pm 1,33$) e grave (IL-6: $11,78 \pm 0,0$) da COVID-19 (**Figura 9A**). Em relação ao período pós-COVID-19, a IL-6 esteve aumentada nos pacientes no intervalo de 30 dias após a fase aguda (IL-6: $9,35 \pm 3,45$), em comparação aos controle (IL-6: $1,38 \pm 0,25$) (**Figura 9B**). Por outro lado, não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ , TGF- β , IgA, calproectina e proteína C reativa (PCR) entre os grupos analisados, quando estratificadas.

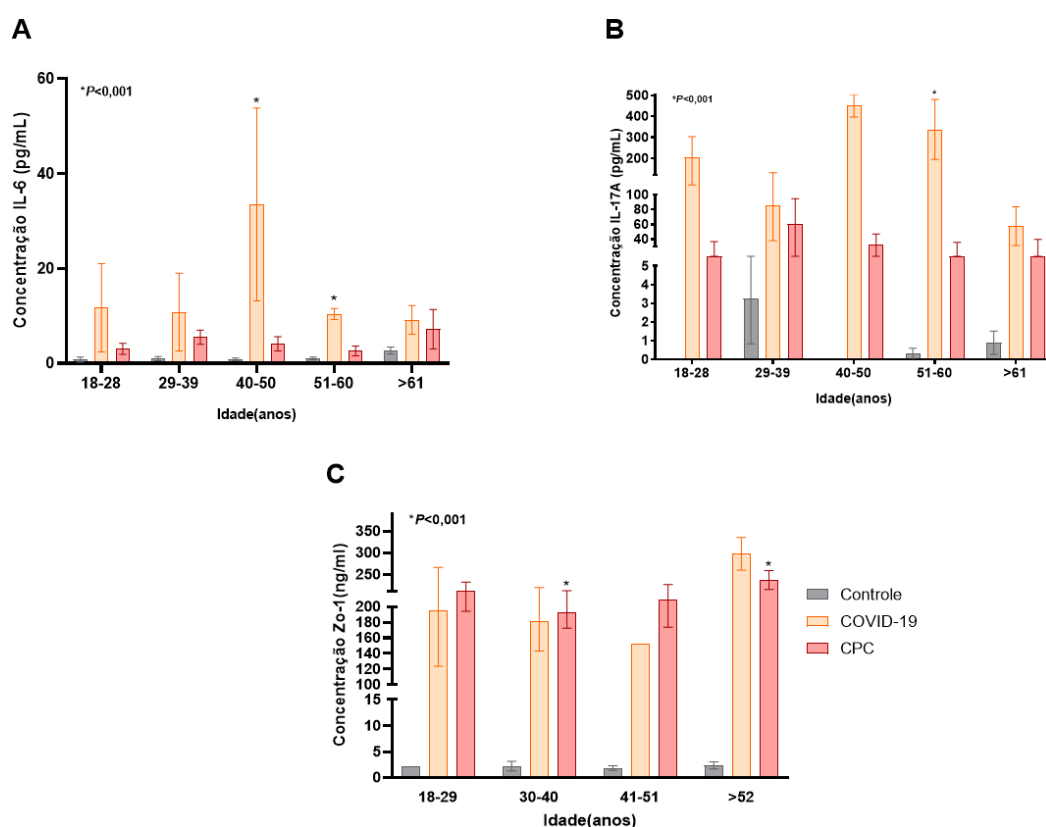


Figura 9: Estratificação das concentrações plasmáticas de citocinas e permeabilidade intestinal em diferentes faixas etárias, (A) de IL-6; (B) IL-17A e (C) Zo-1. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média.

5 DISCUSSÃO

A doença COVID-19, causada pelo SARS-CoV-2, causando a síndrome respiratória aguda grave, resultou em significativa morbidade e mortalidade em âmbito global. Nos estágios iniciais da pandemia, a ausência de terapias eficazes levantou temores de colapso dos sistemas de saúde devido ao aumento expressivo de casos críticos (Shant, *et al.*, 2024). Embora inicialmente se esperasse que a infecção por SARS-CoV-2 fosse transitória em indivíduos imunocompetentes, evidências demonstraram que, em um subconjunto de pessoas com CPC, o vírus pode persistir, sugerindo a existência de um reservatório viral (Proal *et al.*, 2025). Frente a isso, o uso de biomarcadores auxilia na detecção da presença ou ausência de uma doença, monitorando variações em seu curso clínico, identificando as populações em risco de progressão da doença e determinando a probabilidade de eventos adversos (Karim *et al.*, 2024).

O trato gastrointestinal humano abriga um ecossistema microbiano extenso e complexo, conhecido como microbiota intestinal. Essa comunidade é composta predominantemente por bactérias, mas também inclui arqueias, fungos e vírus. As bactérias, por sua vez, representam o grupo dominante e exercem um papel fundamental na manutenção do equilíbrio microecológico intestinal, além de influenciarem diretamente diversos aspectos da saúde do hospedeiro (Ye *et al.*, 2025). A interação entre a microbiota intestinal e pulmonar ocorre por meio do eixo intestino-pulmão, um sistema de comunicação bidirecional no qual endotoxinas e metabólitos microbianos podem influenciar a função pulmonar pela circulação sistêmica (Alves *et al.*, 2025). Essa inter-relação fundamenta-se na origem embrionária comum e em similaridades estruturais do trato respiratório e gastrointestinal (Haldar *et al.*, 2023). Até o momento, faltam estudos que caracterizem o perfil do bacterioma em pacientes brasileiros infectados pelo SARS-CoV-2 e seu impacto sobre a permeabilidade intestinal e os níveis de citocinas inflamatórias sistêmicas. No presente estudo observacional, avaliamos o bacterioma e a integridade da barreira intestinal em pacientes com COVID-19 aguda e com condição pós-COVID-19 (CPC), correlacionando-os a citocinas inflamatórias sistêmicas numa coorte pré-vacinação no Brasil.

Estudos anteriores relataram alterações significativas na microbiota intestinal (bacterioma/micobioma) em pacientes com COVID-19 aguda, incluindo redução na riqueza e diversidade microbiana, predominância de microrganismos oportunistas e comprometimento na biossíntese de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (Zuo *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2021; Yeoh *et al.*, 2021; Nobre *et al.*, 2022; Yokoyama

et al., 2024; Shimizu *et al.*, 2024). Alguns autores identificaram uma "impressão digital" da microbiota associada à gravidade e mortalidade, sugerindo potencial valor preditivo (Bucci *et al.*, 2023; Zhong *et al.*, 2024). Além disso, foi documentada uma redução acentuada de microrganismos comensais, com correlação inversa com citocinas pró-inflamatórias e gravidade da doença (Zuo *et al.*, 2020; Gu *et al.*, 2020; Zuo *et al.*, 2021; Yeoh *et al.*, 2021; Nagata *et al.*, 2023). Notavelmente, mais de 20% dos adultos com COVID-19 não se recuperaram completamente após três meses, e o desequilíbrio da microbiota intestinal persiste mesmo após a negatização do vírus SARS-CoV-2 e a resolução dos sintomas respiratórios (Yeoh *et al.*, 2021; An *et al.*, 2024). Estudos recentes mostraram disbiose intestinal em pacientes com CPC e sugeriram uma relação entre as sequelas de longo prazo, a disbiose intestinal e disfunções imunológicas (Chen, Y *et al.*, 2022; Liu *et al.*, 2022; Ferreira-Junior *et al.*, 2022; Zhang *et al.*, 2022; Su *et al.*, 2024; Blankestijn *et al.*, 2025). Nosso estudo confirmou diferenças significativas nos índices de diversidade alfa e beta na COVID-19 aguda e na CPC, comparativamente aos controles, com aumento de microrganismos patogênicos (*Enterobacteriaceae*, *Escherichia-Shigella*) e redução de comensais (*Blautia*, *Alistipes*), em concordância com estudos anteriores. No entanto, não foi possível identificar biomarcadores confiáveis de gravidade da doença, provavelmente devido ao número limitado de casos graves em nossa coorte.

A imunoglobulina A (IgA) desempenha um papel significativo na imunidade da mucosa ao neutralizar vírus nos estágios iniciais da infecção (Abdul-Kareem *et al.*, 2023). A IgA surgiu recentemente como um indutor de imunidade ativa, controlando a produção de citocinas como IL-6, IL-23, IL-1 β e TNF por células imunes mieloides humanas, o que é uma etapa crítica no controle da imunidade local e sistêmica. Estudos anteriores relataram alta produção de IgA na fase aguda da COVID-19 e uma diminuição acentuada de IgA nos meses seguintes (Sousa *et al.*, 2023). Em contraste, nossos dados não evidenciaram alterações significativas nos níveis de IgA na fase aguda nem redução marcante na CPC, divergindo da literatura.

Estudos anteriores investigaram a relevância entre a permeabilidade intestinal e a gravidade da COVID-19, foi observado que os níveis de zonulina em pacientes com COVID-19 moderada e grave aumentaram notavelmente em comparação com COVID-19 leve e grupos de controle saudáveis (Giron *et al.*, 2021). Como um biomarcador de extravasamento da barreira epitelial e translocação bacteriana, os pesquisadores investigaram se altos níveis de DNA bacteriano circulante no soro estão ligados à gravidade da doença e demonstram que a translocação bacteriana está associada à gravidade da COVID-19. Demonstrando também que a translocação de componentes

bacterianos pró-inflamatórios através de uma barreira epitelial comprometida para a circulação sistêmica, afeta os resultados da COVID-19 (Yazici *et al.*, 2023). Confirmamos aumento da permeabilidade intestinal em nossa coorte, com níveis elevados de zonulina plasmática em pacientes com COVID-19 aguda e CPC, além de forte correlação positiva com abundância de membros da família *Enterobacteriaceae* e *Escherichia-Shigella*, sugerindo o envolvimento de uma tríade composta por disbiose intestinal, aumento da permeabilidade intestinal e inflamação sistêmica em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

A calprotectina é proteína de fase aguda com efeitos antimicrobianos contra diversos patógenos bacterianos e fúngicos, seus níveis tendem a se elevar em resposta a infecções, traumas e condições inflamatórias, como artrite reumatoide, espondilite anquilosante e doença inflamatória intestinal (DII), atuando como um biomarcador útil no diagnóstico acompanhamento clínico. Dentre suas formas de dosagem, a calprotectina fecal destaca-se como um dos principais indicadores não invasivos para o monitoramento da atividade e recorrência da DII (Zhang *et al.*, 2024b). Pacientes com diarreia apresentam níveis aumentados de IL-6 sistêmica e calprotectina fecal, que são indicadores de inflamação intestinal e integridade intestinal rompida, como uma camada de muco afinada e junções estreitas reduzidas entre os enterócitos (Kim, 2021). Em nosso estudo, não observamos alterações significativas nos níveis fecais de calprotectina em pacientes com COVID-19 aguda ou CPC.

A Proteína C reativa (PCR), um marcador de fase aguda produzida pelo fígado, a expressão do gene PCR em hepatócitos e a subsequente biossíntese da proteína aumentam dramaticamente em resposta a citocinas pró-inflamatórias produzidas durante a inflamação aguda (Agrawal; Wu, 2024). A PCR é uma proteína de fase aguda cuja concentração pode aumentar mais de 1000 vezes em estados inflamatórios (Che *et al.*, 2024). Concentrações elevadas de PCR foram observadas em infecções bacterianas, infecções virais graves (como pneumonia por influenza H1N1) e, atualmente, na infecção por SARS-CoV-2 (Singh *et al.*, 2024). Estudos relataram que os níveis de PCR são significativamente elevados e associados à gravidade da doença em pacientes com COVID-19 grave, sugerindo que o nível sérico de PCR é um biomarcador útil para prever a gravidade da doença. (Agrawal, A ; Wu, 2024). Nossos resultados mostraram PCR significativamente maior na COVID-19 aguda em comparação à CPC, alinhando-se à maioria dos achados da literatura.

Com relação à imunidade sistêmica na COVID-19 aguda, estudos clínicos demonstraram um aumento significativo de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (IL-

1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-15, IFN- γ , TNF, MCP-1), caracterizando a tempestade de citocinas (Qin *et al.*, 2020; Darif *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2021; Zanza *et al.*, 2022; Deng *et al.*, 2024; Islam *et al.*, 2024; Safont *et al.*, 2024). A entrada do SARS-CoV-2 nos pulmões induz uma resposta inflamatória, iniciada por macrófagos e pneumócitos residentes ativados. Essa resposta resulta na superprodução de citocinas pró-inflamatórias, levando à apoptose das células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular, exsudação pulmonar, hipóxia e eventual falência de múltiplos órgãos (Alkhattabi *et al.*, 2024). As citocinas são uma ampla classe de pequenas proteínas secretadas que agem local ou sistemicamente ligando-se a receptores cognatos em células-alvo, que por sua vez desencadeiam a sinalização a jusante e orquestram atividades entre os tipos de células do sistema imunológico (Cui *et al.*, 2024). Estudos relataram que pacientes que sofrem de COVID-19 grave apresentam uma quantidade aumentada de citocinas inflamatórias (Zanza *et al.*, 2022). A tempestade de citocinas, caracterizada por altos níveis de citocinas inflamatórias, está intimamente ligada à síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) e aos desfechos da COVID-19 (Deng *et al.*, 2024). Estudos demonstraram que pacientes com COVID-19 tinham concentrações circulantes significativamente maiores de IL-6 e TNF (Velavan; Meyer, 2020). A IL-6, produzida em resposta a danos teciduais e infecções, incluindo durante certas infecções virais, pode favorecer a sobrevivência do vírus e/ou a piora do quadro clínico. Assim, níveis excessivos de IL-6 em pacientes com COVID-19 estão associados a formas graves da doença, incluindo inflamação pulmonar, lesão pulmonar e falência múltipla de órgãos. IFN- γ , o principal ativador de macrófagos e neutrófilos e produzido por células NK, linfócitos T e outras células do sistema imunológico, também foi relatado como tendo um papel importante na imunidade inata e adaptativa (Islam *et al.*, 2024). Assim como demonstrado em outros trabalhos, a IL-6 e o IFN- γ apresentaram alteração significativa na fase aguda da COVID-19. Outros estudos demonstraram que a combinação de IFN- γ com IL-2 aumenta a detecção de respostas em indivíduos na fase aguda e convalescente, sendo que a resposta de IFN- γ desempenha um papel durante a fase aguda da doença, enquanto a IL-2 está associada à imunidade de longo prazo, seja por infecção natural ou vacinação. (Safont *et al.*, 2024).

Em pacientes com COVID-19 a concentração de IL-2 foi observado o aumento dos níveis séricos, em pacientes graves e não graves quando comparado com controles saudáveis (Chang *et al.*, 2022). Outro trabalho também encontrou a maior concentração de IL-2 no grupo de pacientes com infecção recente, o que se expressou na relação entre a concentração desta citocina e a concentração de anticorpos SARS-CoV-2 da classe IgA + IgM (Łodyga *et al.*, 2024). A IL-6 e o IFN- γ foram significativamente aumentadas na

condição aguda da doença como demonstrado em outros trabalhos, entretanto os nossos resultados apresentaram alteração significativa da IL-2 na condição aguda da doença e na condição pós-COVID. A IL-4 demonstra sua natureza anti-inflamatória ao causar uma regulação positiva dos inibidores de certas citocinas e eliminar os receptores (Renu *et al.*, 2020), níveis aumentados de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, IFN- γ) também são observados em pacientes com COVID-19 (Hu *et al.*, 2021). A indução precoce de IL-10 após a infecção por COVID-19 durante a fase de imunidade inata no pulmão provavelmente serve como uma contramedida à inflamação causada por outras citocinas pró-inflamatórias. À medida que os níveis de IL-10 endógena aumentam, ela funciona como um agente imunoativador/pró-inflamatório para estimular a produção de membros da tempestade de citocinas (Islam *et al.*, 2024). O aumento crítico de IL-10 em pacientes com COVID-19 é atualmente indicado como uma característica de hiperinflamação durante a infecção, e vários estudos relataram que os níveis de IL-10, bem como a presença de alta frequência de células T reguladoras produtoras de IL-10, representam um marcador preditor para a gravidade da doença (Amodio *et al.*, 2022). Entretanto, a partir dos resultados obtidos em nosso estudo, não foi possível detectar diferença significativamente aumentada da IL-4 em pacientes com COVID-19 e CPC como relatado em outros estudos. Diferente deste trabalho da literatura, em nosso estudo não encontramos diferenças significativas nas concentrações plasmáticas de IL-4 e IL-10 de pacientes com COVID-19 aguda e condição pós-COVID.

A produção de IL-17A, uma citocina com papel protetor e patogênico, é a marca registrada da resposta Th17. A IL-17A tem a capacidade de ativar uma ampla gama de vias inflamatórias, que podem causar danos aos tecidos e agravamento da doença (Martonik *et al.*, 2023). A IL-17, uma citocina pró-inflamatória, foi observada em níveis elevados no sangue periférico de pacientes infectados por SARS-CoV-2. Esta citocina pode desencadear várias citocinas inflamatórias, incluindo IL-6, IL-1 β , IL-1 e IL-8 (Zendejas-Hernandez *et al.*, 2024) e quando em conjunto com a IL-22 são citocinas que desempenham um papel fundamental na proteção e regeneração dos tecidos da mucosa (Aksakal; Gorgun, 2024). Os dados apresentados mostraram os níveis plasmáticos de IL-17A aumentado em pacientes com a COVID-19 em comparação com indivíduos saudáveis, em concordância com estudos anteriores.

Assim como em outras publicações, encontramos correlações entre o bacterioma e citocinas inflamatórias, sugerindo que a microbiota intestinal pode influenciar a resposta imune do hospedeiro ao SARS-CoV-2 (Gu *et al.*, 2020; Yeoh *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2022; Nagata *et al.*, 2023).

6 CONCLUSÃO

Concluindo, nosso estudo evidenciou alterações significativas no perfil do bacterioma fecal, na diversidade microbiana e na expressão de marcadores inflamatórios em pacientes com COVID-19 e condição pós-COVID-19. A correlação entre a disbiose intestinal, o aumento de zonulina e citocinas inflamatórias como IL-2, IL-6, IL-17A e IFN- γ , reforça a hipótese de que a microbiota intestinal participa ativamente na fisiopatologia da COVID-19, possivelmente por meio da ruptura da barreira epitelial intestinal e da ativação imune sistêmica. Os achados destacam o papel central do eixo intestino-pulmão na regulação da resposta inflamatória ao SARS-CoV-2 e sugerem que a modulação da microbiota intestinal pode representar uma estratégia terapêutica complementar promissora na COVID-19 e suas sequelas.

7 REFERÊNCIAS

- ABDUL-KAREEM, H. H.; AL-MAQTOOFI, M. Y.; BURGHAL, A. A. Impact of COVID-19 vaccination on saliva immune barriers: IgA, lysozyme, and lactoferrin. *Archives of Virology*, v. 168, n. 12, p. 293, dez. 2023.
- ABT, M. C. et al. Commensal bacteria calibrate the activation threshold of innate antiviral immunity. *Immunity*, v. 37, n. 1, p. 158–170, 27 jul. 2012.
- AGRAWAL, A.; WU, Y. Editorial: biology of C-reactive protein. *Frontiers in Immunology*, v. 15, p. 1445001, 19 jun. 2024.
- AIELLO, A.; NAJAFI-FARD, S.; GOLETTI, D. Initial immune response after exposure to *Mycobacterium tuberculosis* or to SARS-COV-2: similarities and differences. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1244556, 17 ago. 2023.
- AILIOAIE, L. M.; AILIOAIE, C.; LITSCHER, G. Gut microbiota and mitochondria: health and pathophysiological aspects of long COVID. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 24, p. 17198, 2023. DOI: 10.3390/ijms242417198.
- AKSAKAL, S.; GORGUN, S. The protective role of IL-17 and IL-22 in COVID-19 infection. *Iranian Journal of Immunology*, 2024. Online first.
- AL-ALY, Z. et al. Long COVID science, research and policy. *Nature Medicine*, v. 30, p. 2148–2164, 2024. DOI: 10.1038/s41591-024-03173-6.
- ALKHATTABI, N. A. et al. Studying the correlation of inflammatory cytokines to COVID-19 disease. *Pathology – Research and Practice*, v. 255, p. 155215, mar. 2024.
- ALVES, M. C. S. et al. Gut microbiota and COVID-19: unraveling the gut-lung axis and immunomodulatory therapies. *ACS Infectious Diseases*, 5 jun. 2025. DOI: 10.1021/acsinfecdis.5c00250.
- ALLALI, I. et al. Gut-lung axis in COVID-19. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases*, p. 6655380, 2021. DOI: 10.1155/2021/6655380.
- AMODIO, G. et al. Combined plasma levels of IL-10 and testosterone, but not soluble HLA-G5, predict the risk of death in COVID-19 patients. *Andrology*, v. 11, p. 32–44, 2023. DOI: 10.1111/andr.13334.
- AN, Y. et al. Gut microbiota in post-acute COVID-19 syndrome: not the end of the story. *Frontiers in Microbiology*, v. 15, p. 1500890, 2024. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1500890.

- ANCONA, G. Gut and airway microbiota dysbiosis and their role in COVID-19 and long-COVID. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1080043, 2023. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1080043.
- BASTARD, P. et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~20% of COVID-19 deaths. *Science Immunology*, v. 6, n. 62, eabl4340, 19 ago. 2021.
- BERLIN, D.A, GULICK, R.M, MARTINEZ, F.J. Severe Covid-19. *N Engl J Med*. 2020, 383(25):2451-2460. doi: 10.1056/NEJMcp2009575.
- BLANKESTIN, J. M. et al. Exploring heterogeneity of fecal microbiome in long COVID patients at 3 to 6 months after infection. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 26, n. 4, p. 1781, 2025. DOI: 10.3390/ijms26041781.
- BRADLEY, K. C. et al. Microbiota-driven tonic interferon signals in lung stromal cells protect from influenza virus infection. *Cell Reports*, v. 28, n. 1, p. 245–256.e4, fev. 2019.
- BROOKS, K. et al. SARS-CoV-2 infection perturbs the gastrointestinal tract and induces modest microbial translocation across the intestinal barrier. *Journal of Virology*, v. 98, n. 10, e0128824, 22 out. 2024. DOI: 10.1128/JVI.01288-24.
- BUCCI, V. et al. The intestinal microbiota predicts COVID-19 severity and fatality regardless of hospital feeding method. *mSystems*, v. 8, n. 4, e0031023, 2023. DOI: 10.1128/msystems.00310-23.
- 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, jan. 2017. DOI: 10.1038/nrmicro.2016.142.
- CAI, M. et al. Three-year outcomes of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature Medicine*, v. 30, p. 1564–1573, 2024. DOI: 10.1038/s41591-024-02987-8.
- CARABELLI, A. M. et al. SARS-CoV-2 variant biology: immune escape, transmission and fitness. *Nature Reviews Microbiology*, 18 jan. 2023.
- CHANG, Y ., BAI, MANGRU and YOU, Qinghai. Associations between Serum Interleukins (IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, and IL-10) and Disease Severity of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. Hindawi 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/2755246>
- CHE, K. et al. Association between serum C-reactive protein (CRP) and Omicron variant COVID-19 pneumonia in cancer patients: a multicenter cross-sectional study at the end of 2022 in China. *Medicine*, v. 103, n. 2, p. e36965, 12 jan. 2024.
- CHEN, Y. et al. Six-month follow-up of gut microbiota richness in patients with COVID-19. *Gut*, v. 71, n. 1, p. 222–225, 2022. DOI: 10.1136/gutjnl-2021-324090.
- CHUNG, Y.-S. et al. Comprehensive review of COVID-19: epidemiology, pathogenesis, advancement in diagnostic and detection techniques, and post-pandemic treatment strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 25, n. 15, p. 8155, 26 jul. 2024.
- CHEN, Z.; WHERRY, E. T cell responses in patients with COVID-19. *Nature Reviews Immunology*, v. 20, n. 9, p. 529–536, 2020.
- CUI, A. et al. Dictionary of immune responses to cytokines at single-cell resolution. *Nature*, v. 625, n. 7994, p. 377–384, 11 jan. 2024.

- DANG, A. T.; MARSLAND, B. J. Microbes, metabolites, and the gut-lung axis. *Mucosal Immunology*, v. 12, n. 4, p. 843–850, 2019. DOI: 10.1038/s41385-019-0160-6.
- DARIF, D. et al. The pro-inflammatory cytokines in COVID-19 pathogenesis: What goes wrong? *Microbial Pathogenesis*, v. 153, p. 104799, 2021. DOI: 10.1016/j.micpath.2021.104799.
- DENG, X. et al. Impacts of inflammatory cytokines variants on systemic inflammatory profile and COVID-19 severity. *Journal of Epidemiology and Global Health*, v. 14, n. 2, p. 363–378, 2024. DOI: 10.1007/s44197-024-00204-w.
- ELEFThERIoTIS, G, et al. Alterations in gut immunological barrier in SARS-CoV-2 infection and their prognostic potential. *Front. Immunol*(2023). 14:1129190. doi: 10.3389/fimmu.2023.1129190
- FARSI, Y. et al. Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Roles of Gut Microbiota in COVID-19: A Comprehensive Systematic Review. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 12, p. 804644, 2022.
- FERREIRA-JUNIOR et al. Detection of Intestinal Dysbiosis in Post-COVID-19 Patients One to Eight Months after Acute Disease Resolution. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, v. 19, n. 16, p. 10189, 2022. doi: 10.3390/ijerph191610189
- GARAY, E. et al. Immune response to SARS-CoV-2 variants after immunization with different vaccines in Mexico. *Epidemiology and Infection*, v. 152, p. e30, 2024.
- GANDHI, R.T, LYNCH, J.B, DEL RIO ,C. Mild or Moderate Covid-19. *N Engl J Med*. 2020, 383(18):1757-1766. doi: 10.1056/NEJMcp2009249.
- GANG, J, et al. Microbiota and COVID-19: Long-term and complex influencing factors. *Front. Microbiol* (2022). 13:963488. doi: 10.3389/fmicb.2022.963488
- GHEORGHITA, R et al. The knowns and unknowns of long COVID-19: from mechanisms to therapeutical approaches. *Front. Immunol*(2024). 15:1344086. doi: 10.3389/fimmu.2024.1344086
- GHARAJEH, et al. Gut Microbiota might act as a potential therapeutic pathway in COVID-19. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 4 abr. 2022.
- GIRON, L.B. *et al.* Plasma Markers of Disrupted Gut Permeability in Severe COVID-19 Patients. *Front Immunol*. 12:686240, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.686240
- GU, S. et al. Alterations of the Gut Microbiota in Patients with COVID-19 or H1N1 Influenza. *Clinical Infectious Diseases*, v. 71, n. 10, p. 2669–2678, 2020. doi: 10.1093/cid/ciaa709.
- HALDAR, Swati et al. Unravelling the gut-lung axis: insights into microbiome interactions and Traditional Indian Medicine’s perspective on optimal health. *FEMS Microbiology Ecology*, v. 99, n. 10, p. fiad103, 19 set. 2023.
- HU, B.; HUANG, S.; YIN, L. The cytokine storm and COVID-19. *Journal of Medical Virology*, v. 93, n. 1, p. 250–256, jan. 2021
- HURME, A. *et al.* Post-COVID-19 condition in prospective inpatient and outpatient cohorts. *Scientific Reports*, [s.l.], v. 15, n. 1, p. 6925, 2025. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-025-90819-1>.
- 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, 29 mar. 2011.

ISLAM, F et al. The Association of Cytokines IL-2, IL-6, TNF- α , IFN- γ , and IL-10 With the Disease Severity of COVID-19: A Study from Bangladesh. *Cureus*.16(4):e57610, 2024. doi: 10.7759/cureus.57610.

JAMILLOUX, Y. et al. Should we stimulate or suppress immune responses in COVID-19? Cytokine and anti-cytokine interventions. *Autoimmunity Reviews*, v. 19, n. 7, p. 102567, jul. 2020.

KARKI, R. et al. Synergism of TNF- α and IFN- γ Triggers Inflammatory Cell Death, Tissue Damage, and Mortality in SARS-CoV-2 Infection and Cytokine Shock Syndromes. *Cell*, v. 184, n. 1, p. 149-168.e17, 2021. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.025.

KARIM, A et al. Impact of comorbidities and inflammatory markers on mortality of COVID-19 patients. *Lung India* 2024;41:40-6.

KHEZRI, MOHAMMAD RAFI; VARZANDEH, REZA; GHASEMNEJAD-BERENJI, MORTEZA. Bmal1 and Gut-lung axis in SARS-CoV-2 infection: New insight into the effects of melatonin on COVID-19 patients? *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 164, p. 114291, ago. 2023.

KIM, Heenam Stanley. Do an Altered Gut Microbiota and an Associated Leaky Gut Affect COVID-19 Severity? *mBio*, v. 12, n. 1, p. e03022-20, 23 fev. 2021.

LAING, A. G. et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. *Nature Medicine*, v. 26, n. 10, p. 1623–1635, out. 2020.

LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nature Reviews. Microbiology*, v. 20, n. 5, p. 270–284, maio 2022.

LAU R.I, et al. A synbiotic preparation (SIM01) for post-acute COVID-19 syndrome in Hong Kong (RECOVERY): a randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect Dis*. 2024 Mar;24(3):256-265. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00685-0. Epub 2023 Dec 7. PMID: 38071990.

LIU, Q. et al. Gut microbiota dynamics in a prospective cohort of patients with post-acute COVID-19 syndrome. *Gut*, v. 71, n. 3, p. 544–552, mar. 2022.

ŁODYGA, M. et al. Assessment of the activity of the immune system in patients with inflammatory bowel diseases and asymptomatic COVID-19. *Gastroenterology Review*, v. 19, n. 1, p. 46–53, 2024.

LOPEZ, J. et al. Early nasal type I IFN immunity against SARS-CoV-2 is compromised in patients with autoantibodies against type I IFNs. *The Journal of Experimental Medicine*, v. 218, n. 10, p. e20211211, 4 out. 2021.

MAHMOODPOOR, A.; SHAMEKH, A.; SANAIE, S. Gut microbial signature and gut-lung axis: A possible role in the therapy of COVID-19. *BioImpacts: BI*, v. 12, n. 2, p. 175–177, 2022.

MAISON, D. P.; DENG, Y.; GERSCHENSON, M. SARS-CoV-2 and the host-immune response. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1195871, 19 jun. 2023.

MARTONIK, D. et al. Effect of antiviral and immunomodulatory treatment on a cytokine profile in patients with COVID-19. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1222170, 6 jul. 2023.

MINKOFF, J. M.; TENOEVER, B. Innate immune evasion strategies of SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology*, 11 jan. 2023.

MOHAN, A et al. Navigating the Post-COVID-19 Immunological Era: Understanding Long COVID-19 and Immune Response. *Life* 2023, 13, 2121. <https://doi.org/10.3390/life13112121>

NOBRE, J.G. et al. Gut microbiota profile of COVID-19 patients: Prognosis and risk stratification

(MicroCOVID-19 study). *Front Microbiol.*13:1035422, 2022. doi: 10.3389/fmicb.2022.1035422.

NAGATA, N. et al. Human Gut Microbiota and Its Metabolites Impact Immune Responses in COVID-19 and Its Complications. *Gastroenterology.*164(2):272-288, 2023.doi: 10.1053/j.gastro.2022.09.024.

OKUYUCU, M, et al. The Relationship Between COVID-19 Disease Severity and Zonulin Levels. *Cureus.* 2022 Aug 22;14(8):e28255. doi: 10.7759/cureus.28255. PMID: 36158380; PMCID: PMC9491012.

OLIVEIRA, G.L.V. et al. Microbiota Modulation of the Gut-Lung Axis in COVID-19. *Front Immunol.*12:635471, 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.635471.

PALOMINO- KOBAYASHI, L.A. et al. Zonulin, a marker of gut permeability, is associated with mortality in a cohort of hospitalised peruvian COVID-19 patients. *Front Cell Infect Microbiol.*12:1000291, 2022. doi: 10.3389/fcimb.2022.1000291

PENNINGER, J. M.; GRANT, M. B.; SUNG, J. J. Y. The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in Modulating Gut Microbiota, Intestinal Inflammation, and Coronavirus Infection. *Gastroenterology*, jan. 2021 v. 160, n. 1, p. 39–46.

PHETSOUPHANH, C. et al. Immunological dysfunction persists for 8 months following initial mild-to-moderate SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.*23(2):210-216, 2022 doi: 10.1038/s41590-021-01113-x.

PILLA REDDY, V. et al. Pharmacokinetics under the COVID-19 storm. *British Journal of Clinical Pharmacology*, v. 89, n. 1, p. 158–186, jan. 2023.

POZDNYAKOVA, V. et al. Review of Immunologic Manifestations of COVID-19 Infection and Vaccination. *Rheum Dis Clin North Am.*51(1):111-121, 2025. doi: 10.1016/j.rdc.2024.09.001.

PROAL, AMY D et al. Targeting the SARS-CoV-2 reservoir in long COVID. *Lancet Infect Dis* 2025; 25: e294–304 [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(24\)00769-2](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(24)00769-2)

QI, H. et al. The humoral response and antibodies against SARS-CoV-2 infection. *Nat Immunol.*23(7):1008-1020, 2022. doi: 10.1038/s41590-022-01248-5.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with COVID-19 in Wuhan, China. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*, 12 mar. 2020.

QIU YET al. Alterations in microbiota of patients with COVID-19: implications for therapeutic interventions. *MedComm* (2020). 2024 Mar 15;5(4):e513. doi: 10.1002/mco2.513. PMID: 38495122; PMCID: PMC10943180.

RENU, K. et al. The role of Interleukin-4 in COVID-19 associated male infertility – A hypothesis. *Journal of Reproductive Immunology*, v. 142, p. 103213, nov. 2020.

SAFONT, G. et al. Measurement of IFN- γ and IL-2 for the assessment of the cellular immunity against SARS-CoV-2. *Sci Rep.* 14(1):1137, 2024. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-51505-w>

SETTE, A.; CROTTY, S. Adaptive immunity to SARS-CoV-2 and COVID-19. *Cell*, v. 184, n. 4, p. 861–880, 18 fev. 2021.

SHANT, H et al. COVID-19 vaccines: Immune correlates and clinical outcomes, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 20:1, 2324549, DOI: 10.1080/21645515.2024.2324549.

SHIMIZU, K. et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with severe COVID-19. *Acute Med Surg.*11(1): e923, 2024. doi: 10.1002/ams2.923.

- SINGH, N. et al. The Trend of C-Reactive Protein After Corticosteroid Therapy in COVID-19 Patients Admitted to IGIMS, Patna. *Cureus*, 2 jan. 2024.
- SOUSA, G.F.; Carpes, R.M.; Silva, C.A.O.; Pereira, M.E.P.; Silva, A.C.V.F.; Coelho, V.A.G.S.; Costa, E.P.; Mury, F.B.; Gestinari, R.S.; Souza-Menezes, J.; et al. Immunoglobulin A as a Key Immunological Molecular Signature of Post-COVID-19 Conditions. *Viruses* 2023, 15, 1545. <https://doi.org/10.3390/v15071545>
- SU, Q. et al. The gut microbiome associates with phenotypic manifestations of post-acute COVID-19 syndrome. *Cell Host Microbe*. 32(5):651-660.e4, 2024. doi: 10.1016/j.chom.2024.04.005.
- VELAVAN, T. P.; MEYER, C. G. Mild versus severe COVID-19: Laboratory markers. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 95, p. 304–307, jun. 2020.
- VILLENA, J.; KITAZAWA, H. The Modulation of Mucosal Antiviral Immunity by Immunobiotics: Could They Offer Any Benefit in the SARS-CoV-2 Pandemic? *Frontiers in Physiology*, v. 11, 2020.
- WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 281- 292.e6, 16 2020.
- WELLFORD, S. A.; MOSEMAN, E. A. Olfactory immune response to SARS-CoV-2. *Cellular & Molecular Immunology*, v. 21, n. 2, p. 134–143, 25 dez. 2023.
- WHO COVID-19 dashboard, 2025. Disponível em: <https://data.who.int/dashboards/covid19/cases?n=c>
- YAZICI, D et al. Disrupted epithelial permeability as a predictor of severe COVID-19 development. *Allergy*. 2023; 78:2644-2658. doi:10.1111/all.15800
- YE, FANG et al. Advances in gut-lung axis research: clinical perspectives on pneumonia prevention and treatment. *Frontiers in Immunology*, v. 16, p. 1576141, 22 abr. 2025.
- 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, 2021.
- YIN, K. et al. Long COVID manifests with T cell dysregulation, inflammation and an uncoordinated adaptive immune response to SARS-CoV-2. *Nat Immunol*. 25(2):218-225, 2024. doi: 10.1038/s41590-023-01724-6
- YOKOYAMA, Y. et al. Gut microbiota and metabolites in patients with COVID-19 are altered by the type of SARS-CoV-2 variant. *Front Microbiol*.15:1358530, 2024. doi: 10.3389/fmicb.2024.1358530.
- YU, Q. et al. Cytokine Storm in COVID-19: Insight into Pathological Mechanisms and Therapeutic Benefits of Chinese Herbal Medicines. *Medicines*, v. 11, n. 7, p. 14, 18 jul. 2024.
- ZANZA, C. et al. Cytokine Storm in COVID-19: Immunopathogenesis and Therapy. *Medicina (Kaunas)*.58(2):144, 2022. doi: 10.3390/medicina58020144
- ZENDEJAS-HERNANDEZ, U. et al. Nebulized glycyrrhizin/enoxolone drug modulates IL-17A in COVID-19 patients: a randomized clinical trial. *Frontiers in Immunology*, v. 14, p. 1282280, 12 jan. 2024.
- ZHANG D-W et al. Gut microbiota and its metabolic products in acute respiratory distress syndrome. *Front. Immunol*. (2024) 15:1330021. doi: 10.3389/fimmu.2024.1330021
- ZHANG, F. et al. Prolonged Impairment of Short-Chain Fatty Acid and L-Isoleucine Biosynthesis in Gut Microbiome in Patients With COVID-19. *Gastroenterology*.162(2):548-561.e4, 2022. doi:

10.1053/j.gastro.2021.10.013

ZHANG, Haoran *et al.* Elevated level of circulating calprotectin correlates with severity and high mortality in patients with COVID-19. *Immunity, Inflammation and Disease*, v. 12, n. 3, p. e1212, mar. 2024b.

ZHANG, Y. *et al.* Exploring gut-lung axis crosstalk in SARS-CoV-2 infection: Insights from a hACE2 mouse model. *J Med Virol.*96(1):e29336, 2024. doi: 10.1002/jmv.29336

ZHAO, S. *et al.* Modulated Gut Microbiota for Potential COVID-19 Prevention and Treatment. *Frontiers in medicine*, v. 9, p. 811176, 2022.

ZHONG, J *et al.* Gut Microbiota Improves Prognostic Prediction in Critically Ill COVID-19 Patients Alongside Immunological and Hematological Indicators. *Research (Wash D C)*.7:0389, 2024. doi: 10.34133/research.0389.

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, 2020a.

ZUO, T. *et al.* Alterations in Fecal Fungal Microbiome of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization until Discharge. *Gastroenterology*, v. 159, n. 4, p. 1302-1310, 2020b.

ZUO, T. *et al.* Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*, 20 jul. 2020c.

ZUO, T. *et al.* Depicting SARS-CoV-2 faecal viral activity in association with gut microbiota composition in patients with COVID-19. *Gut*, v. 70, n. 2, p. 276-284, 2021.

Atividades acadêmicas vinculadas ao projeto

Publicações associadas ao projeto

SOUZA, L. S.; RODRIGUES, J.; OLIVEIRA, G.L.V. (2025). Capítulo 21: **Microbiota, COVID-19 e as potenciais intervenções**. In: Marcus Vinicius Lucio dos Santos Quaresma; Juliana Tieko Kato; Camila Guazzelli Marques. (Org.). **Microbiota intestinal: princípios, perspectivas científicas e aplicações clínicas**. 1ed.: Guanabara-Koogan, 2024, p. 322-347.

SOUZA, L.S.; FERREIRA-JUNIOR, A.S.; ESTELLA, P.C.; NODA, R.K.; SOUSA, L.F.; MURATA, M.T.Y.; CARVALHO, L.A.L.; BRISOTTI, J.L.; PINHEIRO, D.G.; RODRIGUES, J.; et al. Bacteriome Signature in SARS-CoV-2-Infected Patients Correlates with Increased Gut Permeability and Systemic Inflammatory Cytokines. *Microorganisms* 2025, 13, 1407. <https://doi.org/10.3390/microorganisms13061407>.(Anexo 1)

Publicações de resumos em anais de eventos científicos

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. In: **32º Congresso Brasileiro de Microbiologia, 2023**, Foz do Iguaçu. LIVRO ELETRÔNICO - Anais do 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2023, v. 1. p. 559-1.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Dysbiosis and increased intestinal permeability in patients infected with SARS-CoV-2. In: **Anais do 10th International Human Microbiome Consortium (IHMC) Congress**. De 22 a 25 de Junho de 2024. Roma/Itália.

RÉ, G.P.H.; **SOUZA, L. S.**; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Detecção do perfil Th17 e permeabilidade intestinal em pacientes com COVID-19. In: **14º Congresso Paulista de Infectologia**, 2024, São Paul. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2024.103913>.

Apresentações orais em eventos científicos

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G. L. V.; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **Simpósio Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada**, 2023, Botucatu/SP.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. In: **XII Congresso de Biociências (CONGREBIO)**. De 28 a 30 de agosto de 2023. Botucatu/SP.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G. L. V.; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **Simpósio Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada** 2024, Botucatu/SP.

RÉ, G.P.H.; **SOUZA, L. S.**; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.;

MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Detecção do perfil Th17 e permeabilidade intestinal em pacientes com COVID-19. In: **14º Congresso Paulista de Infectologia**, 2024, São Paulo/SP. O trabalho será publicado no *Brazilian Journal of Infectious Diseases*.

RÉ, G.P.H.; **SOUZA, L. S.** OLIVEIRA, G.L.V. Proteína C reativa na COVID-19 aguda e na condição pós-COVID. **XXXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. Dias 08 e 09 de outubro de 2024. Botucatu/SP.

GONÇALVES, M.F.F. **SOUZA, L. S.** OLIVEIRA, G.L.V. Saúde intestinal na COVID-19 aguda e na condição pós-COVID. **XXXVI Congresso de Iniciação Científica da UNESP**. Dias 08 e 09 de outubro de 2024. Botucatu/SP.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K; CARDOSO, L. I. S; SOUSA, L. F ; MURATA, M. T. Y. ; BRISOTTI J. L ; FORTALEZA, C. M ; PENNA, A. L. B ; DE OLIVEIRA, G. L. V ; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **Simpósio Anual do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral e Aplicada** 2025, Botucatu/SP.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K; CARDOSO, L. I. S; SOUSA, L. F ; MURATA, M. T. Y. ; BRISOTTI J. L ; FORTALEZA, C. M ; PENNA, A. L. B ; DE OLIVEIRA, G. L. V ; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **II Mulheres na Ciência** 2025, Botucatu/SP

Apresentações na modalidade pôster em eventos científicos

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K; CARDOSO, L. I. S; SOUSA, L. F ; MURATA, M. T. Y. ; BRISOTTI J. L ; FORTALEZA, C. M ; PENNA, A. L. B ; DE OLIVEIRA, G. L. V ; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **32º Congresso Brasileiro de Microbiologia**, 2023, Foz do Iguaçu/PR.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K; CARDOSO, L. I. S; SOUSA, L. F ; MURATA, M. T. Y. ; BRISOTTI J. L ; FORTALEZA, C. M ; PENNA, A. L. B ; DE OLIVEIRA, G. L. V ; Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **10th International Human Microbiome Consortium Congress**, 2024, Roma/Itália. *Com utilização da reserva técnica do bolsista.*

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K; CARDOSO, L. I. S; SOUSA, L. F ; MURATA, M. T. Y. ; BRISOTTI J. L ; FORTALEZA, C. M ; PENNA, A. L. B ; DE OLIVEIRA, G. L. V. Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo Sars-CoV-2. In: **XII Congresso de Biociências (CONGREBIO)**, 2024 Botucatu/SP.

SOUZA, L. S.; ESTELLA, P. C.; NODA, R. K.; CARDOSO, L. I. S.; SOUSA, L. F.; MURATA, M. T. Y.; BRISOTTI, J. L.; FORTALEZA, C. M. C. B.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Avaliação do bacterioma fecal e correlação com marcadores inflamatórios sistêmicos em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2. In: **27º Encontro Nacional de Biomedicina (ENBM)**, 2024, Botucatu/SP.

Outros trabalhos com participação da aluna

SALUSTIANO, L. P. Q. ; **SOUZA, L. S.** ; MACHADO, L. D. ; RODRIGUES, J. ; PENNA, A. L. B. ; OLIVEIRA, G. L. V. . The bacteriome profile in plant-based diet include Faecalibacterium, Bifidobacterium, Lactobacillus, Blautia, and Roseburia species in the healthy gut.. In: **32º Congresso Brasileiro de Microbiologia** 2023, 2023, Foz do Iguaçu. LIVRO ELETRÔNICO - Anais do 32º Congresso Brasileiro de Microbiologia 2023, 2023. v. v1.(Pôster)

MACHADO, L. D. ; **SOUZA, L. S.** ; PAVAO, J. G. ; OLIVEIRA, L. R. C. ; GOMES, C. B. . Redução

da vitalidade e capacidade funcional na obesidade.. In: XXXVI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica da Unesp, 2024, Aguas de Lindoia. Anais do XXXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2024.(Apresentação Oral)

SILVA, N. L. ; FERREIRA JUNIOR, A. S. ; **SOUZA, L. S.** ; COLTURATO, I. ; FELICIANO, J. V. P. ; BARROS, G. M. N. ; SCHEINBERG, P. ; OLIVEIRA, G. L. V. . Aumento da permeabilidade intestinal em pacientes submetidos ao transplante alogênico.. In: **XXXVI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica da Unesp, 2024**, Aguas de Lindoia. Anais do XXXVI Congresso de Iniciação Científica da Unesp, 2024.(Apresentação Oral)

SILVA, N. L.; FERREIRA-JUNIOR, A. S.; **SOUZA, L. S.**; COLTURATO, I.; FELICIANO, J. V. P.; BARROS, G. M. N.; CICONELLI, R. M.; SCHEINBERG, P.; OLIVEIRA, G.L.V. Increased intestinal permeability in patients submitted to allogeneic bone marrow transplantation. In: XXVIII **Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea (SBTMO)**, 2024, Fortaleza. **17th Journal of Bone Marrow Transplantation and Cellular Therapy**. São Paulo: SBTMO, 2024. v. 5. p. 61-61. (Apresentação oral).

SILVA, N. L.; **SOUZA, L. S.**; FERREIRA-JUNIOR, A. S.; COLTURATO, I.; BARROS, G. M. N.; FELICIANO, J. V. P.; OLIVEIRA, M. C.; OLIVEIRA, G.L.V. Increased intestinal permeability in patients submitted to allogeneic bone marrow transplantation. In: **21st International Congress of Mucosal Immunology**, 2024, Copenhagen. ICMI Abstract Supplement, 2024. v. 1. p. 228-228. (Pôster).

MACHADO, L. D.; SALUSTIANO, L. P. Q.; **SOUZA, L. S.**; RODRIGUES, J.; PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, G.L.V. Prevalência de espécies com perfil anti-inflamatório no bacterioma fecal de indivíduos vegetarianos em comparação à onívoros. In: **XXVIII Congresso Brasileiro de Nutrição** (CONBRAN 2024). De 21 a 24 de maio de 2024. São Paulo, Brasil. (Pôster).

MACHADO, L. D. ; **SOUZA, L. S.** ; PAVAO, J. G. ; TARIFA, L.; GOMES, C.B.; OLIVEIRA, G. L.V .Alta ingestão de gordura e piora da qualidade de vida correlacionaram-se com aumento da permeabilidade intestinal e inflamação sistêmica em pacientes com obesidade clínica.. In: **XXIV JONUB – Jornada de Nutrição da UNESP de Botucatu**, 2025, Botucatu.(Apresentação Oral)

Cursos realizados

Curso de Letramento Científico, 2023 (Curso).

Capacitação para certificação para o uso da plataforma REDCap(Curso).

Metodologias Ativas de Aprendizagem(Curso).

Curso de capacitação para utilização de animais em atividade de ensino e pesquisa(Curso).

Cell Line Identity- Prevent cell misidentification in your daily lab routine(Webinar).

Clinica de pipetagem – eppendorf (Workshop).

Transdisciplinary approaches to infectious diseases (Workshop).

Tópicos em Biosegurança (Curso de curta duração).

Tópicos em Biosegurança e Organismos Geneticamente modificados(OGMs e AnGMs) (Curso de curta duração).

Prêmios

Apresentação oral premiada (2º lugar) pela coautoria do trabalho “Avaliação da Calpropectina fecal e sistêmica em pacientes infectados pelo SARS-CoV-2” no II Workshop de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, 2025.

Menção Honrosa pela coautoria no trabalho "Caracterização da microbiota oral em pacientes submetidos ao transplante de medula óssea e correlação com dados clínicos", III Simpósio da Liga Acadêmica em Biologia do Desenvolvimento e Saúde (LABIDS), 2025.

Apresentação oral premiada pela coautoria do trabalho "Alta ingestão de gordura e piora da qualidade de vida correlacionaram-se com aumento da permeabilidade intestinal e inflamação sistêmica em pacientes com obesidade clínica", XXIV JONUB, Jornada de Nutrição da UNESP de Botucatu, 2025.

Prêmio RICARDO PASQUINI YOUNG SCIENTIST pela coautoria do trabalho “Dynamics of Intestinal Domination in Patients Undergoing Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation”, Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea e Terapia Celular, 2025.

Extensão universitária

Monitor do curso evento “ I Curso de inverno do Programa de Pós Graduação em Biologia Geral e Aplicada para Graduação.

Monitor do evento de Extensão Universitária “XV Venha Conhecer o IB”.

Professora Voluntária do “Cursinho Pré-Universitário AVANÇA” organizado pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP - Campus de Botucatu.

Disciplinas cursadas

Fundamentos de Informática e de Tecnologias Digitais Aplicadas ao Ensino e à Pesquisa.

Interação microbiota e sistema imune de mucosas.

Noções Básicas e Aplicações da Bioinformática.

O cientista e o professor universitário.

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada.

Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada: Plataforma do Currículo Lattes/CNPq – Atualização.

Metodologia Científica.

Experiência docente

Participação da disciplina de Imunologia Aplicada de responsabilidade do Departamento de Ciências Químicas e Biológicas, setor de Imunologia e Microbiologia, do Instituto de Biociências de Botucatu/UNESP pelo programa de Atividades e Aperfeiçoamento em Docência no Ensino Superior(PAADES), no período de 05/08/2024 à 07/12/2024 com a carga horária de 73h em atividades de apoio à docência e 2h em atividade de docência.