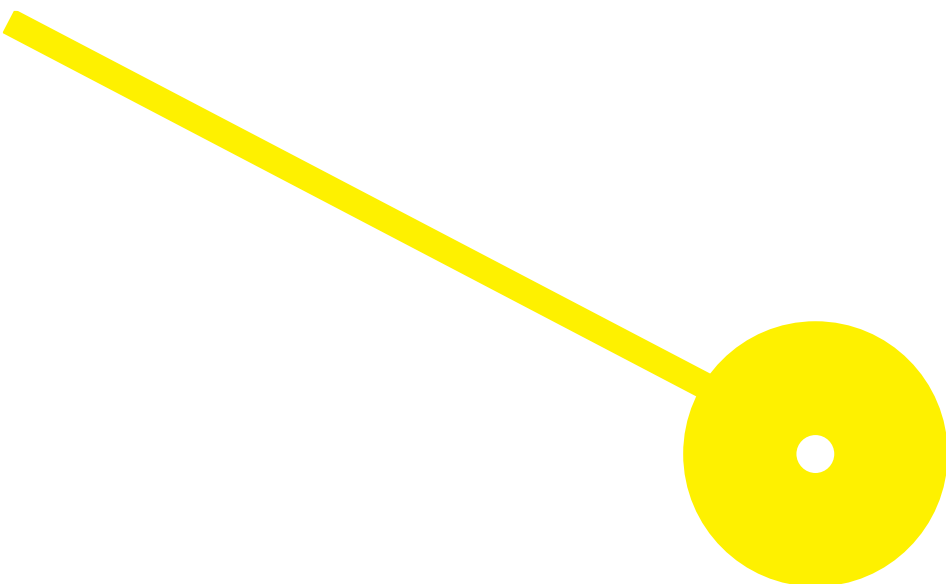


# Uso de Probióticos na Evolução da Morbilidade na SARS-CoV-2: Revisão Sistemática

Rita Natália Couto dos Santos

09/2024





ESCOLA  
SUPERIOR  
DE SAÚDE



## **Uso de Probióticos na Evolução da Morbilidade na SARS-CoV-2: Revisão Sistemática**

**Autor**

Rita Natália Couto dos Santos

**Orientador(es)**

Professor Doutor/Agostinho Luís Silva Cruz/ LAQV/REQUIMTE, ESS- Instituto Politécnico do  
Porto

Professor Doutor / Fernando Xavier Ferreira Moreira/ LAQV/REQUIMTE, ESS – Instituto  
Politécnico do Porto

**Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Farmácia – Tecnologia do Medicamento e de Produtos de Saúde pela Escola Superior de Saúde do Instituto Politécnico do Porto.**

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação não resume unicamente às horas de trabalho minucioso, mas sim à capacidade de ultrapassar os vários obstáculos encontrados neste percurso, nomeadamente a nível pessoal e profissional.

Para a finalização deste trabalho foi fulcral o apoio incondicional de algumas pessoas, às quais deixo os meus sinceros agradecimentos.

Agradeço ao Professor Doutor Agostinho Luís Silva Cruz e ao Professor Doutor Fernando Xavier Ferreira Moreira, pela orientação, paciência, disponibilidade e sobretudo, pelas contribuições cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais e irmã, por todo o apoio, carinho e incentivo ao longo desta longa jornada.

Aos meus amigos, pela compreensão de todas as ausências e palavras de incentivo, nesta caminhada.

Ao meu namorado, André Valadares, que sempre esteve ao meu lado, e sobretudo acreditou em mim, mesmo nos momentos mais difíceis, sou profundamente grata pelo companheirismo e compreensão ao longo deste percurso.

A todos muito obrigado!

“Os grandes feitos são conseguidos não pela força, mas pela perseverança”.

[Samuel Johnson]

Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico do Porto, 30 de setembro 2024.

Rita Natália Couto dos Santos

## **Resumo**

Em dezembro de 2019, na província de Wuhan, surgiu o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Esta infeção foi classificada como pandemia da doença coronavírus 2019. Os probióticos são microrganismos vivos, cuja administração em quantidades adequadas, tem sido associada a benefícios para a saúde do hospedeiro. Este estudo tem como objetivo verificar o efeito do uso dos probióticos na evolução na morbidade na SARS-CoV-2. Foi realizada uma revisão sistemática, tendo a pesquisa sido realizada nas bases de dados *Cochrane Library*, *Clinical Trials*, *EBSCO*, *Medline*, *Web of Science* e *Science Direct*. Consideraram-se como critérios de inclusão: período de estudo entre 2019 a 2023; idioma em Inglês ou Português; estudos em ensaios clínicos; estudos em humanos com diagnóstico confirmado de SARS-CoV-2 e administração de probióticos na SARS-CoV-2. Foram incluídos 5 estudos nesta revisão, cujo o tamanho da amostra variou entre 23 a 300 doentes, com um período de estudo reduzido. Os principais resultados sugerem a melhoria sintomatológica, um aumento na resposta imunitária humoral aos antígenos virais e uma redução nos marcadores inflamatórios. Todavia, estes resultados necessitam de mais estudos para comprovar a eficácia dos probióticos, sobretudo no que concerne à evolução da morbidade da SARS-CoV-2.

**Palavras-chave:** Probióticos; SARS-CoV-2; morbidade

## **Abstract**

In December 2019, in the province of Wuhan, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) emerged. This infection was classified as the Coronavirus Disease 2019 pandemic. Probiotics are live microorganisms, whose administration in adequate quantities has been associated with health benefits for the host. This study aims to investigate the effect of probiotics on morbidity outcomes in SARS-CoV-2. A systematic review was performed and the research was conducted in the *Cochrane Library*, *Clinical Trials*, *EBSCO*, *Medline*, *Web of Science*, and *Science Direct* databases. The inclusion criteria were: study period between 2019 and 2023; English or Portuguese language; clinical trial studies; studies in humans with confirmed SARS-CoV-2 diagnosis and administration of probiotics in SARS-CoV-2. Five studies were included in this review, with sample sizes ranging from 23 to 300 patients and reduced study period. The main results suggest symptom improvement, an increase in humoral immune response to viral antigens, and a reduction in inflammatory markers. However, these findings require further studies to confirm the efficacy of probiotics, particularly regarding the progression of SARS-CoV-2 morbidity.

**Keywords:** Probiotics; SARS-CoV-2; morbidity

## Índice

Agradecimentos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	IV
Índice de Figuras.....	VI
Índice de Tabelas.....	VII
Glossário/Siglas.....	VIII
1. Introdução.....	1
1.1. Origens do SARS-CoV-2.....	1
1.2. Características estruturais do SARS-CoV-2.....	4
1.2.1. Proteína S.....	5
1.2.2. Proteína E.....	6
1.2.3. Proteína M.....	7
1.2.4. Proteína N.....	8
1.3. Ciclo de vida SARS-CoV-2.....	8
1.3.1. Diferentes entradas da SARS-CoV-2.....	9
1.4. Potenciais alvos para combate da SARS-CoV-2.....	10
1.4.1. Bloqueio da Proteína S.....	10
1.4.2. Bloqueio do recetor ACE2.....	10
1.4.3. Inibição de proteases de TMPRSS2.....	11
1.5. Evolução epidemiológica de SARS-CoV-2.....	11
1.5.1. Sintomas da SARS-CoV-2.....	12
1.5.2. Distribuição e expressão de ACE2 na SARS-CoV-2.....	13
1.5.2.1 Pulmões.....	14
1.5.2.2 Cavidade Oral e Língua.....	15
1.5.2.3 Trato Gastrointestinal.....	15
1.5.2.4 Cérebro.....	16
1.6. Patogénese viral por SARS-CoV-2.....	17
1.7. Microbiota humana: Visão geral.....	18
1.7.1. Microbiota intestinal.....	19
1.7.1.1 Anatomia e Fisiologia.....	20

1.7.1.2	Disbiose Intestinal e Patologias.....	21
1.7.2.	Crosstalk: Eixo intestino-Pulmão.....	22
1.7.3.	Resposta imunológica da mucosa.....	23
1.7.4.	Microbiota pulmonar e disbiose pulmonar.....	24
1.7.5.	Probióticos.....	25
1.7.5.1	Critérios de seleção de probióticos.....	26
1.7.5.2	Probióticos e imunidade.....	27
1.7.5.3	Mecanismo de ação dos probióticos.....	28
1.8.	Papel dos probióticos nas infecções virais e respiratórias.....	29
2.	Metodologia.....	31
2.1.	Estratégia de pesquisa e critérios de seleção.....	31
2.2.	Métodos de Pesquisa.....	32
2.3.	Critérios de inclusão e exclusão.....	33
2.4.	Extração e análise de Dados.....	33
3.	Resultados e Discussão.....	34
4.	Conclusão.....	56
	Referências Bibliográficas.....	57
	Anexos.....	73

## **Índice de Figuras**

Figura 1.	Função ACE2 em normais condições fisiológicas versus potenciais interrupções de ACE2 por infecção SARS-CoV-2.....	13
Figura 2.	Exemplos de microrganismos, como bactérias, fungos, protozoários, arqueia e vírus.....	19
Figura 3.	Critérios de seleção de microrganismos dos probióticos.....	27
Figura 4.	Mecanismos de ação dos probióticos.....	28
Figura 5.	Questão de investigação pelo modelo definido pelo acrónimo PICO.....	32
Figura 6.	Seleção criteriosa e objetiva de critérios de inclusão e exclusão.....	33
Figura 7.	Fluxograma PRISMA 2020.....	34

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1. Lista de verificação de Avaliação Crítica JBI para ensaios clínicos controlados randomizados.....	36
Tabela 2. Caracterização Metodológica dos estudos considerados na RS.....	37
Tabela 3. Caracterização do tipo de intervenção nos grupos experimental e controlo, regime posológico e outros medicamentos administrados.....	40
Tabela 4. Análise das perdas follow-up através do fluxograma dos ensaios clínicos estudados. .....	43
Tabela 5. Objetivos, escala de avaliação, e limitações identificadas nos estudos analisados.....	44
Tabela 6. Resultados da influência dos probióticos na evolução da SARS-CoV-2 nos estudos analisados.....	46

## **Glossário/Siglas**

**ACE** – Enzima conversora da angiotensina

**ACE2** – Enzima conversora da angiotensina 2

**AJs** – Junções aderentes

**Ang II** – Angiotensina II

**APCs** – Células apresentadoras de antigénio

**AT2** – Células alveolares tipo II

**BatCoV RaTG13** – Coronavírus de morcego RaTG13

**BRAs** – Bloqueadores dos recetores da angiotensina

**Células M** – Células *microfold*

**COVID-19** – Doença por coronavírus 2019

**CoVs** – Coronavírus

**Cox2** – Cicloxigenase 2

**CTD** – Domínio C-terminal

**CFU** – Unidades formadoras de colonias

**DCs** – Células dendríticas

**FP** – Peptídeo de fusão

**GI** – Gastrointestinal

**HCoV-S** – Coronavírus humanos

**HCoV-HKU1** – Coronavírus humano HKU1

**HCoV-OC43** – Coronavírus humano OC43

**HCoV-NL63** – Coronavírus humano NL63

**HCoV-229E** – Coronavírus humano 229E

**HR1** – Repetição heptada 1

**HR2** – Repetição heptada 2

**ICU** – Unidade de cuidados intensivos

**IECAs** – Inibidores da enzima conversora de angiotensina

**IFN** – Interferões

**IFN-I** – Interferões do tipo I

**IFN-III** – Interferões do tipo III

**IgA** – Imunoglobulinas A

**IL** – Interleucina

**JBI** – Instituto Joanna Briggs

**kDa** – kilodalton

**kb** – kilobases

**MERSCoV** – Coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente

**MTD** – Melhor terapia disponível

**NF<sub>κ</sub>b** – Factor nuclear-Kappa B

**NLRs** – Recetores de domínio de oligomerização de nucleotídeos e repetições ricas em leucina

**NSPs** – Proteínas não estruturais

**NTD** – Domínio N-terminal

**N-NTD** – Domínio N-terminal da proteína N

**N-CTD** – Domínio C-terminal da proteína N

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**ORFs** – Quadros de leitura aberto

**ORF8** – Quadro de leitura aberto 8

**PAMs** – Peptídeos antimicrobianos

**PRISMA** – Itens de Relatório para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises

**Proteína E** – Proteína de envelope

**Proteína M** – Proteína de membrana

**Proteína N** – Proteína de nucleocapsídeo

**Proteína S** – Proteína *spike*

**RAAS** – Sistema renina-angiotensina-aldosterona

**RBD** – Domínio de ligação ao recetor

**RE** – Retículo endoplasmático

**RNA** – Ácido ribonucleico

**RS** – Revisão Sistemática

**S1** – Subunidade 1

**S2** – Subunidade 2

**SCFAs** – Ácidos gordos de cadeia curta

**SARS-CoV** – Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave

**SARS-CoV-2** – Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

**SDRA** – Síndrome do desconforto respiratório agudo

**TJs** - Junções apertadas

**TNF** - Fatores de necrose tumoral

**TMPRSS2** - Protéase transmembranar serina 2

**WIV** - Instituto de Virologia de Wuhan

## **1. Introdução**

### **1.1. Origens do SARS-CoV-2**

Os coronavírus (CoVs), foram descritos pela primeira vez em vez em 1966 por Tyrell e Bynoe (Velavan & Meyer, 2020) (Muralidar et al., 2020). Os CoVs são um grupo diversificado de vírus, alguns dos quais patogênicos para o homem e podem causar constipações, bronquiolites, infecções respiratórias leves a graves e conseqüentemente a morte (Hu et al., 2021; Kirtipal et al., 2020).

Os CoVs são vírus que, taxonomicamente, pertencem à família *Coronaviridae* e subfamília *Coronavirinae*. Os CoVs constituem a subfamília *Orthocoronavirinae*, na família *Coronaviridae*, ordem *Nidovirales* e reino *Riboviria*. Estes vírus têm um genoma de ácido ribonucleico (RNA) de cadeia simples de sentido positivo com forma esférica, oval ou pleomórfica. O seu diâmetro varia entre 60 e 140nm. A subfamília pode ser dividida em quatro gêneros: *Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-* e *Delta-coronavírus* (Kadam et al., 2021). Assim, atualmente existem 39 espécies de CoVs em 27 subgêneros, 5 gêneros e 2 famílias que categorizam em família *Coronaviridae* (Kirtipal et al., 2020).

Apenas quatro coronavírus são endêmicos para os humanos, incluindo coronavírus humano OC43 (HCoV-OC43), coronavírus humano HKU1 (HCoV-HKU1), coronavírus humano NL63 (HCoV-NL63) e coronavírus humano 229E (HCoV-229E) (Bakhiet & Taurin, 2021).

Nas últimas décadas, surgiram novos CoVs mortais, provocando doenças altamente infecciosas na sociedade humana, resultando em elevadas ameaças à saúde pública e, naturalmente à economia mundial devido ao seu surgimento imprevisto, proliferação rápida e fácil, que levaram a conseqüências catastróficas (Bai et al., 2021; Kirtipal et al., 2020).

A primeira infecção de coronavírus humanos (HCoVs), o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), ocorreu em novembro de 2002 em Foshan, China, com uma taxa de letalidade de 10%. A doença acabou por ser classificada como uma epidemia e afetou 28 países, com 8096 casos e 774 mortes. A segunda pandemia foi causada pelo coronavírus da síndrome respiratória do Médio Oriente (MERS-CoV), iniciado em junho de 2012 em Jeddah, Arábia Saudita, com uma taxa global de mortalidade de 35% (Kirtipal et al., 2020). A terceira vaga de HCoV, ocorreu em dezembro de 2019, na província de Wuhan, na China, causada por uma nova estirpe altamente homóloga de SARS-CoV, classificada como coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), que designou a infecção como pandemia de doença por coronavírus

2019 (COVID-19). Esta patologia resultou em mais de 1,45 milhões de mortes em todo mundo, à data de 30 de novembro de 2020 (Kirtipal et al., 2020; Trougakos et al., 2021).

Todos os HCoVS são de origem zoonótica, isto é, o seu reservatório natural são animais, assim como a grande maioria dos vírus humanos (Bakhiet & Taurin, 2021; Holmes et al., 2021; Kadam et al., 2021). Atualmente, a origem animal de SARS-CoV-2 ainda permanece desconhecida, pois existe a dúvida se foi transmitido aos humanos por meio de um hospedeiro intermediário, e, se assim foi, quais os animais que podem atuar como hospedeiro intermediário (Holmes et al., 2021; Hu et al., 2021). O SARS-CoV-2 mostra semelhanças com quatro coronavírus humanos endêmicos: HCoV-OC43, HCoV-HKU1, HCoV-229E e HCoV-NL63. Estes vírus têm origens zoonóticas e as circunstâncias do seu aparecimento são ainda desconhecidas (Holmes et al., 2021).

Os vírus análogos ao SARS-CoV-2 foram documentados em morcegos e pangolins em várias localidades no sudeste da Ásia, incluindo China, Tailândia, Camboja e Japão, com evidências sorológicas de infecção viral em pangolins por mais de uma década (Holmes et al., 2021; Hu et al., 2021; Kadam et al., 2021; Kirtipal et al., 2020).

Os morcegos são importantes hospedeiros naturais de alfa e betacoronavírus. O CoV mais próximo ao SARS-CoV-2 foi identificado em morcegos da espécie *Rhinolophus affinis*, da província de Yunnan, China, sendo designado por coronavírus de morcego RaTG13 (BatCoV RaTG13), e apresentando uma sequência genômica completa de 96,2 % idêntica à do SARS-CoV-2 (Hu et al., 2021; M.-Y. Wang et al., 2020). Este vírus de morcego compartilha mais de 90% de identidade de sequência com SARS-CoV-2 em todos os quadros de leitura (ORFs) em todo genoma, incluindo as variáveis S e quadro de leitura aberto 8 (ORF8) (Hu et al., 2021). Outro vírus de morcego foi identificado na espécie *Rhinolophus malayanus*, em espécimes de Yunnan (China), identificado por RmYN02 com 93,3 % de proximidade ao SARS-CoV-2, em todo o seu genoma. No gene 1ab longo, ele exibe 97,2% de identidade com o SARS-CoV-2, superiorizando-se à similaridade do RaTG13. Além disso, os coronavírus de morcego ZC45 e ZXC21 detetados em morcegos *Rhinolophus pusillus* do leste da China, enquadram-se na linhagem SARS-CoV-2 do subgênero *Sarbecovirus* (Hu et al., 2021).

As descobertas de vários coronavírus de morcego estão correlacionadas ao SARS-CoV-2, o que sugere que os morcegos são possíveis reservatórios. Todavia, a divergência entre o SARS-CoV-2 e os coronavírus de morcego, sugerem mais de 20 anos de evolução da sequência. Admite-se, assim, que os coronavírus de morcego possam ser considerados como precursor evolutivo de

SARS-CoV-2, mas não como o progenitor direto do SARS-CoV-2 (Hu et al., 2021). O facto de nenhum reservatório de morcego ou hospedeiro animal intermediário para SARS-CoV-2 ter sido identificado até ao momento, também suporta esta teoria. Alegadamente, isto também pode ocorrer porque certas espécies e/ou populações de animais ainda não tenham sido amostradas e/ou qualquer vírus progenitor possa estar em baixa prevalência. A probabilidade de não deteção de eventos iniciais de transmissão entre espécies é elevada. Acrescente-se que a apenas uma fração muito pequena de transmissão de infeções de animais para humanos resulta em grandes surtos (Holmes et al., 2021).

Os pangolins são possivelmente o hospedeiro ligado ao SARS-CoV-2, pois o vírus foi detetado em tecidos de pangolins malaios que foram transportados do Sudeste Asiático para o sul da China, de 2017 a 2019. Estirpes de coronavírus isoladas em pangolins de Guangdong exibiram 92,4% de similaridade de sequência com o SARS-CoV-2 humano. O seu domínio de ligação ao recetor (RBD) também é altamente semelhante ao do SARS-CoV-2. Estirpes de coronavírus de pangolins de Guangxi são menos semelhantes ao SARS-CoV-2, com 85,5% de identidade de sequência do genoma. Todavia, ao contrário dos morcegos, que têm o coronavírus de forma saudável, os pangolins infetados apresentaram sinais clínicos e alterações histopatológicas, incluindo pneumonia intersticial e infiltração de células inflamatórias em diversos órgãos. Essas anormalidades sugerem que é improvável que os pangolins sejam o reservatório desses coronavírus, mas que provavelmente adquiriram os vírus após disseminação dos hospedeiros naturais (Hu et al., 2021; Kirtipal et al., 2020; M.-Y. Wang et al., 2020).

Outra tentativa de pesquisa para compreender a origem e o hospedeiro intermediário do SARS-CoV-2 foi o alimento de sequência de proteínas. A enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) atua como recetor para SARS-CoV-2. Ao analisar a interação do recetor do hospedeiro com as proteínas pico é possível identificar as espécies que atuam como hospedeiro. Pangolim, tartaruga e cobras foram as espécies que também possuem e expressam recetores ACE2, sendo propostas como hospedeiro intermediário para SARS-CoV-2 (Kadam et al., 2021).

Outras investigações analisaram a suscetibilidade de animais domésticos e de laboratório à infeção por SARS-CoV-2. O estudo demonstrou experimentalmente, que o SARS-CoV-2 se replica eficientemente em gatos e no trato respiratório de furões, enquanto cães, porcos, galinhas e patos não eram suscetíveis ao SARS-CoV-2 (Hu et al., 2021; Shi et al., 2020).

Além disso, outra possível hipótese estudada sobre a origem por SARS-CoV-2 foi a laboratorial. Todavia, o Instituto de Virologia de Wuhan (WIV), Laboratório Nacional de Biossegurança de

Wuhan no Parque Científico de Zhengdian, verificou que não existiram dados suficientes para comprovar a fuga do vírus SARS-CoV-2 do seu laboratório ou de qualquer outro laboratório. O sequenciamento genômico viral sem cultura de células realizado no WIV representou um risco insignificante, pois os vírus são inativos durante a extração de RNA e a inexistência de casos de fuga laboratorial foram documentados após o sequenciamento de amostras virais (Holmes et al., 2021).

Para além disso, o WIV cultivou três SARS-CoVs de morcegos-WIV1, WIV16 e Rs4874 tendo maior afinidade com o SARS-CoV do que ao SARS-CoV-2. Em contraste, o vírus de morcego RaTG13 do WIV nunca foi isolado ou cultivado, existindo uma sequência de nucleotídeos montada a partir de leituras de sequenciamento curto. Os três vírus cultivados foram isolados de amostras fecais por meio de amplificação em série em células Vero E6, que consiste na perda do local de clivagem da furina SARS-CoV-2. Deste modo, é improvável que estas técnicas resultem no isolamento de um progenitor SARS-CoV-2 com um local de clivagem de furina intacto. Nenhum trabalho publicado indica que outros métodos, como a geração de sistemas de genética reversa, tenham sido usados no WIV para propagar SARS-CoVs, com base em dados de sequência de morcegos (Holmes et al., 2021). Além disso, não existe razão experimental racional para que um novo sistema genético seja desenvolvido usando um vírus desconhecido e não publicado, sem evidência ou referência de um vírus do tipo SARS-CoV-2 em qualquer publicação ou estudo anterior do WIV. Assim sendo, em qualquer cenário de fuga de laboratório, o SARS-CoV-2 teria de estar presente em laboratório antes da pandemia de COVID-19, não existindo quaisquer evidências que o comprovem, até ao momento (Holmes et al., 2021).

## **1.2. Características estruturais do SARS-CoV-2**

O tamanho do genoma do SARS-CoV-2 é significativo e equivale a 29,99 kilobases (kb), contendo 14 ORFs e codifica 29 proteínas virais (Gusev et al., 2022; Yang & Rao, 2021). Aproximadamente, dois terços da extremidade 5'A do genoma codificam duas poliproteínas sobrepostas: pp1a e pp1ab12. Estas são digeridas por duas protéases virais em 16 proteínas não estruturais (NSPs), desempenhando funções essenciais para a replicação e transcrição viral. Quatro ORFs no terminal 3' do genoma viral codificam um conjunto canónico de proteínas estruturais que incluem o nucleocapsídeo (N), proteína *spike* (S), proteína de membrana (M) e a proteína de envelope (E), que são responsáveis pela montagem do virião e pela supressão da resposta imune do hospedeiro (Gusev et al., 2022; Yang & Rao, 2021; X. Zhao et al., 2020).

### 1.2.1. Proteína *spike*

A entrada do CoV nas células hospedeiras é mediada pela glicoproteína S. As glicoproteínas de pico transmembranar formam homotrímeros, que se projetam na superfície viral como uma coroa (M.-Y. Wang et al., 2020; Yang & Rao, 2021). Esta é uma proteína de membrana tipo I com 66 glicanos N-ligados por trímero de proteína S19. Também pertence às proteínas de fusão viral de classe I, exemplificadas pela proteína hemaglutinina do vírus *influenza* (Jackson et al., 2022). A proteína S é composta por duas subunidades funcionais, a subunidade 1 (S1) e subunidade 2 (S2). O domínio S1 atua como um antígeno de superfície principal, contendo o domínio N-terminal (NTD) e o domínio C-terminal (CTD). A S1-CTD atua como RBD, que interage com os 18 resíduos da ACE-2 (Kadam et al., 2021; Yang & Rao, 2021). O RBD tem dois subdomínios, uma estrutura central formada por uma folha  $\beta$  antiparalela de cinco cadeias coberta com  $\alpha$ -hélices curtas de conexão em ambos os lados e uma alça estendida, denominada “motivo de ligação ao recetor”, que envolve uma borda do núcleo estrutura e faz todos os contatos com a ACE2 (Jackson et al., 2022; Yang & Rao, 2021). O RBD pode adotar dois estados conformacionais distintos: o estado fechado e o estado aberto (M.-Y. Wang et al., 2020; Yang & Rao, 2021). No estado fechado, os ângulos RBD estão próximos da cavidade central do trímero para proteger as regiões de ligação ao recetor. E no estado aberto, o RBD sofre movimento conformacional tipo dobradiça, expondo as suas regiões determinantes para reconhecer o recetor humano da ACE2 na membrana celular do hospedeiro, sendo menos estável do que no estado fechado (Yang & Rao, 2021). O NTD é formado por 4 folhas  $\beta$  acumuladas e um número de *loops* flexíveis de conexão, contendo vários glicanos N-ligados (Jackson et al., 2022). O NTD pode reconhecer porções de açúcar na ligação inicial e desempenhar um papel significativo na transição da conformação da proteína S (Yang & Rao, 2021). O NTD do SARS-CoV-2 é alvo de alguns anticorpos neutralizantes, sugerindo que pode ser funcionalmente importante ou localizado nas proximidades de outras regiões funcionalmente críticas, como o RBD (Jackson et al., 2022). As variantes recém-emergidas geralmente têm mutações e deleções no NTD, tornando-as resistentes a esses anticorpos neutralizantes (Jackson et al., 2022).

A subunidade S2 contém um peptídeo de fusão, uma repetição heptada 1 (HR1), uma hélice central, um domínio conector, uma repetição heptada 2 (HR2), um domínio transmembranar e uma cauda citoplasmática (Kadam et al., 2021; M.-Y. Wang et al., 2020). A região HR1 constitui a principal haste helicoidal de S2, enquanto a região HR2 é temporariamente flexível no estado de

pré-fusão. O peptídeo de fusão forma um seguimento hidrofóbico curto (Yang & Rao, 2021). A função da S2 é fundir as membranas dos vírus e das células hospedeiras. O local de clivagem na fronteira entre as subunidades S1 e S2 é designado de local de clivagem da protéase S1/S2. As protéases do hospedeiro clivam a glicoproteína no local de clivagem S2 para ativar as proteínas que são críticas para fundir as membranas dos vírus das células hospedeiras por meio de alterações conformacionais irreversíveis. Os glicanos ligados a N são fundamentais para o dobramento adequado, neutralizando os anticorpos e fixando os trímeros de proteína de pico (M.-Y. Wang et al., 2020).

A proteína S tem duas formas de estrutura, nomeadamente o estado fechado e o aberto. No estado fechado os três motivos de reconhecimento não se projetam da interface formada por três protómeros de proteína S. O estado aberto é necessário para a fusão do SARS-CoV-2 e das membranas das células hospedeiras, facilitando assim a entrada do SARS-CoV-2 nas células (M.-Y. Wang et al., 2020).

Deste modo, a proteína S é responsável pelo reconhecimento do recetor e fusão da membrana celular, cuja estrutura permite interação com muitos recetores nas células hospedeiras (Gusev et al., 2022).

### **1.2.2. Proteína de Envelope**

A proteína E é um pequeno polipeptídeo com 8,4 a 12 kilodalton (kDa), que regula a lise viral e a libertação do genoma viral (Kadam et al., 2021; Yang & Rao, 2021). Esta possui o domínio transmembranar hidrofóbico e a cauda citoplasmática carregada (Kadam et al., 2021). Também está envolvida na montagem e génese viral, localizando-se no retículo endoplasmático (RE) e nas membranas do complexo de Golgi. Além disso, participa na ativação do inflamassoma do hospedeiro (Yang & Rao, 2021).

A proteína E é a proteína mais estável entre os CoVs estudados, apresentando características e funções comuns. Por exemplo, a proteína SARS-CoV-E é idêntica à SARS-CoV-2, contendo apenas quatro variações. Assim, acredita-se que as características mostradas pela proteína SARS-CoV-E, incluindo a atividade do canal iónico, também sejam exibidas pela proteína SARS-CoV-2. A proteína E de CoV é responsável pela “oligomerização” resultando na formação de viroporina (Kadam et al., 2021).

As viroporinas têm a capacidade de transportar seletivamente iões como cálcio e participam na aglomeração e libertação de partículas virais de células hospedeiras. A proteína CoV E é

reconhecida por contribuir na patogênese da doença. Participa no aumento de carga de dobramento de proteínas no RE, resultando num dobramento incorreto de proteínas emergindo uma condição conhecida como resposta de proteína desdobrada. Para além disso, a proteína E participa na formação da estrutura especializada do compartimento intermediário do RE do complexo Golgi, facilitando a libertação de vírus amadurecidos (Kadam et al., 2021).

A proteína E auxilia na secreção de viriões maduros das células hospedeiras e na atividade do canal iónico, inibindo a resposta ao *stress* da célula hospedeira e consequentemente na patogênese (Kirtipal et al., 2020).

Em síntese, a proteína E promove a montagem e libertação do vírus, adultera as propriedades dos canais de membrana, nomeadamente através da viroporina, contribuindo para os danos da barreira epitelial, e, em última instância, para a patogênese e gravidade do COVID-19. A função do canal iónico alterada está associada à ativação de inflamassomas e de hiperinflamação nos pulmões. Assim, a proteína E tem potencial para despoletar a “tempestade de citocinas” e o desenvolvimento de um análogo experimental de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) (Gusev et al., 2022).

### **1.2.3. Proteína de Membrana**

A proteína M é a proteína de membrana mais abundante dos CoVs. Esta apresenta três domínios transmembranares: o CTD, NTD e a região anfipática. Esta região anfipática é altamente conservada entre os membros *Coronaviridae*. Assim, a proteína M interage com a S e E, resultando na forma característica do envelope do virião (Kadam et al., 2021).

A sequência da proteína M do SARS-CoV-2 foi comparada com a do morcego CoV RaTG13 e do pangolim malaio CoV MP789. Verificaram-se mutações no domínio transmembranar N-terminal que podem contribuir para a transferência entre espécies do SARS-CoV-2 (Kadam et al., 2021).

Através das interações proteína-proteína, a proteína M é responsável pela construção viral e pela homeostase interna. As proteínas CoV M podem interagir com RNAs, que codificam os sinais de empacotamento do genoma. Assim, existe a possibilidade da proteína M regular a replicação e empacotamento de RNA em partículas de vírus maturados (Kadam et al., 2021).

Por fim, a proteína M do SARS-CoV interage com o fator nuclear B (NF-Kb) da célula hospedeira, diminuindo a expressão genética da cicloxigenase 2 (Cox2). Além disso, a proteína M influencia a patogênese ao sequestrar a resposta inflamatória do hospedeiro mediada por NF-Kb e Cox-2 (Kadam et al., 2021).

Em suma, a proteína M tem a capacidade de ligar a outras proteínas estruturais, como S e E, e determina a forma do envelope viral. Esta participa no empacotamento do genoma na partícula viral; estrutura a partícula viral; inibe a fosforilação de transdutor de sinais e ativador de transcrição 1 (Gusev et al., 2022).

#### **1.2.4. Proteína Nucleocapsídeo**

A proteína N varia de 43 a 50 kDa com ligação ao RNA genómico (Kadam et al., 2021). Esta proteína estrutural localizada dentro do virião desempenha um papel crucial na proteção no genoma do RNA viral, e no acondicionamento no complexo de ribonucleoproteína (Yang & Rao, 2021).

A proteína N é responsável pelo antagonismo face à resposta imune do hospedeiro e combate as atividades antivirais mediadas por RNA interferência celular, através de sua ligação com '*strings*' de RNA de cadeia dupla, sendo considerado um supressor viral de inativação de RNA (Yang & Rao, 2021).

A proteína N tem dois domínios estruturais conservados, o NTD (N-NTD) e o CTD (N-CTD). Nas estruturas cristalinas da proteína N, o N-NTD é classificado com um monómero, enquanto o N-CTD, como dímero (Yang & Rao, 2021). O N-NTD possui uma forma de um punho destro e é constituída por uma folha  $\beta$  antiparalela de quatro cadeias. As cadeias que se projetam para fora do núcleo são carregadas positivamente, para permitir a ligação do RNA (Kadam et al., 2021; Yang & Rao, 2021). O N-CTD medeia a dimerização da proteína N por auto-associação e contém um sinal de localização nuclear. Além disso, tem papel importante na oligomerização da proteína do nucleocapsídeo e nas interações proteína N- proteína M. Para além disso, a proteína N desempenha funções na replicação e transcrição de RNA viral, pela formação e manutenção do complexo ribonucleoproteína, pelas interações vírus-hospedeiro, e pela multiplicação e disseminação do vírus (Kadam et al., 2021).

### **1.3. Ciclo de vida SARS-CoV-2**

O ciclo de vida de SARS-CoV-2 inicia com a ligação da glicoproteína S ao recetor celular ACE2 na célula hospedeira, através da região específica do RBD da proteína S. Após esta ligação, o vírus entra na célula endocitado numa vesícula da membrana celular (Bakhiet & Taurin, 2021). Na interação RBD-recetor, a proteína S sofre clivagem proteolítica na subunidade S1 N-terminal e na S2 C-terminal das proteases do hospedeiro. Esta proteólise parcial é catalisada pela protease

transmembranar serina 2 (TMPRSS2) e pode ser ativada pela furina ou por proteases tipo furina ou após endocitose por catepsinas B/L (Gusev et al., 2022). O RBD da S1 liga-se ao domínio peptídico de ACE2, desencadeando o *priming* de S1 na junção S1/S2 por proteases celulares, com furina ou proteases endossomais e expõe um sítio secundário (S2') clivado pela TMPRSS2, que revela o peptídeo de fusão da subunidade S2. A clivagem modifica a conformação da proteína S clivada de forma irreversível e permite que a subunidade S2 se insira na membrana do hospedeiro e guie a fusão das membranas viral e celular (Bakhiet & Taurin, 2021).

O genoma viral é libertado no citosol após a fusão da membrana e do hospedeiro sofrendo a replicação, transcrição, tradução e montagem para formar progénies virais que são libertados no espaço extracelular (Sanyal, 2020).

A amplificação e a libertação do vírus levam à piroptose da célula hospedeira e à excreção de padrões moleculares associados a danos, incluindo adenosina trifosfato, e ácidos nucleicos, sendo estes eventos acompanhados pela secreção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Sanyal, 2020). As proteínas não estruturais reorganizadas derivam da porção da membrana do retículo endoplasmático rugoso em vesículas, cuja montagem viral é organizada. Por fim, os vírus são excretados da célula hospedeira por exocitose (Bakhiet & Taurin, 2021).

### **1.3.1. Diferentes entradas da SARS-CoV-2**

A entrada de coronavírus é realizada por dois processos de clivagem da S, isto é, um na junção da subunidade S1 e S2 e outro no local S2', interno à subunidade S2. No caso do SARS-CoV-2, a sequencia polibásica no limite S1-S2 é clivada durante a maturação do vírus numa célula infetada, contudo o local S2' é clivado na célula-alvo após a ligação da ACE2 (Jackson et al., 2022).

A ligação do vírus à ACE2 incita alterações conformacionais na S1 e expõe o local de clivagem S2' na subunidade S2. O local de clivagem S2' é clivado por diferentes proteases, pois depende dos diferentes trajetos percorridos pelo SARS-CoV-2. Se o complexo vírus-ACE2 não encontrar TMPRSS2, o complexo vírus-ACE2 é internalizado por via endocitose por clatrina nos endossomas, cuja clivagem S2' é realizada pela catepsina, que necessita de um ambiente ácido para a sua etapa. Enquanto, na presença de TMPRSS2, a clivagem S2' ocorre na superfície da célula. É possível verificar que em ambas vias entrada, a clivagem S2' expõe o peptídeo de fusão (FP) e a dissociação de S1 e S2, induzem mudanças conformacionais na S2, impulsionando o FP na membrana alvo, iniciando a fusão da membrana. E por fim, a fusão entre a membrana viral e

celular forma um poro de fusão, cujo RNA viral é libertado no citoplasma da célula hospedeira para desencapsulamento viral e para a replicação (Jackson et al., 2022).

#### **1.4. Potenciais alvos para combate da SARS-CoV-2**

Possíveis mecanismos de combate de SARS-CoV-2 são: bloqueio da proteína S, bloqueio do recetor ACE2 e inibição de TMPRSS2 (Muralidar et al., 2020).

##### **1.4.1. Bloqueio da Proteína S**

A proteína S é um dos principais alvos para a conceção de várias terapias antivirais para CoVs. A proteína S é estável em termos de imunogenicidade e ligação ao recetor ACE2, o que torna o potencial mediador para iniciar a entrada viral na célula hospedeira (Muralidar et al., 2020).

As terapias antivirais contra a proteína S, envolvem anticorpos neutralizantes contra proteína S, bloqueadores de RBD-ACE2, inibidores de clivagem S e inibição da proteína S. Os anticorpos neutralizantes demonstraram uma redução significativa da gravidade na patologia pulmonar de primatas não humanos que foram infetados pela infeção por MERS-CoV (B, Korber et al., sem data; Muralidar et al., 2020; Pang et al., 2020).

##### **1.4.2. Bloqueio do recetor ACE2**

Outra possível estratégia eficiente para combater o SARS-CoV-2 é bloquear o recetor ACE2 para que a ligação da proteína S viral e a fusão da membrana pela entrada viral possam ser evitadas. O condicionamento do ACE2 pode ser alcançado pela administração de compostos dotados de pequenos domínios de ligação ao recetor RBD, que bloqueou efetivamente a entrada da SARS *in vitro* (Muralidar et al., 2020; Wong et al., 2004)

Existem implicações terapêuticas no bloqueio de ACE2, nomeadamente ao nível do sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS). A ACE2 é um componente contra regulatório vital do RAAS, pois degrada a angiotensina II (Ang II) em angiotensina-(1e7), que controla a fibrose, vasoconstrição e a retenção de sódio. A modulação farmacológica do RAAS com inibidores da enzima conversora de angiotensina (IECAs) e bloqueadores dos recetores da angiotensina (BRAs) é benéfica no tratamento da insuficiência cardíaca e controlo da hipertensão. A suscetibilidade da infeção por SARS-CoV *in vitro* está relacionada à expressão de ACE2, contudo ainda não existe conexão direta entre a expressão de ACE2 e a infeção por SARS-CoV-2 (Hofmann et al., 2004; Muralidar et al., 2020).

Após a entrada viral, os níveis de ACE2 diminuem levando a um aumento da libertação de Ang II, que potencia o desenvolvimento de síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). A pequena concentração de ACE2 nos tecidos pulmonares foi acompanhada de edema pulmonar, e elevada permeabilidade vascular em camundongos, após infecção por SARS-CoV. Foi possível verificar ainda que, a injeção de proteína S provocou lesão pulmonar aguda ao diminuir a ACE2 nos pulmões, que foi posteriormente melhorada pela administração de IECAs/BRAs (Kuba et al., 2005; Muralidar et al., 2020).

Por fim, vários estudos destacaram o papel dos IECAs/BRAs, pois têm a capacidade de regular positivamente os níveis de expressão de ACE2 além de inibir a enzima conversora da angiotensina (ACE) ou bloquear o recetor tipo 1 da angiotensina II (Ferrario et al., 2005; Karram et al., 2005; Muralidar et al., 2020).

### **1.4.3. Inibição de proteases de TMPRSS2**

O TMPRSS2 é responsável por desencadear e ativar a infecção e a entrada de CoVs, tendo um papel crucial na clivagem da proteína S da SARS-CoV-2, mediando, conseqüentemente, a entrada viral. Deste modo, a inibição desta protease celular hospedeira pode atuar como uma potencial intervenção antiviral contra SARS-CoV-2. Evidências experimentais sugeriram que o mesilato de camostato é um potencial inibidor do TMPRSS2, bloqueando ativamente a infecção por SARS-CoV-2 em células pulmonares (Hoffmann et al., 2020; Martinez, 2020; Muralidar et al., 2020; C. Wu et al., 2020).

## **1.5. Evolução epidemiológica de SARS-CoV-2**

No final de dezembro de 2019, várias unidades de saúde Wuhan, na província de Hubei, na China, registaram vários doentes com pneumonia de causa desconhecida (Zhu et al., 2020). Os pacientes com SARS-CoV e MERSCoV, apresentaram sintomas de pneumonia viral, incluindo febre, tosse e desconforto torácico e, em casos graves, dispneia pulmonar (Gralinski & Menachery, 2020; Zhu et al., 2020). De acordo com um estudo retrospectivo, o início do primeiro caso conhecido foi a 8 de dezembro de 2019 (Z. Wu & McGoogan, 2020). No dia 31 de dezembro de 2019, a Comissão Municipal de Saúde de Wuhan notificou o surto de 27 casos de pneumonia de causa desconhecida (Z. Wu & McGoogan, 2020).

Através de sequenciamento metagenômico de RNA e isolamento de vírus de amostras de líquido bronco-alveolar de doentes com pneumonia grave, foi possível identificar o agente causador, isto

é, betacoronavírus (F. Wu et al., 2020; Zhou et al., 2020; Zhu et al., 2020). A 9 de janeiro de 2020 foi divulgado publicamente o resultado desta identificação etiológica. A primeira sequência genômica do novo CoVs foi publicada no site Virological em 10 de janeiro. Sequências genômicas incompletas foram também determinadas por diferentes institutos de pesquisa e foram divulgadas através do banco de dados GISAID, a 12 de janeiro (Gralinski & Menachery, 2020). Assim, a 11 de março de 2020, a OMS caracterizou oficialmente o COVID-19 como uma pandemia (Hu et al., 2021; World Health Organization, 2020).

### **1.5.1. Sintomas da SARS-CoV-2**

Todas as idades da população são suscetíveis à infecção por SARS-CoV-2, sendo que a idade média da infecção é de 50 anos (Huang et al., 2020; D. Wang et al., 2020). Contudo, as manifestações clínicas diferem com a idade: homens com mais de 60 anos, com comorbilidades, são mais propensos a desenvolver doença respiratória grave. Já a maioria dos jovens e crianças tem apenas doenças leves, ou são assintomáticos (Chen et al., 2020; Hu et al., 2021). Os sintomas mais comuns na SARS-CoV-2 são a febre, fadiga e tosse seca, e, em situações muito graves, dispneia. Outros sintomas incluem tosse produtiva, dor de cabeça, hemoptise, diarreia, anorexia, dor de garganta, dor no peito, calafrios e náuseas e vômitos (Hu et al., 2021; D. Wang et al., 2020). Distúrbios do olfato e paladar foram também relatados (Giacomelli et al., 2020). Maioritariamente, os sintomas aparecem após um período de incubação de 1 a 14 dias, sendo o aparecimento da maioria dos sintomas mais comum, ao fim de 5 dias. São exceções a dispneia e a pneumonia que se desenvolvem num tempo médio de 8 dias após o início da doença (Hu et al., 2021).

A COVID-19 pode ser dividida em três níveis, de acordo com a gravidade da doença (M.-Y. Wang et al., 2020):

- Leve
  - Tosse, fadiga, pneumonia e pneumonia leve.
- Grave
  - Dispneia, saturação de oxigênio no sangue  $\leq 93\%$ , frequência respiratória  $\geq 30/\text{min}$ , pressão parcial de oxigênio arterial para fração inspirada de oxigênio  $< 300$  e/ou infiltrados pulmonares  $> 50\%$  em 24 a 48 h, necessária hospitalização em unidade de cuidados intensivos (ICU).
- Crítico

- Vulgarmente, SDRA, insuficiência respiratória, choque séptico e/ou disfunção ou falência de múltiplos órgãos, acidose metabólica de difícil correção, disfunção da coagulação.

### 1.5.2. Distribuição e expressão de ACE2 na SARS-CoV-2

A internalização da ACE2 pelo SARS-COV-2 é responsável pela redução dos níveis de ACE2 na superfície epitelial das vias aéreas (Ashraf et al., 2021; Jia et al., 2005; South et al., 2020). Geralmente, pacientes sintomáticos com SARS-CoV-2 têm febre, tosse, congestão nasal, fadiga e outros sinais de infecção do trato respiratório superior, que pode evoluir para SDRA tendo uma taxa de sobrevivência baixa (Lukassen et al., 2020). A expressão de ACE2 está presente nos pulmões, e em diversos tecidos, como a mucosa nasal e oral, tecido vascular, rim, coração, trato gastrointestinal (GI), pâncreas e cérebro. A ACE2 tem um papel crucial na regulação do RAAS, sendo um importante regulador da pressão arterial, homeostase de fluidos e eletrólitos (Ashraf et al., 2021) (Figura 1).

Função da ACE2 em Condições Fisiológicas Normais
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cérebro</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Função cognitiva e de memória normais; regulação do barorreflexo.</li> </ul> </li> <li>• <b>Cavidade Oral e Língua</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regulação da sensibilidade gustativa</li> </ul> </li> <li>• <b>Coração e Rins</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula sistema renina-angiotensina-aldosterona ; ativação do óxido nítrico endotelial; natriurese.</li> </ul> </li> <li>• <b>Pulmões</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula vasodilatação; protege a função endotelia; inibe a resposta inflamatória.</li> </ul> </li> <li>• <b>Pâncreas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Metabolismo da glicose; resposta à insulina; proliferação de células <math>\beta</math>.</li> </ul> </li> <li>• <b>Trato Gastrointestinal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Regula o transporte de aminoácidos; modula a inflamação intestinal; influência a composição da microbiota intestinal; expressão de peptídeos antimicrobianos.</li> </ul> </li> </ul>
Potenciais Disfunções da ACE2 Causadas pela Infecção por SARS-CoV-2
<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Cérebro</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Diminuição cognitiva e de memória; sensibilidade reduzida ao barorreflexo; hipertensão neurogénica.</li> </ul> </li> <li>• <b>Cavidade Oral e Língua</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ageusia</li> </ul> </li> <li>• <b>Coração e Rins</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Aumento dos níveis circulantes de angiotensina II; disfunção endotelial vascular; aumento da reabsorção de sódio; aumento da retenção de água; <i>stress</i> oxidativo; fibrose miocárdica.</li> </ul> </li> <li>• <b>Pulmões</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Bronquite; pneumonia; insuficiência respiratória.</li> </ul> </li> <li>• <b>Pâncreas</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Intolerância à glicose; secreção reduzida de insulina; diminuição da massa e proliferação das células <math>\beta</math>.</li> </ul> </li> <li>• <b>Trato Gastrointestinal</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Desnutrição de aminoácidos; aumento da inflamação intestinal; disbiose intestinal; disfunção da barreira intestinal.</li> </ul> </li> </ul>

Figura 1. Função ACE2 em normais condições fisiológicas versus potenciais interrupções de ACE2 por infecção SARS-CoV-2.

### 1.5.2.1 Pulmões

Através do sequenciamento de RNA concluiu-se que a ACE2 é expressa em 0.64% de todas as células pulmonares humanas e mais abundantemente nas células alveolares tipo II (AT2), sendo responsáveis na defesa da integridade e funções dos alvéolos (Ashraf et al., 2021; Huang et al., 2020; Y. Zhao et al., 2020).

A ACE2 e COVID-19 estão associadas à suscetibilidade geral à SDRA. Ao nível da patogénese da SDRA, possui 3 fases:

#### ❖ Fase exsudativa (Fase 1)

Exibe inflamação epitelial alveolar. Isto ocorre devido ao dano mediado por células imunes inatas das barreiras endoteliais e epiteliais alveolares, resultando na acumulação de fluído de edema rico em proteínas dentro do interstício pulmonar e dos alvéolos (Thompson et al., 2017). Consequentemente, existe uma deterioração da função do surfactante e da depuração do líquido pulmonar, originando um aumento da tensão superficial do pulmão, colapso alveolar e uma diminuição significativa de oxigénio no sangue (hipoxemia) (Luks et al., 2020).

#### ❖ Fase proliferativa (Fase 2)

Esta fase inicia o processo de reparação. A homeostase tecidual é restaurada pela expansão dos fibroblastos residentes e pela proliferação de células progenitoras das vias aéreas e AT2, que se diferenciam em células alveolares tipo 1 (Ashraf et al., 2021; Thompson et al., 2017).

#### ❖ Fase fibrótica (Fase 3)

Normalmente associada à ventilação mecânica prolongada e ao aumento da mortalidade. Exibe danos extensos na membrana basal celular e reepitelização tardia do tecido pulmonar, resultando no desenvolvimento de fibrose intersticial e intra-alveolar (Ashraf et al., 2021; Thompson et al., 2017).

A ACE2 desempenha um papel crucial no desenvolvimento na SDRA, pois altos níveis de ACE2 com Ang II, e o recetor de Ang II tipo 1 são responsáveis pela progressão da lesão pulmonar. Assim, a ACE2 e o recetor da Ang II tipo 2 melhoram os sintomas da SDRA (Imai et al., 2005). Como o SARS-CoV-2 usa ACE2 para entrada nas células, admite-se que a degradação da angiotensina I e Ang II pela ACE2 possa ser regulada negativamente. Consequentemente os níveis de recetor de ACE, Ang II e Ang II tipo 1 exacerbarão a promoção da lesão pulmonar (Ashraf et al., 2021).

Deste modo, a ACE2 recombinante pode ligar-se ao SARS-CoV-2 e neutralizar o vírus, além de retardar a atividade celular do ACE2, que regula negativamente a RAAS para proteger os

pulmões, e conseqüentemente diminuir a propagação viral (Ashraf et al., 2021; Kuhn et al., 2004; Y. Wu et al., 2020).

### **1.5.2.2 Cavidade Oral e Língua**

O principal método de transmissão de COVID-19 é através de gotículas líquidas geradas nas cavidades oral e nasal (Ashraf et al., 2021). A ACE2 é expressa na mucosa da cavidade oral, particularmente em células epiteliais orais, tornando-se uma possível localização de alto risco para infecção por SARS-CoV-2 (H. Xu et al., 2020). Estudos em camundongos verificaram que a Ang II está presente no tecido oral e nas papilas gustativas, permitindo que seja degradada pela ACE2. Além disso, o recetor ACE está envolvido na regulação de curto prazo da sensibilidade gustativa por meio de uma enzima local, desempenhando um papel funcional nas vias homeostáticas sistêmicas e locais (Ashraf et al., 2021; Shigemura et al., 2019).

Geralmente, os sintomas clínicos associados a casos mais leves de COVID-19 são a ageusia, perda do paladar, e anosmia, perda do olfato (Sayin et al., 2020; Vaira et al., 2020). Uma possível hipótese para controlar estes sintomas são o bloqueio da interação ACE2/SARS-CoV-2, ainda que sejam necessários mais estudos. Atualmente, o único tratamento para anosmia e ageusia no COVID-19 é aplicação de esteroides nasais (Ashraf et al., 2021; Vaira et al., 2020).

A cavidade oral é uma entrada e saída para as partículas virais, e o uso da saliva é uma matriz de triagem não invasiva, precisa, rápida e eficaz para detecção precoce e diagnóstico de doenças (Ashraf et al., 2021; Sri Santosh et al., 2020). A recolha de saliva é uma alternativa para o uso de zaragatoas nasofaríngeas e orofaríngeas, que provocam desconforto para o doente e potencial perigo para os profissionais de saúde (Ashraf et al., 2021; Williams et al., 2020).

Para além disso, verificou-se que a expressão de ACE2 é maior nas glândulas salivares menores do que nos pulmões, corroborando a potencial utilização das amostras da saliva para diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 (Ashraf et al., 2021; Baghizadeh Fini, 2020).

### **1.5.2.3 Trato Gastrointestinal**

O epitélio gastrointestinal é o local de ligação de ACE2 no sistema de órgãos GI (Harmer et al., 2002). A maior expressão de ACE2 está presente na borda em escova de enterócitos intestinais maduros, localizada com a proteína vilina, um marcador de tecido para o epitélio intestinal (Ashraf et al., 2021; Lamers et al., 2020; Zang et al., 2020).

O déficit de ACE2 nas células epiteliais intestinais, geralmente são associadas à disbiose na microbiota intestinal, má absorção de aminoácidos na dieta, disfunção da barreira intestinal e aumento da colite, desempenhando um papel fundamental na regulação da inflamação intestinal. A diminuição de ACE2 devido à infecção por SARS-CoV-2 pode aumentar o desconforto gastrointestinal, diarreia e outros sintomas GI relacionados com COVID-19, levando a um risco aumentado de infecção oportunista e síndrome metabólica exacerbada (Ashraf et al., 2021; Duvallet et al., 2017).

#### **1.5.2.4 Cérebro**

A expressão de ACE2 no cérebro ocorre nas células gliais, neurónios e fluido espinhal (Ashraf et al., 2021; X.-L. Wang et al., 2016). Esta é responsável pela regulação do barorreflexo, e quando a ACE2 é inibida existe uma diminuição na sensibilidade do barorreflexo (Xia & Lazartigues, 2008). Consequentemente, pode ocorrer um aumento na pressão arterial devido à desregulação dos mecanismos simpáticos e endócrinos (Tikellis & Thomas, 2012; Xia et al., 2013).

Estudos *in vivo* em camundongos transgênicos para ACE2 verificaram que o SARS-CoV entra no cérebro através do bulbo olfativo, permitindo que a infecção se propague rapidamente para todo o cérebro. Por conseguinte, ocorre uma infecção neuronal, levando à morte dos camundongos (Ashraf et al., 2021; Netland et al., 2008). Um dos sintomas com SARS-CoV-2 é alteração no olfato, por estar relacionado com a entrada do vírus pela placa cribiforme do osso etóide que protege o bulbo olfatório, ou seja, uma estrutura neural responsável pela transmissão de cheiros do nariz ao cérebro (Ashraf et al., 2021; Baig et al., 2020).

A infecção por SARS-CoV-2 pode ter consequências graves no tecido cerebral, pois autópsias de pacientes falecidos indicaram edema do tecido cerebral e degeneração neuronal parcial (Z. Xu et al., 2020). Um estudo com 214 pessoas com COVID-19 verificou que 36% exibiram diferentes tipos de sintomas neuro vasculares que foram categorizados como sintomas do sistema nervoso central, periférico e musculoesquelético (Ashraf et al., 2021; Mao et al., 2020).

## 1.6. Patogénese viral por SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 tem um elevado nível de variabilidade genética, pois possui um grande genoma e proteoma com elevadas multifuncionalidades. Com isto, o SARS-CoV-2 pode infectar as células-alvo no trato respiratório superior, epitélio dos alvéolos e intestinos. O SARS-CoV-2 também inibe os efeitos protetores precoces dos interferões (IFN) do tipo um (IFN-I) e tipo três (IFN-III) e outros sistemas de defesa antivirais inatos. O SARS-CoV-2 provoca a formação de simplastos de células infectadas e saudáveis e vesículas extracelulares contendo o vírus, que o ajudam a contornar as barreiras biológicas do epitélio e a propagar por todo corpo (Gusev et al., 2022).

Como outras infecções virais, o COVID-19 pode implementar vários estágios de patogénese, nomeadamente (Gusev et al., 2022):

- Invasão e replicação forçada do vírus nos tecidos tegumentares
  - No epitélio do trato respiratório e intestinos;
  - Os principais mecanismos são o reconhecimento das células-alvo pelo vírus por meio de estruturas recetoras e o bloqueio da resposta primária do IFN-I-III.
- A perda induzida por vírus das funções de barreira no foco da inflamação
  - Através da desregulação da resposta imune inata e adaptativa controlada pelos fatores de patogenicidade.
  - A supressão seletiva de mecanismos antivirais específicos, a ativação policlonal indiscriminada de linfócitos, e o desenvolvimento de hipoinflamação.
- Generalização do vírus no corpo
  - Alterações sistémicas no estado imunológico e parâmetros de homeostase com alto risco de complicações críticas.
- Consequências a longo prazo de uma infecção viral
  - As consequências do dano tecidual primário (viral) e secundário (autógeno) são várias, como modificação da integridade da barreira hematoencefálica, disfunção endotelial, hipercoagulação e alterações persistentes no estado imunológico.

Como referido anteriormente, as proteínas do SARS-CoV-2 são fatores patogénicos multifuncionais que atuam em vários mecanismos de imunidade antiviral. Estas proteínas, têm a capacidade de bloquear quase todos os estágios de iniciação e implementação da resposta do IFN. Esses mecanismos associam-se à capacidade que o vírus possui de superar efetivamente as funções da barreira dos tecidos tegumentares no período inicial da doença e contribua para a

disfunção da resposta imune associada ao IFN- $\gamma$  em fases posteriores do processo inflamatório (Gusev et al., 2022).

Por fim, outra característica de patogenicidade do SARS-CoV-2 é a capacidade de atuar em vários processos de desenvolvimento de stress celular pró-inflamatório em diferentes tipos de células, nomeadamente a formação de inflamassomas, stress oxidativo, resposta de RNAs não codificantes, autofagia, expressão de fatores de transcrição universais de stress celular e a formação de fenótipo secretor associado a rede de citocinas. Assim, estes mecanismos dão a possibilidade ao vírus de se replicar em várias células, induzir disfunção imune e formar padrões anormais de inflamação (Gusev et al., 2022).

### **1.7. Microbiota humana: Visão geral**

Os micróbios vivem e multiplicam-se constantemente no nosso planeta, sendo essenciais para manter os fluxos de massa e energia em ambientes naturais e artificiais. Um exemplo são as bactérias do solo, que permitem a decomposição natural de detritos orgânicos. O corpo humano contém, aproximadamente,  $3.8 \times 10^{13}$  bactérias, o que equivale ao número total de células humanas. Maioritariamente, as bactérias desempenham funções vitais, como a digestão de alimentos, sem as quais os humanos não sobreviveriam. As pegadas microbianas estão presentes em genes humanos, e sensivelmente 8% do genoma humano contém fragmentos de genes retrovirais. Estes são considerados "fósseis genéticos", pois são relíquias de ancestrais humanos que sobreviveram a vírus e epidemias. Por conseguinte, sugere um processo natural de adaptação e evolução humana (Dai et al., 2021).

Todavia, alguns micróbios são designados por patógenos, pois são prejudiciais à vida e à saúde humana. Assim, da mesma forma que os micróbios contribuem para evolução das espécies vivas, os surtos massivos de doenças altamente contagiosas e patógenos letais podem causar uma catástrofe para humanos e alguns animais (Dai et al., 2021).

O termo microbiota humano define-se como o conjunto de microrganismos que hospedamos. O ser humano é colonizado por fora (pele e olhos) e por dentro (mucosa vaginal, oral, respiratória e intestinal), por bactérias, fungos, protozoários, arqueia e até por vírus, que são importantes para a vida (Figura 2) (Antunes et al., 2020).

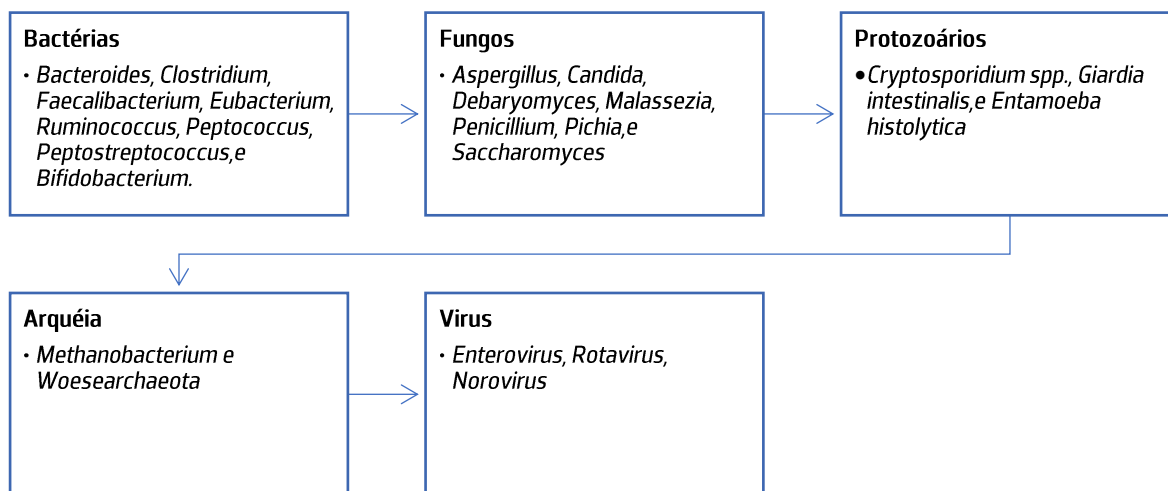


Figura 2. Exemplos de microrganismos, como bactérias, fungos, protozoários, arquéia e vírus.

### 1.7.1. Microbiota intestinal

A microbiota intestinal é um conjunto de micróbios, principalmente bactérias, que colonizam o intestino delgado e grosso, sendo o colón com maior quantidade e diversidade de bactérias das famílias *Bacteroidaceae*, *Prevotellaceae*, *Rikenellaceae*, *Lachnospiraceae* e *Ruminococcaceae* (Antunes et al., 2020; Dhar, 2022).

A aquisição da microbiota inicia-se no nascimento e atinge a maturidade nos primeiros 2–3 anos de vida. Este é um período essencial para o estabelecimento de uma microbiota abundante, diversificada e funcional. Bebés nascidos a termo e por parto vaginal, amamentação prolongada e interação com o ambiente familiar, são promotores de uma microbiota intestinal funcional. Contudo, parto prematuro, cesariana, amamentação insuficiente e administração de antibióticos, propiciam o desenvolvimento de uma microbiota ineficaz, e distúrbios imunológicos ou doenças inflamatórias durante a infância, tais como: obesidade, alergias, doença inflamatória intestinal ou infeções GI e respiratórias (Antunes et al., 2020; Sonnenburg & Sonnenburg, 2019). Assim, a combinação de práticas de saúde modernas e estilo de vida provocam uma diminuição da abundância e diversidade microbiana no intestino causando a vulnerabilidade da designada “microbiota industrializada” (Antunes et al., 2020; Moeller, 2017; Sonnenburg & Sonnenburg, 2019).

Normalmente, as bactérias intestinais em pessoas saudáveis são dominadas por 4 filos: a *Actinobacteria*, *Firmicutes*, *Proteobacteria*, e *Bacteroidetes* (Dhar, 2022).

A microbiota intestinal tem um papel essencial na saúde devido às suas ações protetoras, tróficas e metabólicas (Dhar, 2022).

### **1.7.1.1 Anatomia e Fisiologia**

O intestino é organizado por diferentes camadas anatômicas, que lhe permitem exercer determinadas atividades, nomeadamente a função de barreira a materiais estranhos, como os patógenos e outros estímulos nocivos (Sharma & Riva, 2020).

O muco é constituído por uma camada espessa de proteínas mucinas glicosiladas, que são produzidas pelas células caliciformes no epitélio intestinal. A espessura da camada de muco aumenta entre o intestino delgado e cólon, pois protege as células epiteliais de danos causados por bactérias e moléculas grandes, como partículas de alimentos, agindo como uma barreira física. A camada de muco contém imunoglobulinas A (IgA) e bactérias autóctones, para controlar o crescimento excessivo de bactérias patogénicas. Além disso, os produtos de fermentação de bactérias comensais exercitam funções de manutenção na barreira intestinal, como exemplo os ácidos gordos de cadeia curta (SCFAs) (Hiippala et al., 2018; Sharma & Riva, 2020; Vancamelbeke & Vermeire, 2017).

Os enterócitos ou células epiteliais intestinais estão presentes na camada epitelial da mucosa intestinal. Os enterócitos são, simultaneamente, um local de absorção e uma componente chave da barreira intestinal (Sharma & Riva, 2020).

Os complexos de proteínas transmembranares, como junções apertadas (TJs) e junções aderentes (AJs), permitem que a estrutura de monocamada do epitélio intestinal seja mantida e as junções intracelulares adicionais ou junções comunicantes fortalecem essa estrutura. As TJs são o tipo mais apical de junções intracelulares, sendo altamente dinâmicas e determinam o transporte paracelular intestinal (Sharma & Riva, 2020).

Ambas as TJs e AJs compreendem proteínas “adesivas” transmembranares, que medeiam o contacto intercelular. As proteínas citosólicas proximais ancoram o complexo juncional ao ambiente intracelular e ao citoesqueleto celular (Capaldo et al., 2014; Ebnet, 2008). A zonulina é modulador da TJs, e um aumento da sua concentração pode causar a libertação de proteínas “*zonula occludens*”. Estes elementos influenciam o funcionamento dos complexos de proteínas transmembranares, podendo ocorrer a rutura do complexo TJs e um possível aumento na permeabilidade paracelular. Outros reguladores das TJs incluem as citocinas pró-inflamatórias, como fatores de necrose tumoral (TNF) e interleucina (IL)-13 (Sharma & Riva, 2020).

As células de *Paneth* produzem defensinas e outros peptídeos antimicrobianos. As defensinas podem ser encontradas na camada de muco e auxiliam na defesa do intestino contra patógenos (Rescigno, 2011; Sharma & Riva, 2020).

As placas de Peyer são um componente principal do tecido linfático associado ao intestino contendo células *microfold* (células M). As células M podem iniciar a ativação de linfócitos T e B. Seguidamente, os plasmócitos podem libertar IgAs, que são transportados para o lúmen intestinal, e também podem ser encontrados na camada de muco (Sharma & Riva, 2020; Spencer & Sollid, 2016).

Existem ainda outros tipos de células imunes que podem ser localizadas ao longo da lâmina própria, como: células T invariáveis associadas à mucosa, que são diretamente antibacterianas e que podem participar na regulação imune; células T reguladoras, que participam na limitação da ativação imune e inflamatória; e células linfoides inatas que potenciam ativamente na formação da imunidade intestinal local, semelhante as atividades da célula T com as suas funções inatas (Sharma & Riva, 2020).

### **1.7.1.2 Disbiose Intestinal e Patologias**

O desequilíbrio persistente da comunidade microbiana do intestino é designado por disbiose intestinal, que propicia doenças intestinais ou extraintestinais. A disbiose possivelmente pode diminuir a diversidade da microbiota, alterar a sua composição e facilitar a invasão e replicação viral (Antunes et al., 2020; Sundararaman et al., 2020).

O microbioma da disbiose pode criar um ambiente inflamatório que o SARS-CoV-2 pode explorar. Micróbios patogénicos e vírus contribuem para uma disfunção da barreira intestinal e pulmonar, com a libertação de citocinas pró-inflamatórias, promovendo uma “tempestade de citocinas”, isto é uma reação imune descontrolada que pode causar mais danos do que o próprio vírus, incluindo lesões de múltiplos órgãos (Antunes et al., 2020).

A rutura da barreira intestinal, o aumento da permeabilidade intestinal e alterações da camada de muco têm sido associados a diversas patologias (Sharma & Riva, 2020). A disbiose microbiana pode ocorrer na COVID-19 e acredita-se que os probióticos possam corrigir este desequilíbrio. Também, podem ocorrer modificações nas TJs e potenciar a um aumento de citocinas, zonulina e diminuição de SCFAs (Sharma & Riva, 2020).

Foi também já demonstrado que o SARS-CoV-2 pode infetar organoides intestinais, pois o vírus utiliza a ACE2 para entrar nas células e existe um elevado nível de expressão de ACE2 em

enterócitos. A TMPRSS2 também está altamente expressa em enterócitos no íleo e no cólon podendo facilitar a entrada do vírus (Lamers et al., 2020; Lee et al., 2020; Sharma & Riva, 2020; H. Zhang et al., 2020).

### **1.7.2. Crosstalk: Eixo intestino-Pulmão**

Com os avanços na investigação, ocorreu uma maior compreensão na interação dinâmica entre os micróbios do eixo intestino-pulmão. A ligação do intestino e do nicho pulmonar é mediada por esse eixo, uma vez que existe a passagem de hormonas, metabolitos microbianos, citocinas e de endotoxinas na corrente sanguínea. A disbiose na microbiota intestinal pode influenciar a disfunção pulmonar modulando as respostas imunes, como dos neutrófilos, subconjuntos de células T, citocinas inflamatórias e dos recetores do tipo *Toll-like* (Gohil et al., 2020). O eixo intestino-pulmão é frequentemente referido como *crosstalk* entre órgãos, pois constituem órgãos em diferentes localizações anatómicas que se desenvolveram a partir da mesma camada germinativa durante o desenvolvimento inicial (Conte & Toraldo, 2020; H. Wang et al., 2021).

O eixo intestino-pulmão pode ser considerado bidirecional, ou seja, através do sangue e do sistema linfático, os metabolitos microbianos e endotoxinas podem afetar o pulmão quando surge inflamação e concomitantemente a microbiota intestinal. Assim sendo, existe a possibilidade, que a infeção por SARS-CoV-2 nos pulmões desencadeie uma resposta imune epitelial (Sundararaman et al., 2020). A infeção dos pulmões com SARS-CoV-2 causa uma rutura epitelial nas vias aéreas. As células epiteliais dos alvéolos com a ACE2 servem como local de ligação para o SARS-CoV-2 (Gohil et al., 2020). Durante a infeção, existe perda de equilíbrio entre IL-10 e IL-17 e dano agudo pulmonar, ou seja, a “tempestade de citocinas”. Assim, pode equacionar-se a utilidade dos probióticos para melhorar a condição inflamatória, por regulação do stress oxidativo (Xavier-Santos et al., 2022). Para além disso, os probióticos têm propriedades microbianas inibitórias significativas, através de macrófagos alveolares, neutrófilos, células *natural killer* e altos níveis de citocinas pró-inflamatória como TNF- $\alpha$  e IL-6 no pulmão (Dumas et al., 2018; Gohil et al., 2020). As bactérias probióticas têm ainda a capacidade de se ligar ao vírus invasor e inibir a interação patógeno-recetor da célula hospedeira. Deste modo, o uso de probióticos restringe as infeções virais respiratórias, fortalecendo a imunidade da mucosa (Gohil et al., 2020; Marsland et al., 2015).

### 1.7.3. Resposta imunológica da mucosa

A disbiose da imunidade do hospedeiro pode estimular o sistema imunológico do corpo, sendo a espinha dorsal a principal defesa imunológica. A comunicação entre a microbiota e os fatores ambientais afetam a imunidade da mucosa. A camada de muco presente na superfície GI, trato respiratório e trato vaginal desempenham a primeira linha de defesa, pois a IgA atua como a primeira linha de imunidade da mucosa (Corthésy, 2013; Neish, 2014; Sundararaman et al., 2020). As mucinas desempenham um papel importante na barreira da imunidade do muco. O patógeno movimenta-se para a barreira mucociliar. Seguidamente, este entra em contacto com diferentes peptídeos antimicrobianos (PAMs) solúveis presentes no muco, como a lisozima, a lactoferrina, e as defensinas, que são produzidas pelas células imunes do trato respiratório. Os PAMs participam na morte direta do patógeno ou na inibição do patógeno através da opsonização ou recrutamento de células inflamatórias (Sundararaman et al., 2020). A infeção patogénica das células epiteliais da mucosa introduz monócitos, macrófagos, granulócitos, células B, células *natural killer* e dendríticas. A iniciação destas células depende de diferentes recetores de reconhecimento de padrões, nomeadamente recetores Toll-like, proteína 2 contendo domínio de oligomerização de ligação a nucleotídeos, e recetores de lectina tipo C ativados por sinalização intracelular, que induzem respostas imunológicas de quimiocinas anti-inflamatórias ou reguladoras e/ou antivirais (Sundararaman et al., 2020).

A eliminação de patógenos com macrófagos e células dendríticas (DCs) também procede no sistema imunológico da mucosa respiratória inata. O macrófago alveolar elimina o patógeno emitindo óxido nítrico e espécies reativas de oxigénio. As DCs têm um papel essencial na eliminação viral dos pulmões, pois iniciam a resposta antiviral linfócitos T CD8<sup>+</sup>. Estas células são eficazes na fagocitose do patógeno invasor, através de dendritos transepiteliais, e ajudam a bloquear e transitar o patógeno por meio de células caliciformes epiteliais e células M. Os antígenos são transitados através das células M para as células apresentadoras de antígeno (APCs). As APCs enviam o sinal para as células T do tecido linfóide à mucosa para apresentação de antígeno à célula B. A célula B produz células B de imunoglobulina de superfície IgA positiva. Continuamente, as células T estimuladas por antígeno e imunoglobulina de superfície celular entram na circulação sistémica através dos linfonodos. Assim, durante o transporte intercelular por imunoglobulinas, um vírus pode ser neutralizado (Sundararaman et al., 2020).

Além disso, as citocinas provenientes de epitélios, como por exemplo fator de crescimento de transformação do crescimento beta, IL-25 e IL-33 são importantes na ativação de uma resposta

imune regulatória da mucosa da célula T *helper* 2 ou células T reguladoras (Sundararaman et al., 2020).

#### **1.7.4. Microbiota pulmonar e disbiose pulmonar**

O pulmão compreende aproximadamente 10 a 100 bactérias por 1000 células humanas, e está continuamente exposto à microbiota por inalação ou microaspiração subclínica desde o início da vida (Sundararaman et al., 2020; Vaira et al., 2020). A diversidade do microbioma pulmonar é determinada pela incorporação através da nutrição, temperatura e qualidade e quantidade das células anti-inflamatórias; eliminação através da tosse, depuração mucociliar, imunidade inata e adaptativa; e pela imigração através da micro-aspiração e inalação de microrganismos e crescimento relativo dentro das suas comunidades (O'Dwyer et al., 2016; Sundararaman et al., 2020). O microbioma pulmonar e das vias áreas afetam diretamente a imunidade contra a doença ou possivelmente ter um efeito imunidade/inflamação local modificada durante o desenvolvimento da doença. O trato respiratório superior e a orofarínge, cujos micróbios são encontrados com abundância, não são eliminados pela defesa da mucosa do hospedeiro e nem pela depuração mucociliar, sendo estes capazes de atingir profundamente o pulmão (O'Dwyer et al., 2016; Wilson & Hamilos, 2014).

A microbiota pulmonar pode regular a imunidade pulmonar ou o desenvolvimento de tecido linfóide associado aos brônquios contra a infecção pulmonar. A deposição de microrganismos prejudiciais, tais como, fungos, bactérias e vírus ocorre nas vias áreas ou nas superfícies alveolares (O'Dwyer et al., 2016; Sundararaman et al., 2020). Os cílios e a camada de muco impedem a entrada de patógenos no pulmão. Contudo quando estes conseguem alcançar o pulmão, ocorre ativação do macrófago alveolar, ou seja, ativação de mecanismos de defesa. Os macrófagos alveolares com o receptor de superfície celular ligam-se às partículas depositadas, "*ingest, kill, and digest*". Além do mais, quando os pulmões detetam partículas infecciosas graves, como os glóbulos brancos, os neutrófilos aumentam a circulação para ajudar a ingerir e matar os patógenos (Janssen et al., 2016; Sundararaman et al., 2020). A microbiota pulmonar pode proteger contra infecções respiratórias como *S. pneumoniae* e *K. pneumoniae*, com a produção pulmonar de fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos, através da estimulação de IL-17 e domínio de oligomerização de ligação a nucleótidos 2 (Mukherjee & Hanidziar, sem data). A citocina pró-inflamatória IL-17 é induzida por célula T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> de células estromais, endoteliais e epiteliais em resposta a lipopolissacáridos (Ryzhakov et al., 2011). A IL-17 liga-se a

recetores celulares e ativa a atividade de neutrófilos, ativador de proteína-1 e nuclear factor – Kappa B(NF $\kappa$ B). A IL-17 também induz o stress do reticulo endoplasmático e autofagia através da enzima 1 que adquire inositol, inibindo a reprodução de vírus infecciosos. Os recetores do tipo Nod, recetores de domínio de oligomerização de nucleotídeos e repetições ricas em leucina (NLRs), atuam como recetores citoplasmáticos que controlam mecanismo de defesa através da estimulação da sinalização de NF $\kappa$ B. Os NLRs protegem contra as infeções por patógenos respiratórios, através da indução de neutrófilos na medula óssea; regulam a vida dos neutrófilos circulatórios e dos monócitos inflamatórios; auxiliam a hematopoiese; promovem o desenvolvimento do folículo linfóide e estimulam a atividade adjuvante (Brown et al., 2017; Sundararaman et al., 2020).

A infeção pulmonar por CoVs provoca ruturas do epitélio em áreas de troca gasosa e vias aéreas associadas (Fanos et al., 2020). As células epiteliais dos alvéolos servem de recetor da SARS com ACE2. Os CoVs estão constantemente a variar o recetor de ligação e o local de ligação durante a sua progressão (Feng et al., 2020). A infeção viral incita o macrófago alveolar a formar células multinucleadas, monócitos e (DCs) para combater o SARS-CoV. As elevadas concentrações de citocinas pró-inflamatórias, foram evidenciadas na presença de SARS-CoV (Qian et al., 2013). Como referido anteriormente, nos potenciais alvos para combater a SARS-CoV-2, a terapêutica com probióticos pode diminuir a evolução da morbidade por SARS-CoV-2.

### **1.7.5. Probióticos**

De acordo, com a OMS e com a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, os probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (Sharma & Riva, 2020). Nas últimas duas décadas, tem existido um aumento exponencial na pesquisa sobre as comunidades microbianas benéficas, com desenvolvimentos robustos na aplicação de imunobióticos para combater infeções humanas (Bhushan et al., 2019; Dai et al., 2021; Mandel et al., 2019). A aplicação de probióticos tem sido investigada sobretudo para a prevenção e tratamento de infeções gastrointestinais, efeitos nutricionais, prevenção e tratamento de infeções orais, diarreia, síndrome do intestino irritável, doenças inflamatórias, doenças alérgicas e infeções com *Helicobacter pylori* (Bottari et al., 2021). Entretanto, devido à capacidade potencial de várias estirpes probióticas para melhorar a imunidade da mucosa contra patógenos, foram sugeridos possíveis efeitos na prevenção e tratamento de infeções GI, através do eixo intestino-pulmão, e

consequentemente na prevenção e gravidade do COVID-19 (Baud et al., 2020; Bottari et al., 2021).

A eficácia e segurança dos probióticos dependem da estirpe, dose, doença e possivelmente do hospedeiro (Bottari et al., 2021). Os probióticos mais estudados e usados pertencem aos géneros *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* e *Saccharomyces* (Khaled, 2021).

#### **1.7.5.1 Critérios de seleção de probióticos**

Na seleção de microrganismos probióticos são contemplados critérios de segurança, funcionalidade e tecnológicos. Relativamente aos critérios de segurança, estes abrangem as seguintes especificações (Figura 3) (Saarela et al., 2000):

- ❖ As estirpes para uso humano são, de preferência, de origem humana. Uma estirpe probiótica pode funcionar melhor num ambiente semelhante, como trato gastrointestinal, ao ambiente de onde foi originalmente isolado;
- ❖ São isolados a partir do sistema GI humanos saudáveis;
- ❖ Têm um historial de não serem patogénicos;
- ❖ Não têm historial de associação a doenças tais como endocardite infecciosa ou distúrbios gastrointestinais;
- ❖ Não desconjugam sais biliares;
- ❖ Não são portadores de genes transmissíveis de resistência a antibióticos.

Os requisitos funcionais dos probióticos devem ser estabelecidos utilizando métodos *in vitro*, e os resultados destes estudos devem refletir-se em estudos controlados no ser humano. Deste modo, os aspetos de funcionalidade que devem ser considerados são os seguintes (Saarela et al., 2000):

- ❖ Tolerância ácida e tolerância ao sumo gástrico humano;
- ❖ Tolerância à bÍlis para a sobrevivência no intestino delgado;
- ❖ Aderência às superfÍcies epiteliais e persistência no trato gastrointestinal humano;
- ❖ Imunoestimulação, mas sem efeito pró-inflamatório;
- ❖ Atividade antagonista contra agentes patogénicos como como *Helicobacter pylori*, *Salmonella sp.*, *Listeria monocytogenes* e *Clostridium difficile*;
- ❖ Propriedades antimutagénicas e antigarcinogénicas.

Ainda que a estirpe probiótica cumpra os critérios de segurança e funcionalidade, os aspetos tecnológicos, nomeadamente relacionados com a produção e processamento de probióticos, são

igualmente considerados. Assim, os critérios tecnológicos que devem ser considerados na seleção de probióticos, incluem os seguintes (Saarela et al., 2000):

- ❖ Boas propriedades sensoriais;
- ❖ Resistência aos fagos;
- ❖ Viabilidade durante a transformação;
- ❖ Estabilidade no produto e durante o armazenamento.

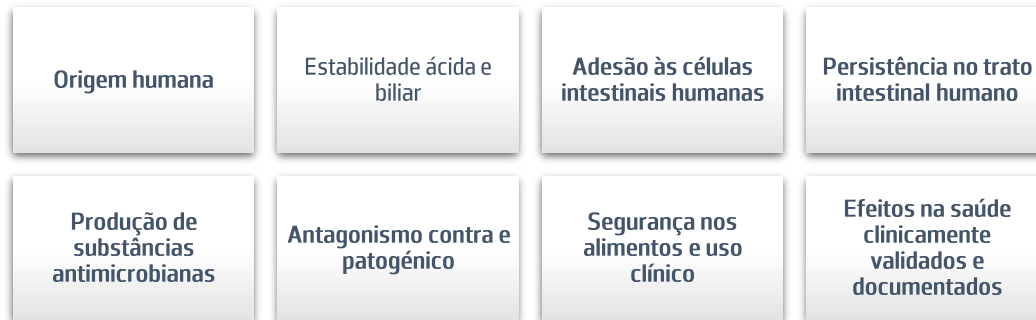


Figura 3. Critérios de seleção de microrganismos dos probióticos.

### 1.7.5.2 Probióticos e imunidade

A modulação do sistema imunológico é um fator decisivo na prevenção de doenças infecciosas, mediante vários sistemas potenciais, como através da imunidade local mantendo o bem-estar intestinal e a integridade da parede intestinal (Gohil et al., 2020; Kanauchi et al., 2018; Sundararaman et al., 2020). Vários estudos revelaram que a ingestão de micróbios produtores de ácido láctico melhora doenças com distúrbios digestivos e do trato respiratório (Gordon, 2008; Sundararaman et al., 2020). Entretanto, o uso de microrganismos probióticos e os seus produtos metabólicos representam uma abordagem promissora para o tratamento de doenças virais (Ryan et al., 2015).

Os micróbios probióticos têm a capacidade de estimular e modular o sistema imunológico, e reduzir o processo inflamatório (Hardy et al., 2013). Os probióticos, também têm a aptidão de diminuir a gravidade das infecções GI e no trato respiratório superior, agindo tanto no sistema imunológico inato quanto no adaptativo. A colonização do epitélio intestinal por bactérias probióticas demonstrou reduzir a incidência e os sintomas de infecções respiratórias virais, devido ao aumento de células T auxiliares foliculares e DCs células dendríticas que expressam IL-23, e ao aumento de células B, que expressam IgA no cólon e linfonodos. Para além disso, os probióticos compreendem constituintes imunoestimuladores, como peptidoglicano, ácido

lipoteicóico, ligantes do recetor *Toll-like* e dipeptídeo muramil, elevando a sua atividade imunomoduladora (Gohil et al., 2020; Kanauchi et al., 2018).

Os probióticos têm ainda a capacidade de induzir a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias derivadas de APCs (IL-10, IL-12, IL-17, TNF- $\alpha$ , interferon- $\alpha$ ) contra partículas estranhas, através da ativação da imunidade adaptativa. Citocinas pró-inflamatórias reguladoras da inflamação intestinal, quimiocinas e os seus recetores são inibidos pelas citocinas anti-inflamatórias IL-10, produzidas por diferentes células imunoativadas (Azad et al., 2018; Sundararaman et al., 2020).

Por fim, os probióticos proporcionam dois efeitos imunomoduladores:

- Efeito imunoestimulador, que ativa a produção IL-12, induz células *Natural Killer*, *T helper 1* e *T helper 2* e também, atua contra infeção e alergia;
- Efeito imunorregulador, que incita a ativação de IL-10 e células Treg por Th2, DCs, células B e monócitos para imunidade adaptativa do hospedeiro (Chiba et al., 2010; Sundararaman et al., 2020).

### 1.7.5.3 Mecanismo de ação dos probióticos

Como referido anteriormente, as bactérias probióticas têm diversas e múltiplas ações no hospedeiro. Diferentes organismos podem influenciar o ambiente luminal intestinal, a função de barreira epitelial e da mucosa, e o sistema imunitário da mucosa. Estas bactérias exercem os seus efeitos em diferentes células envolvidas nas respostas imunitárias inatas e adaptativas, como as células epiteliais, DCs, os monócitos/macrófagos, as células B, as células T, e por fim as células *Natural killer* (Ng et al., 2009). Assim, os principais mecanismos de ação dos probióticos incluem atividades antimicrobianas, melhoria da função da barreira intestinal, imunomodulação no corpo do hospedeiro, e produção de neurotransmissores, que estão exemplificados na figura 4 e (Latif et al., 2023; Ng et al., 2009).

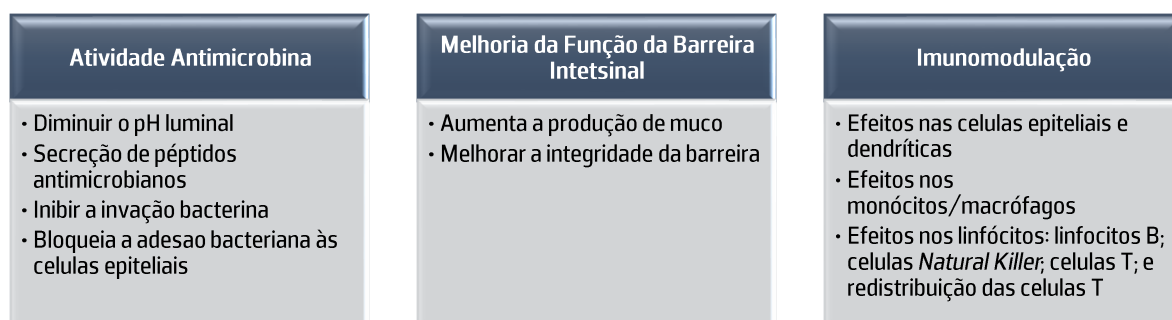


Figura 4. Mecanismos de ação dos probióticos.

Apesar de todos os avanços em termos de investigação com probióticos, ainda não foi documentado, de forma robusta, o seu mecanismo de ação (Latif et al., 2023; Plaza-Diaz et al., 2019). Os probióticos competem com os agentes patogénicos por nutrientes e locais de ligação aos recetores, dificultando a sua sobrevivência no intestino (Plaza-Diaz et al., 2019). Também, atuam contra agentes antimicrobianos, produzindo SCFAs, ácidos orgânicos, peróxido de hidrogénio e bacteriocinas, diminuindo as bactérias patogénicas no intestino (Ahire et al., 2021; Fantinato et al., 2019). Além disso, os probióticos melhoram a função da barreira intestinal, estimulando a produção de proteínas de mucina, regulando a expressão de proteínas de junção apertada, como oclusão e claudina 1, que consequentemente regulam a resposta imune no intestino (Latif et al., 2023). Ademais, os probióticos regulam vários mecanismos, tais como regular a resposta imunitária inata e adaptativa, modulando as DCs, os macrófagos e os linfócitos T; aumentam a produção de citocinas anti-inflamatórias enquanto interagem com as células epiteliais intestinais e atraem macrófagos e células monoculares (Latif et al., 2023; Petruzzello et al., 2023).

Os probióticos podem também produzir neurotransmissores no intestino através do eixo intestino-cérebro. Estirpes específicas de probióticos podem modular os níveis de serotonina, ácido gama-aminobutírico e dopamina, que influencia o humor, o comportamento e a motilidade intestinal (Latif et al., 2023; Srivastav et al., 2019).

### **1.8. Papel dos probióticos nas infeções virais e respiratórias**

Nas infeções virais em humanos, o epitélio do trato respiratório é, essencialmente, a porta de entrada. O primeiro nível de proteção no hospedeiro é assegurado por um muco resistente através dos cílios no epitélio colunar e limites secretórios de IgA na secreção do trato respiratório. A influência da infeção viral nas DCs propicia uma cascata de reações, nomeadamente a ativação de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e, em seguida, o desenvolvimento de imunidade específica mediada por células T e B (Sundararaman et al., 2020). Além de serem bactérias benéficas, os probióticos também possuem atividade antiviral, tal como anteriormente descrito.

A infeção por COVID-19 prejudica os tecidos pulmonares e o intestino, por conseguinte ativa a resposta inflamatória com o aumento de citocinas pró-inflamatórias de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , e assim sendo, ativa a “tempestade de citocinas”. Possivelmente, esta resposta ocorre devido à ativação de células *T helper 1*, isto é, resposta celular no tecido pulmonar (Gohil et al., 2020; Lehtoranta et al., 2014). Na disbiose, existe na microbiota intestinal um desequilíbrio de células *T helper 1* e T

*helper 2*, que resulta ainda na ativação de citocinas pró-inflamatórias e, possivelmente, na “tempestade de citocinas” também nos pulmões (Gohil et al., 2020). Posteriormente, com a administração de probióticos, ocorre a colonização das “bactérias boas” no intestino que proporcionam mudanças no equilíbrio entre células T *helper 1* e T *helper 2*, que reduzem a “tempestade de citocinas” e a gravidade de doenças (Gohil et al., 2020). Além disso, a administração e o consumo de probióticos melhoram o sistema imunológico, aumentando o nível de IFN-I, células APC, células *Natural Killer* e células B e T dos pulmões (Dhar, 2022). Por fim, os probióticos podem melhorar as citocinas pró e anti-inflamatórias, auxiliando a eliminar a infecção viral e minimizando o dano celular nos pulmões (Baud et al., 2020; Gohil et al., 2020).

Com esta revisão sistemática (RS) pretende-se rever as evidências do impacto do uso de probióticos na evolução da morbidade de SARS-CoV-2.

## **2. Metodologia**

O presente estudo consiste numa RS e foi realizado em concordância com a diretriz metodológica PRISMA (Itens de Relatório para Revisões Sistemáticas e Meta-Análises). Optou-se por este método com vista a minimizar o enviesamento, proporcionando assim resultados mais fiáveis a partir dos quais se podem tirar conclusões e tomar decisões (Donato & Donato, 2019; Lasserson et al., 2023).

A elaboração da RS exigiu o planeamento de várias etapas, nomeadamente, (Donato & Donato, 2019):

1. Formular a questão de investigação;
2. Produzir um protocolo de investigação;
3. Definir critérios de inclusão e exclusão;
4. Desenvolver uma estratégia de pesquisa e pesquisar a literatura – encontrar os estudos;
5. Selecionar os estudos;
6. Avaliar a qualidade dos estudos,
7. Extrair os dados;
8. Sintetizar os dados e avaliar a qualidade de evidência;
9. Disseminar os resultados obtidos.

A declaração PRISMA 2020, concede orientações atualizadas para RS, que refletem os avanços nos métodos para identificar, selecionar, avaliar e sintetizar estudos (Page, McKenzie, et al., 2021; Page, Moher, et al., 2021). Neste seguimento, foi considerada e preenchida a declaração PRISMA que contempla uma lista de verificação de 27 itens (Anexo 1), bem como a lista de verificação especificamente destinada a resumos, que contempla 12 itens (Anexo 2). Estas ferramentas consistem em listas de verificação alargada que detalham as recomendações de cada relatório para cada item (Moher et al., 2015; Page, McKenzie, et al., 2021).

### **2.1. Estratégia de pesquisa e critérios de seleção**

Para realizar a RS foi necessário formular a questão de investigação pelo modelo definido pelo acrónimo PICO: *Population; Intervention; Comparison; Outcome* (Donato & Donato, 2019). Na figura 5, encontra-se descrita a elaboração da questão de investigação, tendo por base a estratégia PICO.

<b>Questão de investigação</b> Será que a administração de probióticos tem influência na evolução da SARS-CoV-2?	<b>P(Population)</b> Diagnóstico confirmado com SARS-CoV-2
	<b>I (Intervention)</b> Administração de Probióticos
	<b>C (Comparison)</b> Dois grupos em que um recebe probiotico e outro placebo
	<b>O (Outcome)</b> Impacto na morbidade na SARS-CoV-2 com o uso de probióticos

Figura 5. Questão de investigação pelo modelo definido pelo acrónimo PICO.

## 2.2. Métodos de Pesquisa

Em função da data de surgimento da SARS-CoV-2, a RS foi limitada ao período de estudo compreendido entre 2019 e 2023, que corresponde a um período de 5 anos. As pesquisas bibliográficas foram executadas nas seguintes bases de dados:

- ❖ Cochrane Library;
- ❖ Clinical Trials;
- ❖ EBSCO;
- ❖ Medline;
- ❖ Web of Science;
- ❖ Science Direct.

Para elaborar a equação de pesquisa foram utilizados operadores booleanos “AND” ou “OR”, e parte dos resultados da estratégia PICO anteriormente descrita. Assim, a equação de pesquisa determinada foi designadamente: (Probiotics AND COVID-19) OR (Probiotics AND SARS-CoV-2). Apesar de terem sido testadas outras alternativas, incluindo desde logo na equação de pesquisa termos relacionados com o comparador e o *outcome*, verificou-se a não deteção de artigos potencialmente relevantes para o estudo. Face ao exposto, na equação de pesquisa, contemplou-se apenas os elementos relativos a população e intervenção, salvaguardando-se o cumprimento dos critérios relativos à existência de comparador e descrição do *outcome* previamente definido, durante a seleção dos artigos.

Os artigos incluídos foram ordenados e agrupados no software de gestão de referência bibliográfica Zotero, para identificar e excluir duplicados.

### 2.3. Critérios de inclusão e exclusão

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados no presente estudo podem ser visualizados na figura 6.

Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão
<ul style="list-style-type: none"><li>• Estudos em humanos, que inclui todas as faixas etárias com diagnóstico confirmado de SARS-CoV-2.</li><li>• Administração de probióticos no tratamento da SARS-CoV-2 no grupo experimental.</li><li>• Estudos de ensaios clínicos randomizados e não randomizados.</li><li>• Existência de grupo controlo.</li><li>• Idioma em Inglês e Português.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Estudos em animais.</li><li>• Terapêuticas combinadas de probióticos com outros compostos no tratamento de SARS-CoV-2.</li><li>• Tratamentos concomitantes com vacinas, antivíricos ou outros tipos de tratamento.</li></ul>

Figura 6. Seleção criteriosa e objetiva de critérios de inclusão e exclusão.

### 2.4. Extração e análise de Dados

Com o intuito de se dar resposta ao objetivo do presente estudo foram extraídos os seguintes dados de todos os artigos incluídos: resultados clínicos, resultados laboratoriais, reações adversas medicamentosas. No sentido de identificar dados que pudessem ter escapado na leitura do artigo integral, reforçou-se a pesquisa localizando nos documentos, termos específicos, tais como: *outcome*, *result*, *data*, *analysis*. Os dados que foram adicionalmente extraídos de todos os artigos compreendem esquemas posológicos, caracterização dos produtos administrados e saídas/abandonos e respetivas justificações. Os dados foram agrupados em função das características metodológicas, das intervenções nos grupos experimentais e controlos, das análises das perdas *follow up* e dos resultados de evolução da morbilidade.

As RS devem incluir um processo de avaliação das evidências de investigação, com o objetivo de determinar a qualidade metodológica de um estudo e avaliar o possível viés no seu design, condução e análise. Na presente RS, foi utilizada a ferramenta de avaliação crítica do Instituto Joanna Briggs (JBI) (Tufanaru et al., 2020), mais especificamente a lista de verificação de avaliação crítica JBI para ensaios controlados randomizados, para avaliar os possíveis riscos de enviesamento nos resultados alcançados.

### 3. Resultados e Discussão

No fluxograma Prisma 2020 (figura 7), é possível verificar o número de registos identificados em diferentes bases de dados. As ferramentas automáticas das bases de dados permitiram a exclusão em função de ano de publicação, tipo de publicação, e idioma. Foram incluídos cinco estudos na presente RS.

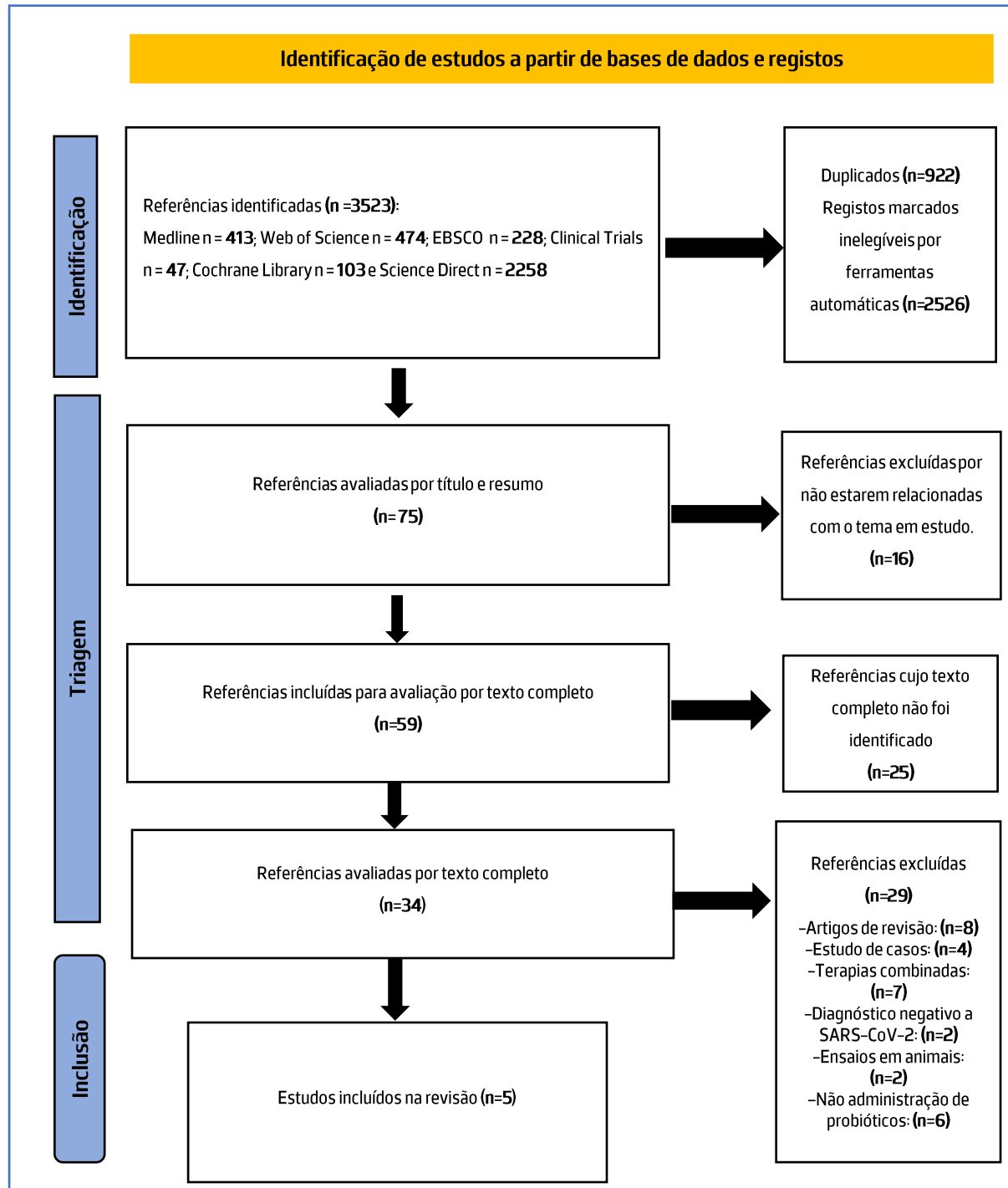


Figura 7. Fluxograma PRISMA 2020.

O estudo publicado ClinicalTrials.gov de Kolesnyk *et al.*,(2024) foi incluído, pois decorreu entre dezembro de 2021 e março de 2023. Assim, apesar do estudo ter sido divulgado no formato de artigo, na revista científica *Biomed Central Nutrition*, apenas em 2024, considerou-se que cumpriu o período temporal definido para inclusão nesta RS.

Na tabela 1, apresenta-se a avaliação crítica JBI para os artigos incluídos nesta RS. De forma geral, os estudos incluídos são claros e apresentam qualidade metodológica diminuindo a probabilidade de viés no seu desenho, condução e análise. Em termos de clareza, destacam-se os estudos de Gutiérrez-Castrellón *et al.*, (2022) e de Di Pierro *et al.*, (2022). Em sentido oposto, o estudo de Endam *et al.*, (2021) foi o que resultou em mais apreciações dúbias quanto à apreciação dos diversos parâmetros metodológicos, tal como é possível analisar na tabela 1 apresentada. Apesar do desenho claro, o estudo de Di Pierro *et al.*, (2022) foi um dos dois que obteve mais classificações negativas quanto a parâmetros metodológicos considerados relevantes. Assim, tal como no estudo de Navarro-López *et al.*, (2022), não foram ocultadas as atribuições a grupos de tratamento aos participantes, aos responsáveis pela administração de tratamento, nem aos responsáveis pela avaliação. A não ocultação de participantes e investigadores resulta em maior probabilidade de enviesamento de resultados (Day & Altman, 2000; Hróbjartsson *et al.*, 2014; Schulz *et al.*, 1995). Estudos prévios já estabeleceram uma associação entre não ocultação e efeitos dos tratamentos mais pronunciados do que estudos idênticos com ocultação (Day & Altman, 2000). Será importante referir-se que, apesar das possíveis conclusões retiradas da avaliação crítica JBI, uma ordenação dos estudos em termos de qualidade ou adequação em função da sua classificação, pode ser falível. Tal ordenação implica atribuir o mesmo peso a todos os parâmetros avaliados. Contudo, em termos metodológicos, existem aspetos cujo não cumprimento ou não clarificação podem ter um maior impacto, do que outros.

Tabela 1. Lista de verificação de Avaliação Crítica JBI para ensaios clínicos controlados randomizados.

		Kolesnyk et al.,(2024)	Endam et al.,(2021)	Gutiérrez-Castrellón et al.,(2022)	Navarro-López et al., (2022)	Di Pierro et al., (2022)
1	Foi usada uma randomização verdadeira para a atribuição dos participantes aos grupos de tratamento?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
2	A atribuição aos grupos de tratamento foi ocultada?	Sim	Não	Sim	Não	Não
3	Os grupos de tratamento eram semelhantes no início do estudo?	Sim	Não	Não	Sim	Sim
4	Os participantes estavam cegos quanto à atribuição do tratamento?	Sim	Não	Sim	Não	Não
5	Aqueles que administraram o tratamento estavam cegos quanto à atribuição do tratamento?	Não	Não	Sim	Não	Não
6	Os avaliadores de resultados estavam cegos quanto à atribuição do tratamento?	Não	Não	Sim	Não	Não
7	Os grupos de tratamento foram tratados de forma idêntica, exceto pela intervenção de interesse?	Não	Não	Sim	Não	Sim
8	O acompanhamento foi completo e, se não, as diferenças entre os grupos em termos de acompanhamento foram adequadamente descritas e analisadas?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
9	Os participantes foram analisados nos grupos para os quais foram randomizados?	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
10	Os resultados foram medidos da mesma forma para os grupos de tratamento?	Não	Sim	Sim	Sim	Sim
11	Os resultados foram medidos de forma fiável?	Sim	Não	Sim	Não	Sim
12	Foi utilizada análise estatística adequada?	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
13	O desenho do ensaio foi apropriado e eventuais desvios do desenho padrão do ECR (randomização individual, grupos paralelos) foram considerados na condução e análise do ensaio?	Sim	Sim	Não	Não	Não

Legenda:

Sim	Não	Não está claro
-----	-----	----------------

A tabela 2 descreve as características metodológicas analisadas dos resultados obtidos nesta RS.

Tabela 2. Caracterização Metodológica dos estudos considerados na RS.

Autor/Ano	Número de Registo do Ensaio Clínico	Duração do Estudo	País	Ocultação do Ensaio Clínico	Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão	Dimensão da Amostra Rr (G.E./G.C.)
Kolesnyk <i>et al.</i> (2024)	NCT04907877	15 meses 01-12-2021 a 01-03-2023	Ucrânia	Participante <sup>A</sup> ; Prestador de cuidado; Investigador; Avaliador de Resultados.	-Idade ≥ 18 – ≤ 65 anos; -Homem ou mulher não grávida; -COVID-19 sintomático confirmado com duração 0-5 dias, por teste antigénio ou PCR.	Risco significativo de evolução complicada de COVID-19 devido a: hipertensão; diabetes <i>mellitus</i> ; doença cerebrovascular, condições imunossupressoras; doenças respiratórias crónicas, cardiovasculares, gastrointestinais ou do trato urinário; tumores malignos ou doenças sistémicas inflamatórias do tecido conjuntivo.	73 (37/36)
Endam <i>et al.</i> (2021)	NCT04458519	10 meses 16-07-2020 a 27-05-2021	Canadá	Prestador de cuidados <sup>B</sup> ; Avaliador de resultados.	-Homens e mulheres saudáveis, com ≥ 18 – ≤ 59 anos, sem comorbilidades; - Diagnóstico positivo de infeção SARS-CoV-2, por PCR realizado há menos de 96 horas; - Temperatura inferior a 38.0°C; - Não necessitar de oxigénio suplementar, nem existir hospitalização; - Capacidade de realizar a irrigação nasal.	- Pacientes com condições pré-existentes ou características demográficas que os coloquem em risco aumentado de complicações decorrentes da infeção por SARS-CoV-2; - Hipertensão; doenças cardiovasculares; diabetes; fibrose cística; asma; DPOC; bronquectasia; - Pacientes com imunossupressão por deficiências imunológicas primárias, quimioterapia ou medicamentos imunossupressores; - Mulheres grávidas ou lactentes, ou mulheres que não desejam praticar contraceção.	23 (12/11)

Autor/Ano	Número de Registo do Ensaio Clínico	Duração do Estudo	País	Ocultação do Ensaio Clínico	Crítérios de Inclusão	Crítérios de Exclusão	Dimensão da Amostra R <sub>T</sub> (G.E./G.C.)
Gutiérrez-Castrellón <i>et al.</i> , (2022)	NCT04517422	6 meses 19-08-2020 a 02-02-2021	México	Participante <sup>C</sup> ; Prestador de cuidados; Investigador; Avaliador de resultados.	-Mulheres e homens com $\geq 18$ - $\leq 60$ anos; -RT-qPCR positivo para o gene RdRp SARS-CoV2, dentro de 72 horas após a entrada no estudo; -Pelo menos um dos seguintes sintomas, com início dos sintomas até $\leq 7$ dias após a entrada no estudo: febre ( $>37,5^{\circ}\text{C}$ ), tosse, dor de cabeça, dores no corpo e falta de ar; - Saturação periférica de oxigénio (SpO <sub>2</sub> ) $\geq 90\%$ .	- Diabetes não controlado (HbA1c $> 8\%$ ); -Hipertensão sistólica não controlada ( $>160\text{mmHg}$ ); - IMC $\geq 40\text{ Kg/m}^2$ ; -Coagulopatia conhecida; -Pancreatite aguda; -Diarreia crónica, obstipação crónica ou doença inflamatória intestinal; - Imunodepressão devido a tratamento de cancro, transplante, infeção por VIH ou tratamento de doença autoimune; -Doença respiratória grave (asma, DPOC, fibrose cística); -Alergias sazonais graves em curso. -Deficiência conhecida de glucose 6-fosfato desidrogenase; -Uso de probióticos ou antibióticos 2 dias antes de entrar no estudo; -Gravidez ou lactação.	300 (150/150)
Navarro-López <i>et al.</i> , (2022)	NCT04390477	11 meses 04-05-2020 a 30-04-2021	Espanha	Não aplicável (Estudo sem ocultação) <sup>D</sup> .	- Doentes com $\geq 18$ anos e diagnóstico de SARS-CoV-2, de acordo com uma zangaratoa orofaríngea e nasofaríngea positivo para COVID-19; - Doentes internados no Departamento de Medicina Interna ou na Unidade de Hospitalização Domiciliária do Hospital Universitário del Vinalopó em Elche, Alicante (Espanha).	- Incapacidade ou recusa em assinar o consentimento informado; -Alergia ou intolerância ao produto de intervenção ou aos seus componentes.	41 (26/15)

Autor/Ano	Número de Registo do Ensaio Clínico	Duração do Estudo	País	Ocultação do Ensaio Clínico	Crítérios de Inclusão	Crítérios de Exclusão	Dimensão da Amostra R <sub>T</sub> (G.E./G.C.)
Di Piero <i>et al.</i> , (2022)	NCT05043376	2 meses 10-09-2021 a 21-11-2021	Paquistão	Não aplicável, (Estudo sem ocultação) <sup>E</sup> .	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Homens e mulheres com <math>\geq 18</math> anos;</li> <li>- Diagnóstico confirmado por SARS-CoV-2 comprovado por zangaratoa nasofaríngea positiva, por RT-PCR;</li> <li>- Sintomas agudos típicos de COVID-19, incluindo: febre, tosse, dispneia, infiltrados pulmonares em radiografias/TC, marcadores inflamatórios elevados, incluindo proteína C reativa, dímero-D, lactato desidrogenase e ferritina.</li> <li>- Doentes internados no hospital nas últimas 48 horas para tratamento de COVID-19.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doentes já internados na ICU ou com necessidade de suporte ventilatório mecânico invasivo de oxigénio no momento da admissão hospitalar;</li> <li>- Doentes com antecedentes de hipersensibilidade ou reação alérgica a probióticos e qualquer outra condição ou fator que, na opinião do consultor responsável pelo tratamento, contraindique a utilização de uma estirpe probiótica ou coloque o sujeito em risco devido à sua participação no estudo.</li> </ul>	64 (31/31)

**Legenda:** **A:** Estudo multicentro, randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, prospetivo e de grupos paralelos; **B:** Ensaio clínico prospetivo randomizado, sem contacto e aberto; **C:** Estudo randomizado, paralelo, quádruplo-cego e controlado por placebo; **COVID-19:** Doença por coronavírus 2019; **DPOC:** Doença pulmonar obstrutiva crónica; **D:** Caso-controlo prospetivo randomizado, aberto e não cego ensaio clínico controlado com um grupo controlo que não realizou o intervenção; **E:** Ensaio clinico piloto randomizado, aberto, dois braços de centro único; **G.E. =** Grupo Experimental; **G.C. =** Grupo Controlo; **HbA1c:** Hemoglobina glicada; **ICU:** Unidade de cuidados Intensivos; **IMC:** Índice de Massa Corporal; **PCR:** Reação em cadeia da polimerase; **RT-qPCR:** reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa; **RT-PCR:** Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa; **RdRp:** gene da RNA polimerase dependente de RNA; **R<sub>T</sub>:** Total Randomizados; **SARS-CoV-2:** Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2. **VIH:** Vírus da imunodeficiência humana.

Na tabela 3 pormenorizam-se as estirpes probióticas estudadas no grupo experimental, bem como a intervenção no grupo controlo, o regime posológico e outros medicamentos administrados nos diferentes estudos.

Tabela 3. Caracterização do tipo de intervenção nos grupos experimental e controlo, regime posológico e outros medicamentos administrados.

Autor/Ano	Intervenção no Grupo Experimental	Intervenção no Grupo Controlo	Regime posológico	Medicamentos administrados
<b>Kolesnyk et al.,(2024)</b>	<p>Estirpes de NORDBIOTIC™: <i>Bifidobacterium (B.) lactis</i> B1040 (DSM 33812) <math>1,25 \times 10^9</math> CFU, <i>B. longum</i> BLO20 (DSM 33815) <math>0,25 \times 10^9</math> CFU, <i>Lactobacillus (L.) rhamnosus</i> LR110 (DSM 33794) <math>2,00 \times 10^9</math> CFU, <i>L. casei</i> LC130 (DSM 33796) <math>1,25 \times 10^9</math> CFU, <i>L. acidophilus</i> LA120 (DSM 33795) <math>0,25 \times 10^9</math> CFU, e uma dose total de 5 bilhões de CFU.</p> <p>Excipientes: maltodextrina, fosfato dicálcico, hidroxipropilmetilcelulose, dióxido de titânio, celulose microcristalina, sais de magnésio de ácidos gordos e dióxido de silício.</p>	O placebo tem os mesmos constituintes com a exceção das bactérias.	Uma cápsula oral de probiótico ou placebo 1 vez ao dia, antes do pequeno-almoço durante 28 dias.	<p>AINE<sup>1</sup>;</p> <p>Antitússicos<sup>1</sup>;</p> <p>Descongestionantes nasais<sup>1</sup>;</p> <p>Antissépticos para garganta, <math>p=0.044</math><sup>2</sup>;</p> <p>Antiespasmódicos, <math>p=0.018</math><sup>3</sup>;</p> <p>Antidiarreicos<sup>1</sup>;</p> <p>Antiagregantes plaquetários<sup>1</sup>.</p>
<b>Endam et al.,(2021)</b>	<p>Solução isotónica tamponada com 2,4 bilhões de CFU de <i>Lactococcus lactis</i> W136.</p> <p>Os saquetas individuais pré -medidas com o tratamento foram reconstituídas em 240 ml de água, com um frasco de irrigação NeilMed SinusRinse™</p>	Solução salina isotónica tamponada.	Irrigações nasais 2 vezes ao dia, com probiótico ou solução salina, durante 14 dias.	<p>Anti-histamínicos orais<sup>1</sup>;</p> <p>Corticosteroides intranasais<sup>1</sup>;</p> <p>Paracetamol<sup>1</sup>;</p> <p>AINE<sup>1</sup>;</p> <p>Descongestionantes orais<sup>1</sup>;</p> <p>Uso de humidificador e aromaterapia<sup>1</sup>.</p>

Autor/Ano	Intervenção no Grupo Experimental	Intervenção no Grupo Controlo	Regime posológico	Medicamentos administrados
Gutiérrez-Castrellón et al.(2022)	Estirpes de AB21®: <i>Lactiplantibacillus (L.) plantarum</i> KABP033 (CECT30292), <i>L. plantarum</i> KABP022 (CECT7484), <i>L. plantarum</i> KABP023 (CECT7485), <i>Pediococcus acidilactici</i> KABP021 (CECT7483), e uma dose total $\geq 2 \times 10^9$ CFU.  Excipiente: maltodextrina.	Cápsula oral com maltodextrina.	Uma cápsula oral de probiótico ou placebo, antes do pequeno-almoço durante 30 dias.	Paracetamol: 500mg/dose até 3 vezes por dia.
Navarro-López et al, (2022)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> CECT 30579 $1 \times 10^9$ CFU e <i>Kluyveromyces marxianus</i> B0399 com $1 \times 10^8$ CFU.  Excipientes: carbonato de cálcio, gelatina, maltodextrina e estearato de magnésio.	O grupo controlo não recebeu intervenção.	Uma cápsula oral de probiótico, ao pequeno-almoço ou outra refeição, durante 30 dias.  Em caso de incapacidade ou dificuldade de deglutição da cápsula, o conteúdo pode ser dissolvido em água e ingerido consecutivamente.	Hidroxiquina: 200 mg/dose 2 vezes por dia durante 7 dias* <sup>1</sup> ; Azitromicina: 500 mg/dose 1 vez por dia durante 7 dias* <sup>1</sup> ; Lopinavir-ritonavir: 400/100 mg/dose 2 vezes por dia durante 14 dias* <sup>1</sup> ; Darunavir-cobicistate: 800/150 mg/dose 1 vez por dia, durante 14 dias* <sup>1</sup> ; Heparina de baixo peso molecular para profilaxia de trombose venosa profunda* <sup>1</sup> .
Di Pierro et al, (2022)	Estirpe de Bactoblis ®: <i>Streptococcus salivarius</i> K12 com mais de $1 \times 10^9$ UFC.	Tratamento padrão de acordo com as diretrizes do hospital.	Dois comprimidos orais de probiótico por dia, para dissolver lentamente na boca, durante 14 dias, à noite.	Corticosteroides* <sup>1</sup> ; Anticoagulantes* <sup>1</sup> ; Antivirais* <sup>1</sup> ; Antibióticos* <sup>1</sup> ; Inibidores da bomba de prótons* <sup>1</sup> .

**Legenda:** AINE: Anti-inflamatórios não esteroide; CFU: Unidades Formadoras de Colónias;\*1: Intervenções igualmente implementadas em ambos os grupos, e sem diferenças estatisticamente significativas em termos de número de participantes sob a terapia, número de dias de intervenção, ou dosagem administrada. \*2:  $p=0.044$ , existe uma diferença estatisticamente significativa na mediana de dias, nos antissépticos para garganta, cujo é maior no grupo placebo (6 dias) do que no grupo probiótico (5 dias). \*3:  $p=0.018$ , existe uma diferença estatisticamente significativa no número de doentes a tomar antiespasmódicos, cujo no grupo probiótico nenhum doente foi detetado e no grupo placebo 6 doentes tomaram o medicamento. CECT: coleção de cultura tipo espanhol;

No estudo realizado por Kolesnyk *et al.*, (2024), é possível analisar a utilização de medicamentos com uma diferença estaticamente significativa, nomeadamente nos antissépticos para a garganta ( $P=0.044$ ) e nos antiasmáticos ( $P= 0.018$ ). Nos antissépticos, a mediana de dias foi maior no grupo placebo (6 dias) do que no grupo probiótico (5 dias). Nos antiespasmódicos, nenhum doente tomou o medicamento no grupo probiótico, enquanto no grupo placebo foi possível verificar 6 doentes (16.7%) a tomar antiespasmódicos. Assim, a percentagem e a duração do tratamento com medicamentos específicos foram geralmente semelhantes, com as seguintes exceções: menos participantes a tomar antiespasmódicos e menor utilização de antissépticos para a garganta no grupo probiótico.

No estudo realizado por Endam *et al.*, (2021) foi aprovada a continuidade de tratamento com anti-histamínicos orais ou corticosteroides intranasais para rinite alérgica sazonal ou homeopatia (para qualquer finalidade), que os doentes já faziam, antes de serem recrutados. Os medicamentos ou tratamento de resgate autorizados para o alívio sintomático dos sintomas inespecíficos da SARS-CoV-2, foram: paracetamol, AINE, descongestionantes orais, uso de humidificador e aromaterapia.

No estudo realizado por Gutiérrez-Castrellón *et al.*, (2022) apenas o paracetamol foi autorizado como co-medicação para sintomas de COVID-19. Verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre o número de dias sob paracetamol iniciado após participação no estudo no grupo controlo (três dias, em média) do que no grupo experimental, sob tratamento com probiótico (um dia, em média).

Apesar das limitações de intervenções farmacológicas e não farmacológicas definidas em alguns estudos, visando controlar as variáveis que pudessem ser confundidoras ou constituir vieses, existiram ensaios em que várias intervenções foram simultaneamente aplicadas aos grupos controlo e experimental. Num dos casos, os doentes foram autorizados a receber várias intervenções terapêuticas para a COVID-19, tais como hidroxicloroquina, azitromicina, lopinavir-ritonavir, darunavir-cobicistate, e heparina de baixo peso molecular, em concordância com as diretrizes da Sociedade Espanhola de Doenças Infeciosas e da Unidade de Doenças Infeciosas Hospitalares (Navarro-López *et al.*, 2022). Noutro estudo, os doentes do grupo probiótico e os doentes do grupo controlo receberam o mesmo tratamento padrão de acordo com as diretrizes do hospital, como corticosteroides, anticoagulantes, antivirais, antibióticos e inibidores da bomba de prótons (Di Pierro *et al.*, 2022).

Ao longo da realização dos estudos experimentais incluídos na presente revisão, verificou-se um total de 26 participantes que abandonaram os estudos e se encontravam alocados ao grupo experimental. Verificou-se o mesmo número de abandonos entre participantes alocados ao grupo controlo (tabela 4). Entre os participantes que concluíram os ensaios clínicos, 242 pertenciam ao grupo experimental, e 231 pertenciam ao grupo controlo.

Tabela 4. Análise das perdas follow-up através do fluxograma dos ensaios clínicos estudados.

Autor/Ano	Perdas no Grupo Experimental / Causas	Perdas no Grupo Controlo / Causas	Número total de doentes que concluíram o ensaio clínico
<b>Kolesnyk et al.,(2024)</b>	N = 12 / Perdas <i>follow-up</i>	N = 3 / Rejeição na 2ª colheita de sangue	N.E. = 34
	N = 1 / Reação adversa	N = 11 / Perdas <i>follow-up</i>	N.C. = 35
	N = 2 / Rejeição na 2ª colheita de sangue	N = 1 / Desistência	
<b>Endam et al.,(2021)</b>	Não existem registos de perdas	N = 1 / Intervenção interrompida antes do 1º tratamento por causa da intensificação da gravidade da doença	N.E. = 12 N.C. = 10
<b>Gutiérrez-Castrellón et al.,(2022)</b>	N = 2 / Perdas <i>follow-up</i> antes do dia 15, por motivos pessoais/familiares.	N = 1 / Perdas <i>follow-up</i> antes do dia 15, por motivos pessoais/familiares.	N.E. = 147 N.C. = 146
	N = 1 / Perda <i>follow-up</i> , antes do dia 30, por motivos pessoais/familiares	N = 3 / Perda <i>follow-up</i> , antes do dia 30, por motivos pessoais/familiares	
<b>Navarro-López et al.,(2022)</b>	N = 1 / Perda <i>follow-up</i> por melhoria clínica.	Não existem registos de perdas	N.E. = 24 N.C. = 15
	N = 1 / Perda <i>follow-up</i> , por não adesão ao tratamento		
<b>Di Pierro et al.,(2022)</b>	N = 6 / Perda <i>follow-up</i> , por desistência do próprio doente	N = 6 / Perda <i>follow-up</i> , por desistência do próprio doente	N.E. = 25 N.C. = 25

Legenda: N: número de doentes; N.C.: número de doentes no grupo controlo; N.E.: números de doentes no grupo experimental.

Na tabela 5 discriminam-se os objetivos, diferentes escalas de avaliação e limitações identificadas, nos estudos incluídos nesta revisão.

Tabela 5. Objetivos, escala de avaliação, e limitações identificadas nos estudos analisados.

Autor/Ano	Objetivo do Estudo	Escala de Avaliação do Estudo	Limitação do Estudo
<b>Kolesnyk et al.,(2024)</b>	Avaliar os probióticos a curto prazo na COVID-19 sintomática ligeira; nos sintomas pós-doença, e na resposta imunitária humoral do SARS-CoV-2.	-Questionário do Participante. -RID. -PCQ-19. -Recolha de sangue venoso periférico nos dias 0-5 e 28-35 para deteção e quantificação de IgG de SARS-CoV-2 específicas contra NCP e RBD/S1. -Escala ordinal de gravidade da COVID-19 da WHO.	-Falha na avaliação de amostras fecais relativamente à ecologia microbiana. -Inexistência de controlo de dietas. -Utilização de um RID inválido e do PCQ-19. -Nenhum doente com mais de 65 anos foi incluído no estudo.
<b>Endam et al.,(2021)</b>	Ensaio clínico de “prova-conceito” para comparar a segurança e validade de irrigação intranasal do probiótico, em doentes com SARS-CoV-2 sem necessitarem de oxigénio suplementar.	-Avaliação de todos os sintomas comunicados na infeção SARS-CoV-2. -A intensidade dos sintomas foi avaliada através da VAS. -Monitorização de temperatura diária com termómetro digital. -Todas as avaliações foram realizadas remotamente.	-Estudo prova-conceito. -Recrutamento reduzido de doentes, e encerramento do ensaio PROBCO precocemente. -Inexistência de medições objetivas. -Exclusão de subgrupos suscetíveis a desenvolver hipertensão e diabetes. -Nenhum doente com mais de 59 anos foi incluído no estudo.
<b>Gutiérrez-Castrellón et al.,(2022)</b>	Verificar a eficácia e segurança de AB21 <sup>®</sup> , em doentes em ambulatório sintomáticos com COVID-19; avaliar resultados clínicos, biomarcadores nasofaríngeos e séricos, e por fim o seu impacto no microbioma fecal.	-Escala de Progressão Clínica da Organização Mundial da Saúde. -Carga viral SARS-CoV-2 avaliado por RT-qPCR; -Infiltrados pulmonares medidos pela radiografia torácica e classificados de acordo com a pontuação Brixia. -Duração da randomização dos sintomas gastrointestinais, de acordo com a GSRS. -Microbioma fecal avaliado por sequenciamento de 16S rRNA.	-Todos os doentes do estudo são de etnia hispânica e foram recrutados num único centro. -Nenhum doente com mais de 60 anos foi incluído no estudo. -Critérios de entrada flexíveis. -Nenhum registo relativamente aos hábitos alimentares.
<b>Navarro-López et al., (2022)</b>	Validar a eficácia de uma formulação probiótica nos doentes sintomáticos com COVID-19 com envolvimento moderado, nos sintomas digestivos.	-Avaliação da situação clínica dos doentes, com parâmetros incluídos no protocolo. -Realização do teste de antigénio COVID-19 entre 10 e 15 dias após o início dos sintomas. -Realização de segundo teste de antigénio COVID-19, após os 30 dias do início do estudo. -Registo de adesão ao tratamento. -Registo de todos eventos ocorridos no estudo.	-Baixo número de doentes avaliados. -Ensaio clínico aberto e não cego. -Período de intervenção e tratamento reduzidos.

Autor/Ano	Objetivo do Estudo	Escala de Avaliação do Estudo	Limitação do Estudo
Di Piero <i>et al.</i> , (2022)	Averiguar a segurança e o perfil de eficácia do probiótico estudado, nos doentes hospitalizados com COVID-19.	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Avaliação da eficácia dos parâmetros e das tendências de indicadores laboratoriais, como CPR, Dímero-D; LDH, ferritina e o nível de saturação de O<sub>2</sub> foram realizados através de métodos paramétricos e não paramétricos.</li> <li>-Aplicação dos testes Chi-Quadrado de Pearson para analisar informação sobre a eficácia entre dois períodos de observação diferentes.</li> <li>-Aplicação do teste Cochran-Mantel-Haenszel para avaliar o risco relativo em possíveis estratificações.</li> <li>-Aplicação de função logística múltipla para analisar a contribuição de determinados preditores no desempenho dos indicadores laboratoriais.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Desconhecimento da estrutura da microbiota oral e pulmonar.</li> <li>-Inexistência de dados de colonização orofaríngea e pulmonar, após tratamento com o probiótico oral.</li> <li>-Privação de análises de citocinas.</li> <li>-Ausência de placebo no estudo.</li> <li>-Ensaio clínico randomizado aberto.</li> <li>-Baixo número de doentes internados.</li> </ul>

**Legenda:** 16S rRNA: RNA Ribossomal 16 S; COVID-19: Doença por coronavírus 2019; CRP: Proteína C Reativa; ICU: Unidade de Cuidados Intensivos; GSRs : Escala de avaliação dos sintomas gastrointestinais; IgG: Imunoglobulina G; IgM: Imunoglobulina M; LDH: Lactato desidrogenase; NCP: Proteína do nucleocapsídeo; O<sub>2</sub>: Oxigênio; PCQ-19: Questionário Pós-COVID-19; PROBCO: Estudo que visa garantir que as embalagens e rótulos diferentes de caixas não influenciavam as impressões dos doentes; RID: Diário de doenças Respiratórias; RT-qPCR: reação em cadeia da polimerase quantitativa por transcrição reversa; RBD/S1: Domínio/pico de ligação do recetor; SARS-CoV-2: Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2; VAS: Escala visual analógica; WHO: Organização Mundial da Saúde;

Na tabela 6 é possível analisar a influência dos probióticos na evolução da morbidade da SARS-CoV-2, nos diferentes estudos selecionados nesta RS.

Tabela 6. Resultados da influência dos probióticos na evolução da SARS-CoV-2 nos estudos analisados.

Autor/Ano	Caraterísticas da amostra e Resultados do estudo	Reações adversas	Conclusão
Kolesnyk et al.(2024)	<p>Idade, mediana IQR: [G.E.:44.0 (36.0–48.0) vs G.C.: 46.0 (37.5–53.0), <math>P=0.264</math>].            Etnia, Caucasiana: 100% em ambos grupos.            Género, masculino: [G.E.: 52.9% vs G.C.: 52.8%, <math>P=0.989</math>].            Hipertensão: [G.E.: 11.8 % vs G.C.: 19.4 %, <math>P=0.384</math>].            Doença semelhança a gripe: [G.E.: 50% vs G.C.: 41.7%, <math>P=0.0.489</math>].            Contacto com doentes com COVID-19: [G.E.: 70.06 % vs G.C.: 52.8 %, <math>P=0.136</math>].            Dia 10, Pontuação global de sintomas, IQR: [G.E.: 0.0 (0.0–2.0) vs G.C.: 2.0 (1.0–5.0), <math>P&lt;0.05</math>].            Dia 10, Sintomas constitucionais, IQR: [G.E.: 0.0 (0.0–1.0) vs G.C.: 1.0 (0.0–2.0), <math>P &lt; 0.018</math>].            Dia 10, Sintomas Respiratórios, IQR: [G.E.: 0.0 (0.0–1.0) vs G.C.: 1.0 (0.0–2.5), <math>P=0.006</math>].            Dia 10, Sintomas Gastrointestinais: [G.E.: 0.0 vs G.C.: 0.0, <math>P=0.704</math>].            Proporção de doentes com Sintomas Gastrointestinais: foi menor no G.E., nos dias 5,7,8 e 9, todos com <math>P&lt;0.05</math>.            Duração Sintomas Gastrointestinais, Dias, IQR: [G.E.: 3.5(1.0–6.0) vs G.C. 5.5 (4.0–7.0), <math>P&lt;0.102</math>].            Duração de sintomas, Dias, IQR: [G.E.: 11.0 (7.0–17.0) vs G.C.: 14.0 (12.0–20.0), <math>P=0.035</math>].            RBD/S1, BAU/ml/IQR: [G.E.: 225.9 (127.7–317.4) vs G.C.: 105.6 (67.8–189.4), <math>P=0.012</math>].            NCP, ratio, unidades, IQR: [G.E.: 3.64 (1.64 – 6.11) vs G.C.: 2.97 (1.61 – 4.10), <math>P=0.299</math>].</p>	<p>-Proporção de pacientes sem limitações de atividade: [G.E.: 82.3% vs G.C.: 55.6%, <math>P=0.021</math>].            -Não existiu nenhuma hospitalização em nenhum dos grupos.            -Urticária, n: [G.E.: 2 vs G.C.: 1].            -Dor abdominal: [G.E.: 1 vs G.C.: 1].            -Sem diarreia: [G.E.: 1 vs G.C.: 1].            -Obstipação: [G.E.: 1].            -Enantema Oral: [G.E.: 1 vs G.C.: 1].</p>	<p>Os probióticos melhoraram os sintomas agudos e pós-doença. Também existiu uma melhoria significativa na resposta imunitária humoral aos antígenos virais.</p>

Autor/Ano	Caraterísticas da amostra e Resultados do estudo	Reações adversas	Conclusão
<p><b>Endam et al.,(2021)</b></p>	<p>Idade, (média ± SD): 30.4 (9.1).            Género (%): masculino: 30%; feminino: 70%.            Etnia: 75 % caucasiano.            Sem comorbilidades.            P.m., Fadiga, i.e.: 48.4/100.            P.m., Limitação de atividade, i.e.: 47.5/100.            P.m., Perda de olfato e/ou Paladar, i.e.: 41.4/100.            P.m., Vômito, i.e.: 0.9/100.            Dia 7, proporção de doentes, fadiga de intensidade moderada/grave: [G.E.: 32.1 vs G.C.: 50.0%, <i>P</i>=0.02].            Dia 9, perda de olfato moderada/grave menor no G.E.: <i>P</i>=0.03.            Dias, 8, 9, e 12, falta de ar moderada/grave menor no G.E.: <i>P</i>= 0.02, <i>P</i>= 0.05 e <i>P</i>= 0.04.</p>	<p>-Nenhum EA grave observado.            -Nenhum episódio com sinusite aguda, otite média aguda e hemorragia nasal.            -Enxaqueca, n, (%): [G.E.: 1 (8.3%) vs G.C.: 1(10%)].            -Febre, n, (%): [G.E.: 3 (36%) vs G.C.: 0].            -Insónia, n, (%): [G.E.: 1 (8.3%) vs G.C.: 1 (10%)].            -Náuseas, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0].            -Aftas, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0].            -Dor de ouvido, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0]            -Formigueiro na parte de trás do nariz, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0].            -Tonturas, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0].            -Sabor metálico na boca, n, (%): [G.E.: 1(8.3%) vs G.C.: 0].            -Dor no corpo, n, (%): [G.E.: 0 vs G.C.: 1 (10%)].            -Dias 3-10 com um aumento significativo de dor/pressão facial, no GE.: todos com <i>P</i>&lt;0.05.            -1 mês após o estudo: G.E.: 25% vs G.C.: 30%, e não existiu sintomas persistentes de fadiga, anosmia ou falta de ar.</p>	<p>A irrigação nasal, com o probiótico, potência um aumento na intensidade dos sintomas de dor e desconforto facial, e está potencialmente associada a uma menor intensidade dos sintomas de fadiga, perda de olfato e sensação de falta de ar.</p>
<p><b>Gutiérrez-Castrellón et al.,(2022)</b></p>	<p>Idade, mediana IQR: [G.E.: 34 (26-45) vs G.C.: 39 (27-49)].            Sexo (feminino), (%): [G.E.: 54.7% vs G.C.: 52.7%].            BMI (kg/m<sup>2</sup>), mediana, IQR: [G.E.: 27.5 (23.3-31.8) vs G.C.: 29.4 (27.1-32.9)].            Diabetes, %: [G.E.: 10.0% vs G.C.: 10.7%].            Hipertensão Arterial, %: [G.E.: 18.7% vs G.C.: 20.7%].            Diarreia, %: [G.E.: 27.3% vs G.C.: 36.0%].            Náusea, %: [G.E.: 30.7% vs G.C.: 31.3%].            Fezes moles, %: [G.E.: 18.9% vs G.C.: 16.7%].            Evacuação incompleta, %: [G.E.: 18.0% vs G.C.: 20.0%].            Dor abdominal, %: [G.E.: 14.7% vs G.C.: 10.7%].            Infiltrados pulmonares, %: [G.E.: 48.0% vs G.C.: 32.0%].            SpO<sub>2</sub>(%) [mediana, IQR]: [G.E.: 90 (90-91) vs G.C.: 91 (90-91)].            Dia 30, Remissão completa<sup>a</sup>, [n, %]: [G.E.: 78/147 (53.1%) vs G.C.: 41/146 (28.1%)]. RR (95 CI): 1.89 (1.40-2.55), <i>P</i>&lt;0.001.            No dia 30: Nenhuma hospitalização, internamento na ICU, ou morte nos grupos em estudo.</p>	<p>-Nenhum EA grave observado.            -EA, %: [G.E.: 27.3% vs G.C.: 42.0%, <i>P</i>= 0.008]            ---Tomar ≥2 medicamentos por dia [n, %]: [G.E.: 29.2% vs G.C.: 44.4 %, <i>P</i>= 0.312].            -Febre: G.E. (4.6%) vs G.C. (12.73 %).            -Tosse: G.E. (3.3 %) vs G.C. (8.0 %).            -Mialgia: G.E (6.7%) vs G.C. (3.3%).            -Odinofagia: G.E. (2.7%) vs G.C. (6.7%).            -Conjuntivite não específica: G.E. (2.7%) vs G.C. (5.3%).</p>	<p>O tratamento com o probiótico foi bem tolerado com uma redução da carga viral nasofaríngea, de infiltrados pulmonares e na duração dos sintomas digestivos e não digestivos comparativamente com o placebo.            Não se verificou nenhuma alteração significativa na composição da microbiota fecal entre os grupos, mas um aumento significativo de IgM e IgG no grupo probiótico contra a SARS-CoV-2.</p>

Autor/Ano	Caraterísticas da amostra e Resultados do estudo	Reações adversas	Conclusão
	<p>Menos dias de febre, tosse, dor de cabeça, dores no corpo, falta de ar, náusea, diarreia e dor abdominal no G.E.</p> <p>Dias 15 e 30, carga viral nasofaríngea: menor no G.E., ambos com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Dias 15 e 30, pontuação radiográfica de tórax: menor no G.E., ambos com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Dias 15 e 30, títulos séricos de IgG e IgM: maior no G.E., ambos com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Dia 15, hsCRP: menor no G.E., com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Dia 15 e 30, D-Dímero: menor G.E., ambos com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Diversidade alfa (índice de <i>Shannon</i>): pequeno aumento em ambos grupos, com <math>P&lt;0.001</math>.</p> <p>Diversidade alfa (índice de Chao-1): nenhum aumento significativo em ambos grupos no dia 30.</p> <p>Diversidade beta (índice de Bray-Curtis): nenhuma diferença significativa em ambos grupos, nem no início nem no dia 30.</p> <p>PCoA com <math>P&lt; 0.0001</math>: microbiota dominada pelo género <i>Bacteroides</i>, <i>Prevotella</i> e <i>Firmicutes</i>.</p>		
<p><b>Navarro-López et al., (2022)</b></p>	<p>Sexo(feminino),n(%): [G.E.: 12(46.1%) vs G.C.: 10 (66.7%), <math>P= 0.21</math>].</p> <p>Idade, Média ± SD: [G.E.: 48.88 ± 12.35 vs G.C.: 46.33 ± 10.91, <math>P= 0.51</math>].</p> <p>Patologias prévias (HT, cardiovascular, diabetes, cancro, DPOC, n (%): [G.E.: 7 (26.9%) vs G.C.: 3 (20 %), <math>P= 0.62</math>].</p> <p>Doentes com resolução dos sintomas digestivos:</p> <p>---Pirose, n (%): [G.E.: 100% vs G.C.: 33.3%, <math>P=0.05</math>].</p> <p>---Dor abdominal, n (%): [G.E.: 100% vs G.C.: 62.5%, <math>P=0.04</math>].</p> <p>Doentes com resolução de sintomas não digestivos, n (%): [G.E.: 10/24 (41.7%), vs G.C.: 2/15(13%), <math>P=0.06</math>.</p> <p>Melhoria total dos sintomas digestivos, %, média ± SD: [G.E.: 87.95% ± 24.26 vs G.C.: 65% ± 39.86, <math>P=0.06</math>].</p> <p>Melhoria total dos sintomas gerais%, média ± SD: [G.E.: 88.55% ± 13.85 vs G.C.: 70.82 % ± 26.48, <math>P= 0.03</math>].</p>	<p>-EA: G.E: 6 vs G.C.: 5.</p> <p>-EA. no G.E.: náuseas e aumento da frequência de dejeções; obstipação ligeira e má digestão-inchaço; obstipação ligeira; cólica renal e DVT; inchaço ligeiro e intermitente; e dores de cabeça/tonturas.</p> <p>-EA. no G.C.: cólica renal; dor lombar; perda de peso (6 kg); fadiga e dispneia persistente.</p>	<p>Os resultados indicam efeitos positivos na redução total de sintomas digestivos e dos sintomas gerais com o tratamento probiótico.</p>

Autor/Ano	Caraterísticas da amostra e Resultados do estudo	Reações adversas	Conclusão
Di Piero <i>et al.</i> , (2022)	<p>Doentes inscritos com idade e sexo: <math>P=0.2121</math>.  --Idade, Media <math>\pm</math> SD: [G.E.: <math>45.8 \pm 14.6</math> vs G.C.: <math>51.3 \pm 16.0</math>].  --Sexo (n, masculino/feminino): [G.E.: 13/12 vs G.C.: 16/9].  Comorbilidades dos doentes inscritos: <math>P= 0.5436</math>.  --HT (n): [G.E.: 7 vs G.C.: 2].  --DM + Obesidade (n): [G.E.: 2 vs G.C.: 0].  Biomarcadores sanguíneos e saturimetria [CRP; D-dimero; LDH; Ferritina; Saturação de <math>O_2</math>]: todos com <math>P&gt;0.05</math>.  Nº de doentes com necessidade de <math>O_2</math> suplementar no Dia 1: [G.E.: 21 vs G.C.: 25, <math>P=0.0416</math>].  CRP [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 9 vs G.C.:11, <math>P= 0.5637</math>.  Dímero-D, [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 11 vs G.C.: 13, <math>P=0.5713</math>.  LDH, [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 10 vs G.C.: 16, <math>P= 0.1573</math>.  Ferritina [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 11vs G.C.: 19, <math>P=0.0303</math>.  Saturação de oxigénio, [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 18 vs G.C.: 18, <math>P=0.8121</math>.  Febre [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 0 vs G.C.: 2, <math>P=0.1489</math>.  Oxigénio suplementar: [<math>&gt;</math> Dia 1, n(doentes)]: G.E.: 8 vs G.C.: 17, <math>P=0.301</math>.</p> <p>-Morreu antes de ser transferido para ICU, n: G.E.: 0 vs G.C.: 2.  -Transferido para ICU, n: G.E.: 8 vs G.C.: 8  -Morte na ICU, n: G.E.: 3 vs G.C.: 6.  -Recuperação na ICU, n: G.E.: 5 vs G.C.: 2.  -Total de óbitos, n: G.E.: 3 vs G.C.: 8.  -Mortalidade, n (%): G.E.: 12% vs G.C.: 32%, Odds ratio: 3.45098.</p> <p>-Relação entre óbito e menor ou maior necessidade de oxigénio suplementar, com <math>P=0.0022</math>:  -G.C. com menor oxigénio suplementar: (Morte, n:0 vs Vivos, n: 8).  -G.C. com maior oxigénio suplementar: (Morte, n:8 vs Vivos, n: 9).  -G.E.com menor oxigénio suplementar: (Morte, n:0 vs Vivos, n: 15).  -G.E. com maior oxigénio suplementar: (Morte, n:2 vs Vivos, n: 5).</p>	- EA não identificado.	Os resultados indicam melhoria no grupo probiótico, relativamente aos parâmetros bioquímicos (CRP, Dímero-D; Ferritina, LDH), febre, nível de saturação de oxigénio, necessidade e duração da oxigenoterapia, taxa de progressão de ICU e morte.

**Legenda:** a: Requer RT-qPCR negativo (eliminação viral) mais resolução completa de todos os cinco sintomas de Covid19 considerados no início do estudo (eliminação sintomática). **BAU:** Unidades de anticorpos de ligação; **BMI:** Índice de massa corporal; **CRP:** Proteína C Reativa; **DPOC:** Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica; **DM:** Diabetes mellitus; **DVT:** Trombose Venosa Profunda; **EA:** Efeito Adverso; **ICU:** Unidade de cuidados intensivos; **I.e:** início do estudo; **IgG:** Imunoglobulinas G; **IgM:** Imunoglobulina M; **IQR:** intervalo interquartil; **LDH:** Lactato desidrogenase; **G.E.** Grupo Experimental; **G.C.:** Grupo Controlo; **HT:** Hipertensão arterial; **hsCRP:** Proteína C reativa de alta sensibilidade; **P.m:** Pontuação média; **n:** número de doentes; **NCP:** Proteína do nucleocapsídeo; **PCoA:** Agrupamento de Análises de coordenadas Principais;  **$O_2$ :** Oxigénio **RBD/S1:** Domínio/pico de ligação do recetor; **RR (95 CI):** Risco Relativo ( intervalo de confiança de 95%); **SARS-CoV-2:** Síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2; **SD:** Desvio Padrão; **SpO<sub>2</sub>:** Saturação periférica de oxigénio; **(%):** Percentagem; **Vs:** versus.

No estudo de Kolesnyk *et al.*, (2024), no dia 10, a pontuação global dos sintomas foi menor no grupo probiótico [0,0(0,0–2,0) vs. 2,0(1,0–5,0),  $P < 0,05$ ], assim como os sintomas inespecíficos [0,0(0,0–1,0) vs. 1,0(0,0–2,0),  $P = 0,018$ ] e respiratórios [0,0 (0,0–1,0) vs. 1,0(0,0–2,5),  $P = 0,006$ ]. A proporção de pacientes com sintomas gastrointestinais foi significativamente menor no grupo probiótico, nos dias 5, 7, 8 e 9, verificando-se um valor  $P$  inferior a 0,05. A duração da generalidade dos sintomas foi significativamente menor no grupo experimental do que no grupo controlo [11,0 (7,0–17,0) vs. 14 (12,0–20,0) dias, com  $P = 0,035$ ]. Contudo, no que concerne especificamente à duração dos sintomas gastrointestinais, apesar de se manter uma maior tendência para maior duração no grupo controlo do que no grupo experimental, a diferença não foi estatisticamente significativa entre os dois grupos [3,5 dias (1,0–6,0) vs. 5,5 dias (4,0–7,0),  $P = 0,102$ ]. Após controlo dos valores basais, a exposição aos probióticos durante os 28 dias, resultou num aumento significativo de domínio/pico de ligação do recetor e numa tendência para aumento da concentração de anticorpos de proteína do nucleocapsídeo.

Relativamente às reações adversas, destacam-se os dois doentes do grupo experimental e um doente do grupo placebo que desenvolveram uma erupção urticariforme com duração de um a três dias. A gravidade da generalidade dos eventos adversos foram de grau 1, não afetando as atividades diárias, e apenas um doente, do grupo placebo, apresentou dor abdominal moderada classificada como grau 2.

No estudo de Endam *et al.*, (2021), verificaram-se vários resultados superiores do ponto de vista clínico e de forma estatisticamente significativa no grupo experimental, comparativamente ao grupo controlo: (i) proporção de doentes com fadiga de intensidade moderada/grave no dia 7; (ii) proporção de doentes com perda de olfato moderado/grave, no dia 9; (iii) proporção de doentes com falta de ar moderado/grave, nos dias 8 e 12. Também, no dia 9, a proporção de doentes com falta de ar moderado/grave foi menor no grupo probiótico, mas com significância limítrofe de  $P = 0,05$ .

Já no estudo de Endam *et al.*, (2021), destacou-se o aumento de um efeito adverso durante o tratamento com probiótico, em particular o aumento significativo no sintoma de dor/pressão facial durante os dias 3 a 10. Um mês após o fim do estudo, os sintomas continuaram a ser reportados por vários participantes. Curiosamente, neste caso, houve uma maior proporção de doentes afetados pela dor/pressão facial entre os participantes do grupo controlo (30%) do que entre os participantes do grupo experimental (25%). Os restantes efeitos adversos foram raros e distribuídos uniformemente entre os grupos. Nenhum efeito adverso foi suficientemente grave

para suspender o tratamento, interromper a participação no estudo ou fazer com que o doente procurasse atendimento médico.

No estudo de Gutiérrez-Castrellón *et al.*, (2022), a propósito dos resultados de remissão completa ao fim de 30 dias, verificou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos, com 53.1% de participantes com eliminação sintomática e viral completa no grupo probiótico e 28.1% no grupo placebo. Além disso, ocorreram diferenças estatisticamente significativas favoráveis aos doentes do grupo experimental face aos doentes do grupo controlo quanto a vários parâmetros clínicos: dias de febre (2 dias vs. 5 dias); tosse (10.5 dias vs. 14 dias); dor de cabeça (7 dias vs. 12 dias); dores no corpo (3 dias vs 7 dias); falta de ar (2,5 dias vs. 5 dias,); náuseas (2 dias vs. 9 dias); diarreia (4 dias vs. 8.5 dias); e dor abdominal (4 dias vs. 10 dias). Adicionalmente, em termos laboratoriais, também se verificaram vários resultados favoráveis no grupo experimental, com diferenças estatisticamente significativas, dos quais se destacam: menor carga viral nasofaríngea e pontuação radiográfica de tórax nos dias 15 e 30; e níveis séricos de IgG e IgM superiores, nos dias 15 e 30.

Não se registou nenhum efeito adverso grave no estudo Gutiérrez Castrellón *et al.*, (2022), apesar dos efeitos adversos emergentes do tratamento terem ocorrido em 27.3% dos participantes do grupo experimental e 42.0% dos participantes do grupo controlo. Os efeitos adversos mais frequentes foram: febre, tosse, mialgia, odinofagia e conjuntivite.

No estudo de Navarro-López *et al.*, (2022), relativamente à resolução dos sintomas digestivos, foi possível verificar uma melhoria estatisticamente significativa na dor abdominal, ao longo do estudo. Esta melhoria foi notória no grupo experimental, ocorrendo em 100% dos participantes, ainda que também tenha ocorrido em 62.5% dos participantes do grupo controlo. Na pirose, existiu uma melhoria estatisticamente significativa de 100% no grupo experimental e 33.3% no grupo controlo. No que diz respeito aos doentes com resolução de sintomas não digestivos, corresponderam a 41.7% dos participantes do grupo experimental e 13% do grupo controlo, A propósito da melhoria dos sintomas gerais, os dados indicam diferenças significativas entre os grupos, tendo o grupo experimental relatos de melhoria em 88.6% dos participantes e o grupo controlo em 70.8% dos participantes. No que concerne aos efeitos adversos, ocorreram em onze dos doentes: seis no grupo experimental e cinco no grupo controlo. No grupo controlo, os efeitos adversos foram: cólica renal; dor lombar; perda de peso (6 kg); fadiga e dispneia persistente. Náuseas e aumento da frequência de dejeções; obstipação ligeira e má digestão – inchaço; obstipação ligeira; cólica renal e trombose venosa profunda; inchaço ligeiro e intermitente, e

dores de cabeça/tonturas foram os efeitos adversos relatados por participantes alocados ao grupo experimental.

No estudo de Di Pierro *et al.*, (2022) foi possível verificar uma melhoria em todos parâmetros analisados (proteína C reativa, Dímero-D, lactato desidrogenase, ferritina, saturação de oxigénio, febre e oxigénio suplementar), no grupo experimental. As diferenças para o grupo controlo foram estatisticamente significativas quanto a ferritina e necessidade de oxigénio suplementar. No referido estudo, registaram-se transferências de oito doentes do grupo controlo para a ICU, antes do final do período de tratamento de 14 dias, e outros dois doentes morreram antes de serem transferidos para ICU. Dos oito doentes prontamente transferidos da ICU, seis acabaram por falecer e dois doentes recuperaram. No grupo experimental, oito doentes foram prontamente transferidos para ICU, antes do final dos 14 dias de tratamento. Destes doentes, três faleceram e cinco recuperaram. Assim, a mortalidade afetou 32% dos doentes do grupo controlo e 12% no grupo tratado com probiótico, tendo sido verificado um *odds ratio* de 3,5, para um intervalo de confiança de 95% (0,79–15,01). Isto significa que a sobrevivência foi três vezes maior nos doentes tratados com a estirpe *Streptococcus salivarius K12* do que nos doentes não tratados com probiótico oral.

Com a realização da presente RS, foi possível verificar uma diminuição sintomatológica na SARS-CoV-2 em grupos de doentes tratados com probióticos, comparativamente a grupos controlo, tanto a nível de sintomas digestivos (muito característicos da doença) como não digestivos. Destacaram-se ainda melhorias nos seguintes parâmetros: resposta imunitária humoral aos antigénios virais; parâmetros bioquímicos; nível de saturação de oxigénio e necessidade de oxigenoterapia; taxa de progressão de ICU; e número de óbitos.

Existem estudos que não foram contemplados nos resultados da presente revisão, em função do tipo de estudo não corresponder aos critérios de inclusão definidos. Não obstante, a análise de estudos retrospectivos cuja exposição não fora controlada pelo investigador, podem auxiliar na interpretação dos achados obtidos nos estudos descritos anteriormente. Num estudo retrospectivo de Wang, Huaqui *et al.*, (2021), analisou-se a incidência de diarreia em 156 doentes com COVID-19 grave, e também se observou a eficácia e prognóstico do uso de probióticos. O comprimido com o probiótico foi constituído por diferentes estirpes, nomeadamente *Bifidobacterium longum*; *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* com uma quantidade igual ou superior a  $0.5 \times 10^7$  unidades formadoras de colónias (CFU), administrando-se um comprimido por dia, durante 7 dias. A duração de sintomas diarreicos foi de 2.41 dias menor

nos doentes do grupo experimental do que no grupo controlo, sendo a diferença estatisticamente significativa (Wang, Huaqui et al., 2021).

Noutro estudo de coorte retrospectivo em que foram recrutados doentes hospitalizados com COVID-19, foi administrada uma cápsula contendo *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, e *Enterococcus* com  $1.0 \times 10^7$  CFU, duas vezes ao dia durante 30 dias. Verificou-se que os doentes no grupo experimental obtiveram uma melhoria clínica 3 dias mais rápida, comparativamente aos doentes do grupo controlo, sendo a diferença estatisticamente significativa (G.E.: 18.0 dias vs G.C.: 21.0, com  $P=0.022$ ) (L. Zhang et al., 2021). Estes resultados corroboram a teoria de associação da toma de probióticos à melhoria de sintomas e aceleração do tempo de recuperação. Existem algumas sugestões para as melhorias observadas. A ingestão de probióticos está possivelmente associada a concentrações séricas mais elevadas de IgG e IgM de ligação-*spike*, em comparação com o placebo. Consequentemente podem ser responsáveis por uma resolução clínica mais rápida dos sintomas da COVID-19, pois estes anticorpos possuem atividade neutralizante e evitam a reentrada da SARS-CoV-2 nas células hospedeiras após ligação ao recetor e fusão da membrana (Liu et al., 2020; Seow et al., 2020).

Noutro estudo retrospectivo de Ceccarelli *et al.*, (2021), foi avaliada a taxa de mortalidade, a necessidade de hospitalização e o tempo de hospitalização em doentes com pneumonia grave por COVID-19, através da administração da melhor terapia disponível (MTD), *versus* doentes com MTD e suplementados com bacterioterapia oral, nomeadamente: *Streptococcus thermophilus*, *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (Sivomixx®). Esta formulação foi administrada em três doses iguais por dia, num total de 2.400 mil milhões de bactérias por dia. Relativamente à mortalidade, 11% dos doentes faleceram no grupo tratado com MTD mais bacterioterapia versus 30% dos doentes no grupo tratado por apenas MTD ( $P < 0.001$ ). No que se refere à necessidade de cuidados em ICU, foi de 21.4% no grupo MTD e 18.1 % no grupo MTD mais bacterioterapia. Isto indica que existiu uma melhoria percentual no grupo tratado com o probiótico, quer em termos de sobrevivência, quer em termos de cuidados de saúde requeridos durante o estudo. Contudo, no que diz respeito ao tempo de hospitalização, foi possível verificar que os doentes tratados com MTD tiveram uma hospitalização média de 14 dias, enquanto os doentes tratados com MTD e bacterioterapia oral tiveram uma duração média de hospitalização de 20 dias com valor de  $P < 0,001$  (Ceccarelli et al., 2021).

Saviano *et al.*, (2022) estudaram a eficácia de mistura de três estirpes probióticas (*Bifidobacterium lactis* LA 304, *Lactobacillus salivarius* LA 302, e *Lactobacillus acidophilus* LA

201; Lactibiane Iki®) na redução da calprotectina fecal e a diminuição do suporte de oxigénio e do tempo de internamento nos doentes com pneumonia COVID-19, no âmbito de um estudo prospetivo randomizado. Um grupo recebeu a mistura probiótica mais a terapia padrão para COVID-19, e o segundo grupo apenas recebeu a terapia padrão para COVID-19. Ambos os grupos foram tratados por 10 dias. Comparativamente ao grupo controlo ativo, no grupo tratado com probiótico, verificaram-se resultados superiores quanto a vários parâmetros: diminuição de 35% na calprotectina fecal vs. 16%; diminuição na proteína C reativa de 72.7% vs. 62%; e diminuição ligeira não significativa no suporte de oxigénio (Saviano et al., 2022).

Os estudos mencionados anteriormente variam nas estirpes bacterianas utilizadas, no regime posológico e nas comorbilidades preexistentes nos doentes com COVID-19, o que desafia uma comparação direta com os resultados obtidos nesta RS. Destaque-se ainda que, tal como retratado anteriormente, os objetivos e escalas de avaliação de comorbilidades adotadas foram variáveis, entre os estudos.

Com a realização do presente trabalho, também foi possível verificar-se o desenvolvimento e avaliação de uma nova terapia probiótica intranasal, cuja rapidez de ação possa ser apreciada pelos doentes. No entanto, com essa alternativa, foram relatados vários casos de pressão ou dor facial que podem comprometer a adesão à terapêutica. As células epiteliais ciliadas na cavidade nasal e nas vias aéreas superiores são os principais locais para desenvolver a infeção inicial da SARS-CoV-2. Assim, a administração intranasal de HH-120, proteína de fusão de enzima de conversão da angiotensina 2 semelhante à IgM, pode neutralizar o SARS-Cov-2 e prevenir a infeção viral no sistema respiratório inferior (Song et al., 2023). Desta forma, a terapia probiótica intranasal possivelmente pode ser considerada como uma nova terapia imunomoduladora, na resposta à infeção por SARS-CoV-2 (Schijns & Lavelle, 2020). Por outro lado, em pesquisas futuras, poderá ser importante avaliar a suscetibilidade dos excipientes e microrganismos analisados em desencadear eventos adversos e análise dos probióticos disponíveis no mercado de composição idêntica aos utilizados nos estudos incluídos.

A atual dissertação apresentou várias limitações que devem ser mencionadas. Primeiramente, há a destacar o número reduzido de ensaios clínicos concluídos. Uma parte significativa de ensaios clínicos de potencial interesse apresentavam uma situação de recrutamento concluída, mas sem resultados publicados. Seguidamente, pode mencionar-se o número reduzido de doentes nos estudos selecionados. Os desenhos dos estudos ocorreram principalmente durante a primeira vaga pandémica da COVID-19, existindo muitas restrições importantes dos

investigadores para o acesso aos doentes. Deve ainda referir-se que a existência de ensaios clínicos abertos possivelmente limita a eficácia dos resultados obtidos, ao contrário dos ensaios em condições duplo-cego. Outro aspeto a considerar diz respeito aos resultados incluídos não elucidarem, com clareza, a utilização de medicamentos farmacológicos durante os estudos, não se limitando a investigação ao uso de apenas probióticos, o que pode ter influenciado a efetividade nos resultados obtidos. Acrescente-se ainda que a seleção de estudos com idioma Inglês e Português pode ter eliminado outros ensaios revelantes para análise. Além disso, os estudos incluídos nesta dissertação não fornecem informações detalhadas sobre a alimentação dos doentes e incluem participantes adultos sem comorbilidades, o que poderia ter impactado os resultados no uso de probióticos na evolução da SARS-CoV-2. Por fim, os estudos analisados incluíram várias espécies pertencentes a diferentes géneros, o que dificultou a identificação dos microrganismos mais revelantes na evolução da morbilidade na SARS-CoV-2.

#### **4. Conclusão**

As administrações de preparações contendo probióticos possivelmente têm impacto positivo na evolução da SARS-CoV-2. Os resultados analisados nesta revisão sugerem possivelmente uma melhoria sintomatológica, um aumento na resposta imunitária humoral aos antígenos virais, uma redução significativa nos marcadores inflamatórios e melhoria na taxa de progressão em doentes internados e sobrevida, em grupos de doentes tratados com probióticos. Todavia, estes resultados necessitam de mais estudos para comprovar a eficácia dos probióticos, sobretudo no que concerne à evolução da morbidade na SARS-CoV-2. De forma geral, os tratamentos com probióticos eventualmente manifestaram serem seguros e sem efeitos adversos graves, contudo é importante realçar todas as limitações identificadas nesta dissertação. Em pesquisas futuras, poderá ser importante analisar o papel dos probióticos intranasais como uma nova terapia imunomoduladora no tratamento e prevenção da SARS-CoV-2, avaliar a suscetibilidade dos excipientes e microrganismos analisados em despoletar eventos adversos e por último, análise dos probióticos disponíveis no mercado de composição idêntica aos utilizados nos estudos incluídos nesta revisão sistemática.

## Referências Bibliográficas

- Ahire, J. J., Jakkamsetty, C., Kashikar, M. S., Lakshmi, S. G., & Madempudi, R. S. (2021). In Vitro Evaluation of Probiotic Properties of *Lactobacillus plantarum* UBLP40 Isolated from Traditional Indigenous Fermented Food. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, *13*(5), 1413–1424. <https://doi.org/10.1007/s12602-021-09775-7>
- Antunes, A. E. C., Vinderola, G., Xavier-Santos, D., & Sivieri, K. (2020). Potential contribution of beneficial microbes to face the COVID-19 pandemic. *Food Research International*, *136*, 109577. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109577>
- Ashraf, U. M., Abokor, A. A., Edwards, J. M., Waigi, E. W., Royfman, R. S., Hasan, S. A.-M., Smedlund, K. B., Hardy, A. M. G., Chakravarti, R., & Koch, L. G. (2021). SARS-CoV-2, ACE2 expression, and systemic organ invasion. *Physiological Genomics*, *53*(2), 51–60. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00087.2020>
- Azad, Md. A. K., Sarker, M., & Wan, D. (2018). Immunomodulatory Effects of Probiotics on Cytokine Profiles. *BioMed Research International*, *2018*, 1–10. <https://doi.org/10.1155/2018/8063647>
- B, Korber, W., Fischer, S., Ganakaran, H., Yoon, J., Theiler, W., Abfalterer, B., Foley, E. E., Giorgi, T., Bhattacharya, D. G., Partridge, C., Evans, T. I., de Silva, C., LaBranche, & DC, Montefiori. (sem data). *Spike mutation pipeline reveals the emergence of a more transmissible form of SARS-CoV-2*.
- Baghizadeh Fini, M. (2020). Oral saliva and COVID-19. *Oral Oncology*, *108*, 104821. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104821>
- Bai, Z., Cao, Y., Liu, W., & Li, J. (2021). The SARS-CoV-2 Nucleocapsid Protein and Its Role in Viral Structure, Biological Functions, and a Potential Target for Drug or Vaccine Mitigation. *Viruses*, *13*(6), 1115. <https://doi.org/10.3390/v13061115>
- Baig, A. M., Khaleeq, A., Ali, U., & Syeda, H. (2020). Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host–Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chemical Neuroscience*, *11*(7), 995–998. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.0c00122>
- Bakhiet, M., & Taurin, S. (2021). SARS-CoV-2: Targeted managements and vaccine development. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *58*, 16–29. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2020.11.001>
- Baud, D., Dimopoulou Agri, V., Gibson, G. R., Reid, G., & Giannoni, E. (2020). Using Probiotics to Flatten the Curve of Coronavirus Disease COVID-2019 Pandemic. *Em Frontiers in Public Health* (Vol. 8, p. 186). FRONTIERS MEDIA SA. <https://doi.org/10.3389/fpubh.2020.00186>
- Bhushan, B., Singh, B. P., Saini, K., Kumari, M., Tomar, S. K., & Mishra, V. (2019). Role of microbes, metabolites and effector compounds in host–microbiota interaction: A pharmacological outlook.

*Environmental Chemistry Letters*, 17(4), 1801–1820. <https://doi.org/10.1007/s10311-019-00914-9>

- Bottari, B., Castellone, V., & Neviani, E. (2021). Probiotics and Covid-19. *International Journal of Food Sciences & Nutrition*, 72(3), 293–299. Academic Search Complete. <https://doi.org/10.1080/09637486.2020.1807475>
- Brown, R. L., Sequeira, R. P., & Clarke, T. B. (2017). The microbiota protects against respiratory infection via GM-CSF signaling. *Nature Communications*, 8(1), 1512. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01803-x>
- Capaldo, C. T., Farkas, A. E., & Nusrat, A. (2014). Epithelial adhesive junctions. *F1000Prime Reports*, 6. <https://doi.org/10.12703/P6-1>
- Ceccarelli, G., Borrazzo, C., Pinacchio, C., Santinelli, L., Innocenti, G. P., Cavallari, E. N., Celani, L., Marazzato, M., Alessandri, F., Ruberto, F., Pugliese, F., Venditti, M., Mastroianni, C. M., & d’Ettore, G. (2021). Oral Bacteriotherapy in Patients With COVID-19: A Retrospective Cohort Study. *Frontiers in Nutrition*, 7, 613928. <https://doi.org/10.3389/fnut.2020.613928>
- Chen, H., Guo, J., Wang, C., Luo, F., Yu, X., Zhang, W., Li, J., Zhao, D., Xu, D., Gong, Q., Liao, J., Yang, H., Hou, W., & Zhang, Y. (2020). Clinical characteristics and intrauterine vertical transmission potential of COVID-19 infection in nine pregnant women: A retrospective review of medical records. *Lancet*, 395, 809–815.
- Chiba, Y., Shida, K., Nagata, S., Wada, M., Bian, L., Wang, C., Shimizu, T., Yamashiro, Y., Kiyoshima-Shibata, J., Nanno, M., & Nomoto, K. (2010). Well-controlled proinflammatory cytokine responses of Peyer’s patch cells to probiotic *Lactobacillus casei*: Peyer’s patch and *Lactobacillus casei*. *Immunology*, 130(3), 352–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2009.03204.x>
- Conte, L., & Toraldo, D. M. (2020). Targeting the gut–lung microbiota axis by means of a high-fibre diet and probiotics may have anti-inflammatory effects in COVID-19 infection. *Em Therapeutic Advances in Respiratory Disease* (Vol. 14, p. 175346662093717). SAGE PUBLICATIONS LTD. <https://doi.org/10.1177/1753466620937170>
- Corthésy, B. (2013). Multi-Faceted Functions of Secretory IgA at Mucosal Surfaces. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00185>
- Dai, H., Han, J., & Lichtfouse, E. (2021). Smarter cures to combat COVID-19 and future pathogens: A review. *Environmental Chemistry Letters*, 19(4), 1–13. Academic Search Complete. <https://doi.org/10.1007/s10311-021-01224-9>

- Day, S. J., & Altman, D. G. (2000). Statistics Notes: Blinding in clinical trials and other studies. *BMJ*, *321*(7259), 504–504. <https://doi.org/10.1136/bmj.321.7259.504>
- Dhar, D. (2022). Impending Mental Health Issues During Coronavirus Disease 2019–Time for Personalized Nutrition Based on the Gut Microbiota to Tide Over the Crisis? Em *FRONTIERS IN NEUROSCIENCE* (Vol. 15). FRONTIERS MEDIA SA. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.831193>
- Di Pierro, F., Iqtadar, S., Mumtaz, S. U., Bertuccioli, A., Recchia, M., Zerbinati, N., & Khan, A. (2022). Clinical Effects of Streptococcus salivarius K12 in Hospitalized COVID-19 Patients: Results of a Preliminary Study. *Microorganisms*, *10*(10), 1926. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10101926>
- Donato, H., & Donato, M. (2019). Etapas na Condução de uma Revisão Sistemática. *Acta Médica Portuguesa*, *32*(3), 227–235. <https://doi.org/10.20344/amp.11923>
- Dong, E., Du, H., & Gardner, L. (2020). An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases*, *20*(5), 533–534. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30120-1](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30120-1)
- Dumas, A., Bernard, L., Poquet, Y., Lugo-Villarino, G., & Neyrolles, O. (2018). The role of the lung microbiota and the gut-lung axis in respiratory infectious diseases. *Cellular Microbiology*, *20*(12), e12966. <https://doi.org/10.1111/cmi.12966>
- Duvallet, C., Gibbons, S. M., Gurry, T., Irizarry, R. A., & Alm, E. J. (2017). Meta-analysis of gut microbiome studies identifies disease-specific and shared responses. *Nature Communications*, *8*(1), 1784. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01973-8>
- Ebnet, K. (2008). Organization of multiprotein complexes at cell-cell junctions. *Histochemistry and Cell Biology*, *130*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1007/s00418-008-0418-7>
- Endam, L. M., Tremblay, C., Filali, A., & Desrosiers, M. Y. (2021). INTRANASAL APPLICATION OF LACTOCOCCUS LACTIS W 136 BACTERIA EARLY IN SARS-Cov-2 INFECTION MAY HAVE A BENEFICIAL IMMUNOMODULATORY EFFECT: A PROOF-OF-CONCEPT STUDY. <https://doi.org/10.1101/2021.04.18.21255699>
- Fanos, V., Pintus, M. C., Pintus, R., & Marcialis, M. A. (2020). Lung microbiota in the acute respiratory disease: From coronavirus to metabolomics. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine*, *9*(1), e090139. <https://doi.org/10.7363/090139>
- Fantinato, V., Camargo, H. R., & Sousa, A. L. O. P. D. (2019). Probiotics study with Streptococcus salivarius and its ability to produce bacteriocins and adherence to KB cells. *Revista de Odontologia Da UNESP*, *48*, e20190029. <https://doi.org/10.1590/1807-2577.02919>

- Feng, Z., Wang, Y., & Qi, W. (2020). *The Small Intestine, an Underestimated Site of SARS-CoV-2 Infection: From Red Queen Effect to Probiotics* [Preprint]. LIFE SCIENCES. <https://doi.org/10.20944/preprints202003.0161.v1>
- Ferrario, C. M., Jessup, J., Chappell, M. C., Averill, D. B., Brosnihan, K. B., Tallant, E. A., Diz, D. I., & Gallagher, P. E. (2005). Effect of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibition and Angiotensin II Receptor Blockers on Cardiac Angiotensin-Converting Enzyme 2. *Circulation*, *111*(20), 2605–2610. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.104.510461>
- Fisher, D., & Heymann, D. (2020). Q&A: The novel coronavirus outbreak causing COVID-19. *BMC Medicine*, *18*(1), 57. <https://doi.org/10.1186/s12916-020-01533-w>
- Giacomelli, A., Pezzati, L., Conti, F., Bernacchia, D., Siano, M., Oreni, L., Rusconi, S., Gervasoni, C., Ridolfo, A. L., Rizzardini, G., Antinori, S., & Galli, M. (2020). Self-reported Olfactory and Taste Disorders in Patients With Severe Acute Respiratory Coronavirus 2 Infection: A Cross-sectional Study. *Clinical Infectious Diseases*, *71*(15), 889–890. <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa330>
- Gohil, K., Samson, R., Dastager, S., & Dharne, M. (2020). Probiotics in the prophylaxis of COVID-19: Something is better than nothing. *3 Biotech*, *11*(1), N.PAG–N.PAG. Academic Search Complete. <https://doi.org/10.1007/s13205-020-02554-1>
- Gorbalenya, A. E., Baker, S. C., Baric, R. S., De Groot, R. J., Drosten, C., Gulyaeva, A. A., Haagmans, B. L., Lauber, C., Leontovich, A. M., Neuman, B. W., Penzar, D., Perlman, S., Poon, L. L. M., Samborskiy, D. V., Sidorov, I. A., Sola, I., & Ziebuhr, J. (2020). The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: Classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. *Nature Microbiology*, *5*(4), 536–544. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0695-z>
- Gordon, S. (2008). Elie Metchnikoff: Father of natural immunity. *European Journal of Immunology*, *38*(12), 3257–3264. <https://doi.org/10.1002/eji.200838855>
- Gralinski, L. E., & Menachery, V. D. (2020). Return of the Coronavirus: 2019-nCoV. *Viruses*, *12*(2), 135. <https://doi.org/10.3390/v12020135>
- Groves, H. T., Higham, S. L., Moffatt, M. F., Cox, M. J., & Tregoning, J. S. (2020). Respiratory Viral Infection Alters the Gut Microbiota by Inducing Inappetence. *mBio*, *11*(1), e03236-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.03236-19>
- Gusev, E., Sarapultsev, A., Solomatina, L., & Chereshev, V. (2022). SARS-CoV-2-Specific Immune Response and the Pathogenesis of COVID-19. *International Journal of Molecular Sciences*, *23*(3), 1716. <https://doi.org/10.3390/ijms23031716>

- Gutiérrez–Castrellón, P., Gandara–Martí, T., Abreu Y Abreu, A. T., Nieto–Rufino, C. D., López–Orduña, E., Jiménez–Escobar, I., Jiménez–Gutiérrez, C., López–Velazquez, G., & Espadaler–Mazo, J. (2022). Probiotic improves symptomatic and viral clearance in Covid19 outpatients: A randomized, quadruple–blinded, placebo–controlled trial. *Gut Microbes*, *14*(1), 2018899–2018899. MEDLINE. <https://doi.org/10.1080/19490976.2021.2018899>
- Hardy, H., Harris, J., Lyon, E., Beal, J., & Foey, A. (2013). Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and Immunopathology. *Nutrients*, *5*(6), 1869–1912. <https://doi.org/10.3390/nu5061869>
- Harmer, D., Gilbert, M., Borman, R., & Clark, K. L. (2002). Quantitative mRNA expression profiling of ACE 2, a novel homologue of angiotensin converting enzyme. *FEBS Letters*.
- Hiippala, K., Jouhten, H., Ronkainen, A., Hartikainen, A., Kainulainen, V., Jalanka, J., & Satokari, R. (2018). The Potential of Gut Commensals in Reinforcing Intestinal Barrier Function and Alleviating Inflammation. *Nutrients*, *10*(8), 988. <https://doi.org/10.3390/nu10080988>
- Hoffmann, M., Kleine–Weber, H., Schroeder, S., Krüger, N., Herrler, T., Erichsen, S., Schiergens, T. S., Herrler, G., Wu, N.–H., Nitsche, A., Müller, M. A., Drosten, C., & Pöhlmann, S. (2020). SARS–CoV–2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, *181*(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052>
- Hofmann, H., Geier, M., Marzi, A., Krumbiegel, M., Peipp, M., Fey, G. H., Gramberg, T., & Pöhlmann, S. (2004). Susceptibility to SARS coronavirus S protein–driven infection correlates with expression of angiotensin converting enzyme 2 and infection can be blocked by soluble receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *319*(4), 1216–1221. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.05.114>
- Holmes, E. C., Goldstein, S. A., Rasmussen, A. L., Robertson, D. L., Crits–Christoph, A., Wertheim, J. O., Anthony, S. J., Barclay, W. S., Boni, M. F., Doherty, P. C., Farrar, J., Geoghegan, J. L., Jiang, X., Leibowitz, J. L., Neil, S. J. D., Skern, T., Weiss, S. R., Worobey, M., Andersen, K. G., ... Rambaut, A. (2021). The origins of SARS–CoV–2: A critical review. *Cell*, *184*(19), 4848–4856. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.08.017>
- Hróbjartsson, A., Emanuelsson, F., Skou Thomsen, A. S., Hilden, J., & Brorson, S. (2014). Bias due to lack of patient blinding in clinical trials. A systematic review of trials randomizing patients to blind and nonblind sub–studies. *International Journal of Epidemiology*, *43*(4), 1272–1283. <https://doi.org/10.1093/ije/dyu115>

- Hu, B., Guo, H., Zhou, P., & Shi, Z.-L. (2021). Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(3), 141–154. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>
- Huang, C., Wang, Y., Li, X., Ren, L., Zhao, J., Hu, Y., Zhang, L., Fan, G., Xu, J., Gu, X., Cheng, Z., Yu, T., Xia, J., Wei, Y., Wu, W., Xie, X., Yin, W., Li, H., Liu, M., ... Cao, B. (2020). Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, *395*(10223), 497–506. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5)
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M. A., Fukamizu, A., Hui, C.-C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A. S., Jiang, C., & Penninger, J. M. (2005). Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature*, *436*(7047), 112–116. <https://doi.org/10.1038/nature03712>
- Jackson, C. B., Farzan, M., Chen, B., & Choe, H. (2022). Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *23*(1), 3–20. <https://doi.org/10.1038/s41580-021-00418-x>
- Janssen, W. J., Stefanski, A. L., Bochner, B. S., & Evans, C. M. (2016). Control of lung defence by mucins and macrophages: Ancient defence mechanisms with modern functions. *European Respiratory Journal*, *48*(4), 1201–1214. <https://doi.org/10.1183/13993003.00120-2015>
- Jia, H. P., Look, D. C., Shi, L., Hickey, M., Pewe, L., Netland, J., Farzan, M., Wohlford-Lenane, C., Perlman, S., & McCray, P. B. (2005). ACE2 Receptor Expression and Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Depend on Differentiation of Human Airway Epithelia. *Journal of Virology*, *79*(23), 14614–14621. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.23.14614-14621.2005>
- Kadam, S. B., Sukhramani, G. S., Bishnoi, P., Pable, A. A., & Barvkar, V. T. (2021). SARS-CoV-2, the pandemic coronavirus: Molecular and structural insights. *Journal of Basic Microbiology*, *61*(3), 180–202. <https://doi.org/10.1002/jobm.202000537>
- Kanauchi, O., Andoh, A., AbuBakar, S., & Yamamoto, N. (2018). Probiotics and Paraprobiotics in Viral Infection: Clinical Application and Effects on the Innate and Acquired Immune Systems. *Current Pharmaceutical Design*, *24*(6), 710–717. <https://doi.org/10.2174/1381612824666180116163411>
- Karram, T., Abbasi, A., Keidar, S., Golomb, E., Hochberg, I., Winaver, J., Hoffman, A., & Abassi, Z. (2005). Effects of spironolactone and eprosartan on cardiac remodeling and angiotensin-converting enzyme isoforms in rats with experimental heart failure. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *289*(4), H1351–H1358. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01186.2004>

- Khaled, J. M. A. (2021). Probiotics, prebiotics, and COVID-19 infection: A review article. *Em Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 28, Número 1, pp. 865–869). ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2020.11.025>
- Kirtipal, N., Bharadwaj, S., & Kang, S. G. (2020). From SARS to SARS-CoV-2, insights on structure, pathogenicity and immunity aspects of pandemic human coronaviruses. *Infection, Genetics and Evolution*, 85, 104502. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104502>
- Kolesnyk, P. O., Paliy, I. H., Sydoruk, L. P., Hoda, Z. P., Ivanchenko, N. O., Lych, O. S., Huley, N. R., Matsyura, O. I., Slyuzar, Z. L., & Gerasymov, S. V. (2024). The role of nutritional support with probiotics in outpatients with symptomatic acute respiratory tract infections: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled dietary study. *BMC Nutrition*, 10(1), 4. <https://doi.org/10.1186/s40795-023-00816-8>
- Kuba, K., Imai, Y., Rao, S., Gao, H., Guo, F., Guan, B., Huan, Y., Yang, P., Zhang, Y., Deng, W., Bao, L., Zhang, B., Liu, G., Wang, Z., Chappell, M., Liu, Y., Zheng, D., Leibbrandt, A., Wada, T., ... Penninger, J. M. (2005). A crucial role of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) in SARS coronavirus–induced lung injury. *Nature Medicine*, 11(8), 875–879. <https://doi.org/10.1038/nm1267>
- Kuhn, J. H., Li, W., Choe, H., & Farzan, M. (2004). Angiotensin–converting enzyme 2: A functional receptor for SARS coronavirus. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 61(21), 2738–2743. <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4242-5>
- Lai, C.-C., Shih, T.-P., Ko, W.-C., Tang, H.-J., & Hsueh, P.-R. (2020). Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and coronavirus disease-2019 (COVID-19): The epidemic and the challenges. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 55(3), 105924. <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105924>
- Lamers, M. M., Beumer, J., Van Der Vaart, J., Knoops, K., Puschhof, J., Breugem, T. I., Ravelli, R. B. G., Paul Van Schayck, J., Mykytyn, A. Z., Duimel, H. Q., Van Donselaar, E., Riesebosch, S., Kuijpers, H. J. H., Schipper, D., Van De Wetering, W. J., De Graaf, M., Koopmans, M., Cuppen, E., Peters, P. J., ... Clevers, H. (2020). SARS-CoV-2 productively infects human gut enterocytes. *Science*, 369(6499), 50–54. <https://doi.org/10.1126/science.abc1669>
- Lasserson, T. J., Thomas, J., & Higgins, J. P. (2023). *Chapter 1: Starting a review–Cochrane Handbook*. <https://training.cochrane.org/handbook/current/chapter-01>
- Latif, A., Shehzad, A., Niazi, S., Zahid, A., Ashraf, W., Iqbal, M. W., Rehman, A., Riaz, T., Aadil, R. M., Khan, I. M., Özogul, F., Rocha, J. M., Esatbeyoglu, T., & Korma, S. A. (2023). Probiotics: Mechanism of

- action, health benefits and their application in food industries. *Frontiers in Microbiology*, *14*, 1216674. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1216674>
- Lee, J. J., Kopetz, S., Vilar, E., Shen, J. P., Chen, K., & Maitra, A. (2020). Relative Abundance of SARS-CoV-2 Entry Genes in the Enterocytes of the Lower Gastrointestinal Tract. *Genes*, *11*(645), 1–8. <https://doi.org/10.3390/genes11060645>
- Lehtoranta, L., Pitkäranta, A., & Korpela, R. (2014). Probiotics in respiratory virus infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *33*(8), 1289–1302. <https://doi.org/10.1007/s10096-014-2086-y>
- Liu, L., Wang, P., Nair, M. S., Yu, J., Rapp, M., Wang, Q., Luo, Y., Chan, J. F.-W., Sahi, V., Figueroa, A., Guo, X. V., Cerutti, G., Bimela, J., Gorman, J., Zhou, T., Chen, Z., Yuen, K.-Y., Kwong, P. D., Sodroski, J. G., ... Ho, D. D. (2020). Potent neutralizing antibodies against multiple epitopes on SARS-CoV-2 spike. *Nature*, *584*(7821), 450–456. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2571-7>
- Lukassen, S., Chua, R. L., Trefzer, T., Kahn, N. C., Schneider, M. A., Muley, T., Winter, H., Meister, M., Veith, C., Boots, A. W., Hennig, B. P., Kreuter, M., Conrad, C., & Eils, R. (2020). SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *The EMBO Journal*, *39*(10), e105114. <https://doi.org/10.15252/emboj.20105114>
- Luks, A. M., Freer, L., Grissom, C. K., McIntosh, S. E., Schoene, R. B., Swenson, E. R., & Hackett, P. H. (2020). COVID-19 Lung Injury is Not High Altitude Pulmonary Edema. *High Altitude Medicine & Biology*, *21*(2), 192–193. <https://doi.org/10.1089/ham.2020.0055>
- Mandel, M. J., Broderick, N. A., Martens, E. C., & Guillemin, K. (2019). Reports from a Healthy Community: The 7th Conference on Beneficial Microbes. *Applied and Environmental Microbiology*, *85*(10), e02562–18. <https://doi.org/10.1128/AEM.02562-18>
- Mao, L., Jin, H., Wang, M., Hu, Y., Chen, S., He, Q., Chang, J., Hong, C., Zhou, Y., Wang, D., Miao, X., Li, Y., & Hu, B. (2020). Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. *JAMA Neurology*, *77*(6), 683. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>
- Marsland, B. J., Trompette, A., & Gollwitzer, E. S. (2015). The Gut–Lung Axis in Respiratory Disease. *Annals of the American Thoracic Society*, *12*(Supplement 2), S150–S156. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201503-133AW>
- Martinez, M. A. (2020). Compounds with Therapeutic Potential against Novel Respiratory 2019 Coronavirus. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, *64*(5), e00399–20. <https://doi.org/10.1128/AAC.00399-20>

- Moeller, A. H. (2017). The shrinking human gut microbiome. *Current Opinion in Microbiology*, 38, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.04.002>
- Moher, D., Liberati, A., Tetzlaff, J., & Altman, D. (2015). Principais itens para relatar Revisões sistemáticas e Meta-análises: A recomendação PRISMA. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 24(2), 335–342. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742015000200017>
- Mukherjee, S., & Hanidziar, D. (sem data). *More of the Gut in the Lung: How Two Microbiomes Meet in ARDS*.
- Muralidar, S., Ambi, S. V., Sekaran, S., & Krishnan, U. M. (2020). The emergence of COVID-19 as a global pandemic: Understanding the epidemiology, immune response and potential therapeutic targets of SARS-CoV-2. *Biochimie*, 179, 85–100. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.09.018>
- Navarro-López, V., Hernández-Belmonte, A., Pérez Soto, M. I., Ayo-González, M., Losa-Rodríguez, G., Ros-Sánchez, E., Martínez-Gabarrón, M., Sánchez-Pellicer, P., Aguera-Santos, J., Núñez-Delegido, E., Ruzafa-Costas, B., Picó-Monllor, J. A., & Navarro-Moratalla, L. (2022). Oral intake of *Kluyveromyces marxianus* B0399 plus *Lactobacillus rhamnosus* CECT 30579 to mitigate symptoms in COVID-19 patients: A randomized open label clinical trial. *Medicine in Microecology*, 14, 100061. <https://doi.org/10.1016/j.medmic.2022.100061>
- Neish, A. S. (2014). Mucosal Immunity and the Microbiome. *Annals of the American Thoracic Society*, 11(Supplement 1), S28–S32. <https://doi.org/10.1513/AnnalsATS.201306-161MG>
- Netland, J., Meyerholz, D. K., Moore, S., Cassell, M., & Perlman, S. (2008). Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Infection Causes Neuronal Death in the Absence of Encephalitis in Mice Transgenic for Human ACE2. *Journal of Virology*, 82(15), 7264–7275. <https://doi.org/10.1128/JVI.00737-08>
- Ng, S. C., Hart, A. L., Kamm, M. A., Stagg, A. J., & Knight, S. C. (2009). Mechanisms of action of probiotics: Recent advances: *Inflammatory Bowel Diseases*, 15(2), 300–310. <https://doi.org/10.1002/ibd.20602>
- O'Dwyer, D. N., Dickson, R. P., & Moore, B. B. (2016). The Lung Microbiome, Immunity, and the Pathogenesis of Chronic Lung Disease. *The Journal of Immunology*, 196(12), 4839–4847. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600279>
- Page, M. J., McKenzie, J. E., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... Moher, D. (2021). The PRISMA 2020

statement: An updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*, n71.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.n71>

Page, M. J., Moher, D., Bossuyt, P. M., Boutron, I., Hoffmann, T. C., Mulrow, C. D., Shamseer, L., Tetzlaff, J. M., Akl, E. A., Brennan, S. E., Chou, R., Glanville, J., Grimshaw, J. M., Hróbjartsson, A., Lalu, M. M., Li, T., Loder, E. W., Mayo-Wilson, E., McDonald, S., ... McKenzie, J. E. (2021). PRISMA 2020 explanation and elaboration: Updated guidance and exemplars for reporting systematic reviews. *BMJ*, n160. <https://doi.org/10.1136/bmj.n160>

Pang, J., Wang, M. X., Ang, I. Y. H., Tan, S. H. X., Lewis, R. F., Chen, J. I.-P., Gutierrez, R. A., Gwee, S. X. W., Chua, P. E. Y., Yang, Q., Ng, X. Y., Yap, R. K. S., Tan, H. Y., Teo, Y. Y., Tan, C. C., Cook, A. R., Yap, J. C.-H., & Hsu, L. Y. (2020). Potential Rapid Diagnostics, Vaccine and Therapeutics for 2019 Novel Coronavirus (2019-nCoV): A Systematic Review. *Journal of Clinical Medicine*, 9(3), 623. <https://doi.org/10.3390/jcm9030623>

Petruzzello, C., Saviano, A., & Ojetti, V. (2023). Probiotics, the Immune Response and Acute Appendicitis: A Review. *Vaccines*, 11(7), 1170. <https://doi.org/10.3390/vaccines11071170>

Plaza-Díaz, J., Ruiz-Ojeda, F. J., Gil-Campos, M., & Gil, A. (2019). Mechanisms of Action of Probiotics. *Advances in Nutrition*, 10, S49–S66. <https://doi.org/10.1093/advances/nmy063>

Qian, Z., Travanty, E. A., Oko, L., Edeen, K., Berglund, A., Wang, J., Ito, Y., Holmes, K. V., & Mason, R. J. (2013). Innate Immune Response of Human Alveolar Type II Cells Infected with Severe Acute Respiratory Syndrome–Coronavirus. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 48(6), 742–748. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2012-03390C>

Rescigno, M. (2011). The intestinal epithelial barrier in the control of homeostasis and immunity. *Trends in Immunology*, 32(6), 256–264. <https://doi.org/10.1016/j.it.2011.04.003>

Ryan, P. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., Caplice, N. M., & Stanton, C. (2015). Sugar-coated: Exopolysaccharide producing lactic acid bacteria for food and human health applications. *Food & Function*, 6(3), 679–693. <https://doi.org/10.1039/C4FO00529E>

Ryzhakov, G., Lai, C. C., Blazek, K., To, K., Hussell, T., & Udalova, I. (2011). IL-17 Boosts Proinflammatory Outcome of Antiviral Response in Human Cells. *The Journal of Immunology*, 187(10), 5357–5362. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100917>

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mättö, J., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Probiotic bacteria: Safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*, 84(3), 197–215. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00375-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00375-8)

- Sanyal, S. (2020). How SARS-CoV-2 (COVID-19) spreads within infected hosts—What we know so far. *Emerging Topics in Life Sciences*, 4(4), 383–390. <https://doi.org/10.1042/ETLS20200165>
- Saviano, A., Potenza, A., Siciliano, V., Petruzzello, C., Tarli, C., Migneco, A., Nasella, F., Franceschi, F., & Ojetti, V. (2022). COVID-19 Pneumonia and Gut Inflammation: The Role of a Mix of Three Probiotic Strains in Reducing Inflammatory Markers and Need for Oxygen Support. *Journal of Clinical Medicine*, 11(13), 3758. <https://doi.org/10.3390/jcm11133758>
- Sayin, İ., Yaşar, K. K., & Yazici, Z. M. (2020). Taste and Smell Impairment in COVID-19: An AAO-HNS Anosmia Reporting Tool-Based Comparative Study. *Otolaryngology–Head and Neck Surgery*, 163(3), 473–479. <https://doi.org/10.1177/0194599820931820>
- Schijns, V., & Lavelle, E. C. (2020). Prevention and treatment of COVID-19 disease by controlled modulation of innate immunity. *European Journal of Immunology*, 50(7), 932–938. <https://doi.org/10.1002/eji.202048693>
- Schulz, K. F., Chalmers, I., Hayes, R., & Altman, D. (1995). Empirical evidence of bias. Dimensions of methodological quality associated with estimates of treatment effects in controlled trials. *JAMA*, 273(5), 408–412. <https://doi.org/10.1001/jama.273.5.408>
- Seow, J., Graham, C., Merrick, B., Acors, S., Pickering, S., Steel, K. J. A., Hemmings, O., O'Byrne, A., Kouphou, N., Galao, R. P., Betancor, G., Wilson, H. D., Signell, A. W., Winstone, H., Kerridge, C., Huettner, I., Jimenez-Guardeño, J. M., Lista, M. J., Temperton, N., ... Doores, K. J. (2020). Longitudinal observation and decline of neutralizing antibody responses in the three months following SARS-CoV-2 infection in humans. *Nature Microbiology*, 5(12), 1598–1607. <https://doi.org/10.1038/s41564-020-00813-8>
- Sharma, L., & Riva, A. (2020). Intestinal Barrier Function in Health and Disease—Any Role of SARS-CoV-2? In *Microorganisms* (Vol. 8, Número 11, p. 1744). MDPI. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111744>
- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Huang, B., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liu, P., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Tan, W., Wu, G., ... Bu, Z. (2020). Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and other domesticated animals to SARS-coronavirus 2. *Science*, 368(6494), 1016–1020. <https://doi.org/10.1126/science.abb7015>
- Shigemura, N., Takai, S., Hirose, F., Yoshida, R., Sanematsu, K., & Ninomiya, Y. (2019). Expression of Renin-Angiotensin System Components in the Taste Organ of Mice. *Nutrients*, 11(9), 2251. <https://doi.org/10.3390/nu11092251>

- Song, R., Chen, X., Li, B., Ni, J., Zhou, Y., Zhang, H., Liang, X., Zou, L., Liu, J., Yang, F., Li, G., Guo, X., Liu, Z., Mao, F., Lei, C., Sui, J., Li, W., & Jin, R. (2023). Nasal spray of an IgM-like ACE2 fusion protein HH-120 prevents SARS-CoV-2 infection: Two investigator-initiated postexposure prophylaxis trials. *Journal of Medical Virology*, *95*(12), e29275. <https://doi.org/10.1002/jmv.29275>
- Sonnenburg, J. L., & Sonnenburg, E. D. (2019). Vulnerability of the industrialized microbiota. *Science*, *366*(444), 1–8. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9255>
- South, A. M., Diz, D. I., & Chappell, M. C. (2020). COVID-19, ACE2, and the cardiovascular consequences. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, *318*(5), H1084–H1090. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00217.2020>
- Spencer, J., & Sollid, L. M. (2016). The human intestinal B-cell response. *Mucosal Immunology*, *9*(5), 1113–1124. <https://doi.org/10.1038/mi.2016.59>
- Sri Santosh, T., Parmar, R., Anand, H., Srikanth, K., & Saritha, M. (2020). A Review of Salivary Diagnostics and Its Potential Implication in Detection of Covid-19. *Cureus*, *12*(4):e7708, 2–10. <https://doi.org/10.7759/cureus.7708>
- Srivastav, S., Neupane, S., Bhurtel, S., Katila, N., Maharjan, S., Choi, H., Hong, J. T., & Choi, D.-Y. (2019). Probiotics mixture increases butyrate, and subsequently rescues the nigral dopaminergic neurons from MPTP and rotenone-induced neurotoxicity. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, *69*, 73–86. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2019.03.021>
- Sundararaman, A., Ray, M., Ravindra, P. V., & Halami, P. M. (2020). Role of probiotics to combat viral infections with emphasis on COVID-19. *Applied Microbiology & Biotechnology*, *104*(19), 8089–8104. Academic Search Complete.
- Thompson, B. T., Chambers, R. C., & Liu, K. D. (2017). Acute Respiratory Distress Syndrome. *New England Journal of Medicine*, *377*(6), 562–572. <https://doi.org/10.1056/NEJMr1608077>
- Tikellis, C., & Thomas, M. C. (2012). Angiotensin-Converting Enzyme 2 (ACE2) Is a Key Modulator of the Renin Angiotensin System in Health and Disease. *International Journal of Peptides*, *2012*, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/256294>
- Trougakos, I. P., Stamatelopoulos, K., Terpos, E., Tsitsilonis, O. E., Aivalioti, E., Paraskevis, D., Kastritis, E., Pavlakis, G. N., & Dimopoulos, M. A. (2021). Insights to SARS-CoV-2 life cycle, pathophysiology, and rationalized treatments that target COVID-19 clinical complications. *Journal of Biomedical Science*, *28*(1), 9. <https://doi.org/10.1186/s12929-020-00703-5>
- Tufanaru, C., Munn, Z., Aromataris, E., Campbell, J., & Hopp, L. (2020). *Critical Appraisal Tools, JBI. Systematic Reviews of Effectiveness*. <https://jbi.global/critical-appraisal-tools>

- Vaira, L. A., Deiana, G., Fois, A. G., Pirina, P., Madeddu, G., De Vito, A., Babudieri, S., Petrocelli, M., Serra, A., Bussu, F., Ligas, E., Salzano, G., & De Riu, G. (2020). Objective evaluation of anosmia and ageusia in COVID-19 patients: A single-center experience on 72 cases. *Head & Neck*, *42*(6), 1252–1258. <https://doi.org/10.1002/hed.26204>
- Vancamelbeke, M., & Vermeire, S. (2017). The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, *11*(9), 821–834. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1343143>
- Velavan, T. P., & Meyer, C. G. (2020). The COVID-19 epidemic. *Tropical Medicine & International Health*, *25*(3), 278–280. <https://doi.org/10.1111/tmi.13383>
- Wang, D., Hu, B., Hu, C., Zhu, F., Liu, X., Zhang, J., Wang, B., Xiang, H., Cheng, Z., Xiong, Y., Zhao, Y., Li, Y., Wang, X., & Peng, Z. (2020). Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*, *323*(11), 1061. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.1585>
- Wang, H., Wang, H., Sun, Y., Ren, Z., Zhu, W., Li, A., & Cui, G. (2021). Potential Associations Between Microbiome and COVID-19. *Em Frontiers in Medicine* (Vol. 8, p. 785496). FRONTIERS MEDIA SA. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.785496>
- Wang, M.-Y., Zhao, R., Gao, L.-J., Gao, X.-F., Wang, D.-P., & Cao, J.-M. (2020). SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *10*, 587269. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.587269>
- Wang, X.-L., Iwanami, J., Min, L.-J., Tsukuda, K., Nakaoka, H., Bai, H.-Y., Shan, B.-S., Kan-no, H., Kukida, M., Chisaka, T., Yamauchi, T., Higaki, A., Mogi, M., & Horiuchi, M. (2016). Deficiency of angiotensin-converting enzyme 2 causes deterioration of cognitive function. *Npj Aging and Mechanisms of Disease*, *2*(1), 16024. <https://doi.org/10.1038/npjamd.2016.24>
- Wang, Huaqui, Wang, Yunfei, Lu, Chunya, Qiu, Lingxiao, Song, Xiangjin, Jia, Hongxia, Cui, Dong, & Zhang, Guojun. (2021). The efficacy of probiotics in patients with severe COVID-19. *Annals of Palliative Medicine*, *10*(12), 12374–12380. <https://doi.org/10.21037/apm-21-3373>
- Williams, E., Bond, K., Zhang, B., Putland, M., & Williamson, D. A. (2020). Saliva as a Noninvasive Specimen for Detection of SARS-CoV-2. *Journal of Clinical Microbiology*, *58*(8), e00776–20. <https://doi.org/10.1128/JCM.00776-20>
- Wilson, M. T., & Hamilos, D. L. (2014). The Nasal and Sinus Microbiome in Health and Disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, *14*(12), 485. <https://doi.org/10.1007/s11882-014-0485-x>

- Wong, S. K., Li, W., Moore, M. J., Choe, H., & Farzan, M. (2004). A 193-Amino Acid Fragment of the SARS Coronavirus S Protein Efficiently Binds Angiotensin-converting Enzyme 2. *Journal of Biological Chemistry*, *279*(5), 3197–3201. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300520200>
- World Health Organization. (2020, março 11). *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report -51*. <https://www.who.int/publications/m/item/situation-report---51>
- Wu, C., Liu, Y., Yang, Y., Zhang, P., Zhong, W., Wang, Y., Wang, Q., Xu, Y., Li, M., Li, X., Zheng, M., Chen, L., & Li, H. (2020). Analysis of therapeutic targets for SARS-CoV-2 and discovery of potential drugs by computational methods. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, *10*(5), 766–788. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2020.02.008>
- Wu, F., Zhao, S., Yu, B., Chen, Y.-M., Wang, W., Song, Z.-G., Hu, Y., Tao, Z.-W., Tian, J.-H., Pei, Y.-Y., Yuan, M.-L., Zhang, Y.-L., Dai, F.-H., Liu, Y., Wang, Q.-M., Zheng, J.-J., Xu, L., Holmes, E. C., & Zhang, Y.-Z. (2020). A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature*, *579*(7798), 265–269. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2008-3>
- Wu, Y., Wang, F., Shen, C., Peng, W., Li, D., Zhao, C., Li, Z., Li, S., Bi, Y., Yang, Y., Gong, Y., Xiao, H., Fan, Z., Tan, S., Wu, G., Tan, W., Lu, X., Fan, C., Wang, Q., ... Liu, L. (2020). A noncompeting pair of human neutralizing antibodies block COVID-19 virus binding to its receptor ACE2. *Science*, *368*(1274–1278), 1–5.
- Wu, Z., & McGoogan, J. M. (2020). Characteristics of and Important Lessons From the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Outbreak in China: Summary of a Report of 72 314 Cases From the Chinese Center for Disease Control and Prevention. *JAMA*, *323*(13), 1239. <https://doi.org/10.1001/jama.2020.2648>
- Xavier-Santos, D., Padilha, M., Fabiano, G. A., Vinderola, G., Gomes Cruz, A., Sivieri, K., & Costa Antunes, A. E. (2022). Evidences and perspectives of the use of probiotics, prebiotics, synbiotics, and postbiotics as adjuvants for prevention and treatment of COVID-19: A bibliometric analysis and systematic review. *Trends in Food Science & Technology*, *120*, 174–192. Academic Search Complete.
- Xia, H., & Lazartigues, E. (2008). Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: Properties and future directions. *Journal of Neurochemistry*, *107*(6), 1482–1494. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05723.x>
- Xia, H., Sriramula, S., Chhabra, K. H., & Lazartigues, E. (2013). Brain Angiotensin-Converting Enzyme Type 2 Shedding Contributes to the Development of Neurogenic Hypertension. *Circulation Research*, *113*(9), 1087–1096. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.301811>

- Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., Li, T., & Chen, Q. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International Journal of Oral Science*, *12*(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
- Xu, Z., Shi, L., Wang, Y., Zhang, J., Huang, L., Zhang, C., Liu, S., Zhao, P., Liu, H., Zhu, L., Tai, Y., Bai, C., Gao, T., Song, J., Xia, P., Dong, J., Zhao, J., & Wang, F.-S. (2020). Pathological findings of COVID-19 associated with acute respiratory distress syndrome. *The Lancet Respiratory Medicine*, *8*(4), 420–422. [https://doi.org/10.1016/S2213-2600\(20\)30076-X](https://doi.org/10.1016/S2213-2600(20)30076-X)
- Yang, H., & Rao, Z. (2021). Structural biology of SARS-CoV-2 and implications for therapeutic development. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(11), 685–700. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00630-8>
- Zang, R., Castro, M. F. G., McCune, B. T., Zeng, Q., Rothlauf, P. W., Sonnek, N. M., Liu, Z., Brulois, K. F., Wang, X., Greenberg, H. B., Diamond, M. S., Ciorba, M. A., Whelan, S. P. J., & Ding, S. (2020). TMPRSS2 and TMPRSS4 promote SARS-CoV-2 infection of human small intestinal enterocytes. *Science Immunology*, *5*(47), eabc3582. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc3582>
- Zhang, H., Li, H.-B., Lyu, J.-R., Lei, X.-M., Li, W., Wu, G., Lyu, J., & Dai, Z.-M. (2020). Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *International Journal of Infectious Diseases*, *96*, 19–24. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.04.027>
- Zhang, L., Han, H., Li, X., Chen, C., Xie, X., Su, G., Ye, S., Wang, C., He, Q., Wang, F., Huang, F., Wang, Z., Wu, J., & Lai, T. (2021). Probiotics use is associated with improved clinical outcomes among hospitalized patients with COVID-19. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, *14*, 1–9. Academic Search Complete. <https://doi.org/10.1177/17562848211035670>
- Zhao, X., Jiang, Y., Zhao, Y., Xi, H., Liu, C., Qu, F., & Feng, X. (2020). Analysis of the susceptibility to COVID-19 in pregnancy and recommendations on potential drug screening. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, *39*(7), 1209–1220. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03897-6>
- Zhao, Y., Zhao, Z., Wang, Y., Zhou, Y., Ma, Y., & Zuo, W. (2020). Single-Cell RNA Expression Profiling of ACE2, the Receptor of SARS-CoV-2. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, *202*(5), 756–759.
- Zhou, P., Yang, X.-L., Wang, X.-G., Hu, B., Zhang, L., Zhang, W., Si, H.-R., Zhu, Y., Li, B., Huang, C.-L., Chen, H.-D., Chen, J., Luo, Y., Guo, H., Jiang, R.-D., Liu, M.-Q., Chen, Y., Shen, X.-R., Wang, X., ... Shi, Z.-L.

(2020). A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 579(7798), 270–273. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7>

Zhu, N., Zhang, D., Wang, W., Li, X., Yang, B., Song, J., Zhao, X., Huang, B., Shi, W., Lu, R., Niu, P., Zhan, F., Ma, X., Wang, D., Xu, W., Wu, G., Gao, G. F., & Tan, W. (2020). A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *New England Journal of Medicine*, 382(8), 727–733. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001017>

## Anexos

### Anexo 1 PRISMA 2020 Lista de Verificação

Secção e Tópico	Item #	Verificação do item	Local onde o item está descrito
<b>TÍTULO</b>			
Título	1	Identifica a publicação como uma revisão sistemática.	Capa
<b>RESUMO</b>			
Resumo	2	Ver a lista de verificação PRISMA 2020 para Resumos.	Anexo 2
<b>INTRODUÇÃO</b>			
Fundamentação	3	Fundamenta a revisão no contexto do conhecimento existente.	Pág.1a 30
Objetivos	4	Apresenta explicitamente o(s) objetivo(s) ou questão(ões) respeitantes à revisão.	Pág.30
<b>MÉTODOS</b>			
Crítérios de elegibilidade	5	Especifica os critérios de inclusão e exclusão para a revisão e forma como os estudos foram agrupados para as sínteses.	Pág.34
Fontes de informação	6	Especifica todas as bases de dados, registos, websites, organizações, listas de referências e outras fontes pesquisadas ou consultadas para identificação dos estudos. Especifica a última data em que cada fonte foi pesquisada ou consultada.	Pág.33
Estratégia de pesquisa	7	Apresenta as estratégias de pesquisa completas para todas as bases de dados, registos e websites, incluindo todos os filtros e limites utilizados.	Pág.32 e 33
Processo de seleção	8	Especifica os métodos utilizados para decidir se um estudo satisfaz os critérios de inclusão da revisão, incluindo quantos revisores fizeram a triagem de cada registo e publicação selecionada, se trabalharam de uma forma independente e, se aplicável, os detalhes de ferramentas de automatização utilizadas no processo.	Pág.35
Processo de recolha de dados	9	Especifica os métodos utilizados para recolha de dados das publicações, incluindo quantos revisores recolheram a informação de cada publicação, se trabalharam de uma forma independente, todos os processos de obtenção ou confirmação de dados por parte dos investigadores do estudo e, se aplicável, detalhes de ferramentas de automatização utilizadas.	Pág.34
Dados dos itens	10a	Lista e define todos os resultados para os quais os dados foram pesquisados. Especifica se foram pesquisados todos os resultados compatíveis com cada domínio em cada estudo (p ex. para todas as medidas, momentos, análises) e, se não, especifica os métodos utilizados para decidir quais resultados a recolher.	Pág.34
	10b	Lista e define todas as outras variáveis para as quais os dados foram pesquisados (p. ex. características dos participantes e intervenções, fontes de financiamento). Descreve os pressupostos utilizados sobre informação em falta ou pouco clara.	Pág.34
Avaliação do risco de viés nos estudos	11	Especifica os métodos utilizados para avaliar o risco de viés dos estudos incluídos, incluindo detalhes sobre o(s) instrumento(s) utilizado(s), quantos revisores avaliaram cada estudo e se trabalharam de forma independente e ainda, se aplicável, detalhes de ferramentas de automatização utilizadas no processo.	Pág.34
Medidas de efeito	12	Especifica para cada resultado a(s) medida(s) de efeito (p. ex. risco relativo e diferença de média) utilizada(s) na síntese ou apresentação dos resultados.	Pág.35

Secção e Tópico	Item #	Verificação do item	Local onde o item está descrito
Método de síntese	13a	Descreve os processos utilizados para decidir os estudos elegíveis para cada síntese (p. ex. apresentar as características da intervenção apresentada no estudo e comparar com os grupos planeados para cada síntese (item #5)).	NA
	13b	Descreve quaisquer métodos necessários de preparação de dados para apresentação ou síntese, tais como lidar com os dados em falta no resumo da estatística, ou conversões de dados.	NA
	13c	Descreve quaisquer os métodos utilizados para apresentar ou exibir os resultados individuais de estudos e sínteses.	Pág.34
	13d	Descreve quaisquer métodos utilizados para resumir os resultados e fornece uma justificação para a(s) escolha(s). Se foi realizada uma meta-análise, Descreve o(s) modelo(s) e método(s) para identificar a presença e extensão da heterogeneidade estatística, e de software utilizado(s).	Pág.34
	13e	Descreve quaisquer métodos utilizados para explorar possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados do estudo (p. ex. análise de subgrupos, meta-regressão).	NA
	13f	Descreve quaisquer análises de sensibilidade realizadas para avaliar a robustez a síntese dos resultados.	NA
Avaliação do viés reportado	14	Descreve quaisquer métodos utilizados para avaliar o risco de viés devido à falta de resultados numa síntese (decorrente de viés de informação).	Pág.36
Avaliação do grau de confiança	15	Descreve quaisquer métodos utilizados para avaliar a certeza (ou confiança) no corpo de evidência de um resultado.	NA
<b>RESULTADOS</b>			
Seleção dos estudos	16a	Descreve os resultados do processo de pesquisa e seleção, desde o número de registos identificados na pesquisa até ao número de estudos incluídos na revisão, idealmente utilizando um fluxograma.	Pág.35
	16b	Cita estudos que parecem satisfazer os critérios de inclusão, mas que foram excluídos, e explica as razões da exclusão.	Pág.52, 53 e 54
Características dos estudos	17	Cita cada estudo incluído e apresenta as suas características.	Pág.37,38 e 39
Risco de viés nos estudos	18	Apresenta a avaliação de risco de viés para cada estudo incluído.	Pág.36
Resultados individuais dos estudos	19	Para todos os resultados de cada estudo, apresenta: (a) resumo da estatística para cada grupo (quando apropriado) e (b) uma estimativa do efeito e a sua precisão (p. ex. intervalo de confiança/credibilidade), utilizando idealmente tabelas ou gráficos estruturados.	Pág.46,47,48 e 49
Resultados das sínteses	20a	Para cada síntese, resumo das características e risco de viés entre os estudos selecionados.	Pág.37 a 41; Pág.43; Pág.46 a 49
	20b	Apresenta os resultados de todas as sínteses estatísticas realizadas. Se foi feita uma meta-análise, apresenta para cada resultado o resumo da estimativa e a sua precisão (p. ex. intervalo de confiança/credibilidade) e medidas de heterogeneidade estatística. Se forem comparados grupos, descreve a direção do efeito.	Pág.37 a 41; Pág.43; Pág.46 a 49
	20c	Apresenta os resultados de todas as investigações de possíveis causas de heterogeneidade entre os resultados do estudo.	NA
	20d	Apresenta resultados de todas as análises de sensibilidade realizadas para avaliar a robustez dos resultados sintetizados.	NA

Secção e Tópico	Item #	Verificação do item	Local onde o item está descrito
Vieses reportados	21	Apresenta a avaliação do risco de viés devido à falta de resultados (resultantes de viés de informação) para cada síntese avaliada.	Pág.36
Nível de significância	22	Apresenta a avaliação de certeza (ou confiança) no corpo de evidência para cada resultado avaliado.	NA
<b>DISCUSSÃO</b>			
Discussão	23a	Fornecer uma interpretação geral dos resultados no contexto de outra evidência.	Pág.50 a 55
	23b	Discute quaisquer as limitações da evidência, incluídas na revisão.	Pág.54 a 55
	23c	Discute quaisquer as limitações dos processos de revisão utilizados.	Pág.55
	23d	Discute as implicações dos resultados para a prática, política e investigação futura.	Pág.55
<b>OUTRAS INFORMAÇÕES</b>			
Registo do protocolo	24a	Fornecer informação sobre o registo da revisão, incluindo o nome e número de registo, ou refere que a revisão não está registada.	-
	24b	Indica local de acesso ao protocolo da revisão, ou refere que o protocolo não foi preparado.	-
	24c	Descreve e explica quaisquer as alterações à informação fornecida no registo ou no protocolo.	NA
Apoios	25	Descreve as fontes de financiamento ou apoio sem financiamento que suportam a revisão, e o papel dos financiadores ou patrocinadores da revisão.	NA
Conflito de interesses	26	Declara todos os conflitos de interesses dos autores da revisão.	NA
Disponibilidade dos dados, códigos e outros materiais	27	Reporta quais dos seguintes materiais estão acessíveis publicamente e onde podem ser encontrados: modelo de formulários de recolha de dados extraídos dos estudos incluídos, dados utilizados para análise; código analítico, qualquer outro material utilizado na revisão.	NA

Legenda: Pág.: Página; NA: Não Aplicável

## Anexo 2 PRISMA 2020 para resumos

Secção ou Tópico	Item #	Item da lista de verificação	Mencionado (Sim/Não)
<b>TÍTULO</b>			
Título	1	Identifica o documento como revisão sistemática.	Sim
<b>BACKGROUND</b>			
Objetivos	2	Fornecer uma declaração específica do(s) objetivo(s) ou questão(ões) principal(ais) abordada(s) pela revisão.	Sim
<b>MÉTODOS</b>			
Crítérios de elegibilidade	3	Especifica os critérios de inclusão e exclusão da revisão.	Sim
Fontes de informação	4	Especifica as fontes de informação (por exemplo, bases de dados, registos) utilizadas para identificar os estudos e a última data em que foram feitas as buscas.	Sim
Risco de viés	5	Especifica os métodos utilizados para avaliar o risco de viés nos estudos incluídos.	Não
Síntese dos resultados	6	Especifica os métodos utilizados para apresentar e sintetizar os resultados.	Não
<b>RESULTADOS</b>			
Estudos incluídos	7	Indica o número total de estudos e participantes incluídos e sumariza as características relevantes dos estudos.	Sim
Síntese dos resultados	8	Apresenta resultados para os principais efeitos, indicando preferencialmente o número de estudos e participantes incluídos para cada um. Se efetuada meta-análise menciona a estimativa sumária e o intervalo de confiança/credibilidade. Se compara grupos indica a direção do efeito (ou seja, que grupo é favorecido).	Sim
<b>DISCUSSÃO</b>			
Limitações da evidência	9	Fornecer um breve sumário das limitações da evidência incluída na revisão (por exemplo, estudo do risco de viés, inconsistência e imprecisão).	Sim
Interpretação	10	Fornecer uma interpretação geral dos resultados e implicações importantes.	Sim
<b>OUTROS</b>			
Financiamento	11	Especifica a principal fonte de financiamento para a revisão.	Não
Registo	12	Indica o nome e número de registo.	Não