

A redução da atividade da fosfatase alcalina intestinal está associada à severidade da COVID-19

THAINÁ LOUREIRO SERAFIM

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo
na Faculdade de Ciências Médicas | NOVA Medical School da Universidade NOVA de Lisboa

Julho, 2021

**A REDUÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFATASE ALCALINA INTESTINAL ESTÁ ASSOCIADA À
SEVERIDADE DA COVID-19**

Thainá Loureiro Serafim

Orientador: João Ricardo Diniz de Araújo, Professor Auxiliar Convidado da Faculdade de Ciências Médicas |

NOVA Medical School da Universidade NOVA de Lisboa

Orientadora: Diana Marina da Silva Teixeira, Professora Auxiliar Convidada da Faculdade de Ciências Médicas |

NOVA Medical School da Universidade NOVA de Lisboa

Dissertação para obtenção do grau de Mestre em Nutrição Humana e Metabolismo

Julho, 2021

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, Professor João Ricardo Diniz de Araújo e Professora Diana Marina da Silva Teixeira, pelos seus sábios conselhos e ensinamentos e por toda dedicação e disponibilidade. Agradeço pela constante motivação que me ajudou a chegar até aqui.

A todo corpo docente da NOVA Medical School / Universidade NOVA de Lisboa, que transmitiu todo conhecimento necessário para minha formação. Agradeço também pelo apoio prestado sempre que necessário.

Ao meu pai e irmão, que compreenderam minha ausência e que mesmo distantes não deixaram faltar amor, carinho e cuidado. Obrigada por acreditarem em mim e me incentivarem a progredir. Em especial, à minha mãe. Que com certeza me acompanha e torce por mim de algum lugar. Suas vibrações em perfeita harmonia me fazem sempre seguir em frente.

Aos familiares e amigos, por estarem comigo, pelas palavras de conforto e cuidado. Obrigada por tornarem este caminho menos difícil e alegre. O incentivo constante de vocês me ajudou a chegar até aqui.

O estudo foi promovido pela NOVA Medical School, Universidade NOVA de Lisboa e financiado pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia (projeto nº 268_596883842) e BIOCDEX. Nenhuma das entidades teve influência na recolha, análise e interpretação de dados ou na redação da dissertação.

ABREVIATURAS

AGCC - ácidos gordos de cadeia curta

a.r - abundância relativa

DGS - Direção-Geral da Saúde

ECA - enzima de conversão da angiotensina 2

FA - fosfatase alcalina

FAI - fosfatase alcalina intestinal

IC - intervalo de confiança

IMC - Índice de Massa Corporal

LPS - lipopolissacarídeo

MERS-CoV - *Coronavirus* da síndrome respiratória do Médio-Oriente

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAMPs - padrões moleculares associados a agentes patogénicos

PCR - proteína C reativa

pNP - paranitrofenol

TLR - receptores *toll-like*

ÍNDICE

Abstract	1
Resumo	2
Introdução	3
Objetivo	6
Metodologia	7
Desenho do estudo e população	7
Recolha de dados	7
Recolha de fezes	8
Microbiota intestinal	8
Deteção do SARS-CoV-2 nas fezes	8
Atividade da fosfatase alcalina	9
Doseamento de proteínas	9
Análise estatística	10
Resultados	11
Características clínicas dos doentes COVID-19	11
Atividade da FA em doentes COVID-19	11
Correlações entre FA e parâmetros clínicos ou da microbiota intestinal	13
Análise de regressão linear multivariada: influência de parâmetros clínicos ou da microbiota na atividade da FA	16
Discussão	19

Conclusão	23
Referências	24

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Atividade da fosfatase alcalina (FA) nas amostras de fezes de doentes COVID-19. (1A) Atividade total da FA fecal de doentes COVID-19 ligeiros a moderados (n=53) e doentes COVID-19 severos (n=57). (1B) Contribuição da isoforma intestinal para a atividade da FA fecal de doentes COVID-19 ligeiros a moderados (n=6) e doentes COVID-19 severos (n=6). *p <0,05 (Mann-Whitney)

Figura 2. Atividade total da FA fecal em doentes COVID-19 negativos (n=66) e doentes COVID-19 positivos (n=44) para o SARS-CoV-2 nas fezes. *p <0,05 (Mann-Whitney)

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre a atividade da fosfatase alcalina (FA) e parâmetros clínicos de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos.

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre atividade da fosfatase alcalina (FA) e os parâmetros da microbiota de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos.

Tabela 3. Análise de regressão linear multivariada usando a atividade da fosfatase alcalina (FA) como variável dependente e os parâmetros clínicos como variáveis independentes ou preditoras.

Tabela 4. Análise de regressão linear multivariada usando a atividade da fosfatase alcalina (FA) como variável dependente e os parâmetros da microbiota como variáveis independentes ou preditoras.

ABSTRACT

COVID-19 has been associated with gastrointestinal disorders, dysbiosis, and inflammation. Intestinal alkaline phosphatase (IAP) plays an important role in intestinal homeostasis and the decreasing of its activity and expression has been associated with inflammation, increased dysbiosis and intestinal permeability. Thus, the aim of this study is to assess the IAP activity in COVID-19 patients with different degrees of severity, and to determine the influence of clinical parameters and gut microbiota on the enzymatic activity of these patients. One hundred and ten COVID-19 patients, from six geographically different Portuguese regions, were classified as mild, moderate and severe. The results have shown that severe COVID-19 patients had lower IAP activity compared to mild and moderate patients. Female gender, diabetes, antibiotherapy in the prior six months and low bacterial microbiota diversity were associated with lower activity in severe COVID-19 patients. In conclusion, this work suggests that the decrease in IAP activity seems to contribute to the severity of COVID-19.

Keywords: COVID-19, intestinal alkaline phosphatase activity, comorbidities, microbiota, severity.

RESUMO

A COVID-19 tem sido associada a alterações gastrointestinais, disbiose e inflamação. A fosfatase alcalina intestinal (FAI) desempenha um papel importante na homeostasia intestinal e a diminuição da sua atividade e expressão têm sido associadas a inflamação, disbiose e aumento de permeabilidade intestinal. Tendo isto em consideração, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade da FAI em doentes COVID-19 com diferentes graus de severidade, e determinar a influência de parâmetros clínicos e da microbiota na atividade enzimática destes doentes. Cento e dez doentes COVID-19 provenientes de seis centros portugueses geograficamente diferentes foram classificados como ligeiros a moderados e severos. Os resultados mostraram que doentes COVID-19 severos apresentavam menor atividade da FAI comparativamente aos doentes ligeiros a moderados. O sexo feminino, a presença de diabetes, a antibioterapia nos 6 meses anteriores e a baixa diversidade da microbiota bacteriana estavam associados a menor atividade da FAI em doentes COVID-19 severos. Em conclusão, este trabalho sugere que a diminuição da atividade da FAI parece contribuir para a severidade da COVID-19.

Palavras chaves: COVID-19, atividade da fosfatase alcalina intestinal, comorbilidades, microbiota, severidade.

INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, a cidade chinesa de Wuhan tornou-se o epicentro de um surto de uma doença respiratória aguda de etiologia desconhecida (Wang *et al.*, 2020). Devido à sua gravidade, as autoridades de saúde chinesas começaram de imediato uma investigação a fim de caracterizar e controlar essa doença, tendo identificado o novo *Coronavírus* SARS-CoV-2 como sendo o seu agente etiológico infeccioso (Mizrahi *et al.*, 2020). Desde então, a transmissão do SARS-CoV-2 foi-se rapidamente alastrando pelo mundo e em março 2020, a Organização Mundial da Saúde (OMS) decretou o estado de pandemia (WHO, 2020). Até junho de 2021, mais de 183 milhões de pessoas já foram diagnosticadas com a doença causada pelo SARS-CoV-2 (COVID-19) e 4 milhões de mortes em mais de 200 países foram contabilizadas, originando uma grave crise de saúde global (WHO, 2021).

A COVID-19 pode ser transmitida por duas vias principais: 1) contato direto com uma pessoa infectada ou superfície contaminada, e 2) exposição a gotículas respiratórias que contêm o SARS-CoV-2 (*The Lancet Respiratory Medicine*, 2020). Os sintomas clínicos são inespecíficos, podendo variar desde casos assintomáticos até pneumonia grave e morte (Fu *et al.*, 2020). Com base nos casos confirmados de COVID-19, os sintomas típicos desenvolvem-se em média 5-6 dias após a infecção e incluem febre (temperatura $\geq 38,0^{\circ}\text{C}$) sem outra causa atribuível; tosse de novo, ou agravamento do padrão habitual, ou associada a dores de cabeça ou dores generalizadas do corpo; dificuldade respiratória/dispneia, sem outra causa atribuível; perda total ou parcial do olfato (anosmia), enfraquecimento do paladar (ageusia) ou perturbação ou diminuição do paladar (disgeusia) de início súbito (DGS, 2021).

De acordo com os dados internacionais, aproximadamente 80% dos doentes apresentam doença ligeira a moderada, 13,8% doença severa e 6,1% um estado clínico crítico (WHO, 2020). Os indivíduos em maior risco de desenvolver doença severa e morte incluem pessoas com mais de 60 anos e/ou com comorbilidades associadas, nomeadamente doenças respiratórias, hipertensão arterial, diabetes, obesidade e cancro (McFee, 2020).

Comparativamente a outros vírus pertencentes ao género *Coronavirus*, como por exemplo o SARS-CoV-1 identificado na China em 2003 (Ksiazek *et al.*, 2003) e o *Coronavirus* da síndrome respiratória do Médio-Oriente (MERS-CoV) identificado em 2012 no Médio-Oriente (de Groot *et al.*, 2013), o SARS-CoV-2 parece ter uma transmissibilidade mais elevada entre humanos

(Jiang *et al.*, 2020). Apesar disso, os três têm aparentemente uma capacidade semelhante para induzir um processo inflamatório exuberante no endotélio vascular pulmonar, através da estimulação da secreção de citocinas e quimiocinas e ativação de células imunes como linfócitos T e B, monócitos e macrófagos (Jiang *et al.*, 2020). O principal alvo celular (ou receptor) descrito para o SARS-CoV-2 no Homem, é a enzima de conversão da angiotensina 2 (ECA2) (Zhou *et al.*, 2020). Apesar da expressão proteica da ECA2 ser ubíqua, esta encontra-se maioritariamente presente nas células epiteliais alveolares do pulmão, células endoteliais arteriais e venosas e células epiteliais do intestino delgado e cólon (McFee, 2020; Tay *et al.*, 2020). A COVID-19 tem sido associada a uma redução da expressão proteica da ECA2 nestes epitélios (Tay *et al.*, 2020; Penninger *et al.*, 2021). Considerando que nas células epiteliais do intestino, a ECA2 é importante na regulação da expressão de peptídeos antimicrobianos e na modulação da microbiota intestinal e resposta imunológica inata (Cole-Jeffrey *et al.*, 2015; Perlot e Penninger, 2013), a redução da sua expressão intestinal parece aumentar a suscetibilidade do intestino à inflamação, disbiose e permeabilidade epitelial (Viana *et al.*, 2020). Além disso, a colonização do epitélio intestinal pelo SARS-CoV-2 está associada a danos celulares, lesão e inflamação (Trottein e Sokol, 2020), contribuindo ainda mais para as alterações da homeostasia intestinal associadas à COVID-19.

Além da ECA2, a fosfatase alcalina (FA) é também uma enzima largamente expressa nas células epiteliais intestinais (Kühn *et al.*, 2020). Esta consiste numa glicoproteína dimérica ligada às membranas celulares, possuindo como co-fatores necessários para a sua atividade enzimática os iões Zn^{2+} e Mg^{2+} (Kim e Wyckoff, 1991). A FA catalisa fundamentalmente reações de hidrólise de vários ésteres de monofosfato com libertação de um fosfato inorgânico (Millán, 2006). Nos humanos, são conhecidas 4 isoformas diferentes da FA: tecidual não-específica (expressa em quase todos os tecidos, mas mais abundante no fígado, osso e rim), placentária, células germinativas, e intestinal (FAI) (Sharma e Prasad, 2014). Alguns métodos bioquímicos são utilizados para identificar e quantificar estas isoformas nomeadamente estudos de termoestabilidade, estudos de inibição por peptídeos e aminoácidos (por exemplo a L-fenilalanina é um inibidor específico da FAI) (Ghosh e Fishman, 1966) e métodos imunológicos (Sharma e Prasad, 2014).

A FAI é uma enzima expressa na superfície apical das microvilosidades dos enterócitos, sendo secretada em baixa concentração para a corrente sanguínea e lúmen intestinal (Geddes e

Philpott, 2008). Esta enzima desempenha um papel muito importante na manutenção da homeostasia intestinal, nomeadamente na secreção de bicarbonato, controlo do pH, absorção de ácidos gordos de cadeia longa, e redução da inflamação intestinal através da inativação de padrões moleculares associados a patógenos (*pathogen-associated molecular patterns*) existentes no lúmen intestinal como o lipopolissacarídeo (LPS) e ligandos para receptores *toll-like* (TLR) (Fawley e Gourlay, 2016). A FAI tem sido particularmente implicada na inativação do LPS, uma molécula pró-inflamatória presente na parede celular das bactérias gram-negativas e constituída por três partes: polissacarídeo ou antigénio O, cadeia oligossacarídica e lípido A (Oliveira e Reygaert, 2021). Este último, permite a ligação do LPS aos TLR4 desencadeando uma resposta inflamatória através por exemplo da estimulação da libertação de citocinas pró-inflamatórias (Poltorak *et al.*, 1998). Em contrapartida, a remoção de um dos dois grupos fosfatos (desfosforilação) existentes no lípido A atenua o processo inflamatório induzido pelo LPS (Kaliannan *et al.*, 2013; Fawley e Gourlay, 2016) e, além disso, promove a função de barreira intestinal provavelmente através do aumento da expressão das proteínas de junção existentes das células epiteliais intestinais (Kühn *et al.*, 2020; Liu *et al.*, 2016). Como tal, uma diminuição da atividade da FAI tem sido associada a um aumento da permeabilidade do epitélio intestinal e a um aumento da concentração de LPS circulante.

A microbiota intestinal humana, particularmente a existente no cólon, é predominantemente constituída pelos filos Firmicutes, Bacteroidetes, Actinobacteria e Verrucomicrobia. Quanto aos géneros microbianos, os mais abundantes são os *Bacteroides*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Clostridium*, *Lactobacillus* e *Ruminococcus*; enquanto os menos abundantes incluem *Escherichia*, *Salmonella* e *Campylobacter* (Montalto *et al.*, 2009; Thursby e Juge, 2017). A microbiota, particularmente os microrganismos simbióticos, que estabelecem uma relação de simbiose com o hospedeiro havendo benefício para ambos (Malard *et al.*, 2021), desempenham importantes funções na manutenção da homeostasia intestinal. Em particular, são importantes na: 1) síntese de ácidos gordos de cadeia curta (AGCC) como o butirato, a principal fonte de energia para as células epiteliais intestinais, o propionato, e o acetato, 2) promoção da integridade da barreira intestinal, 3) modulação da resposta imunológica, 4) proteção contra infeções por microrganismos patogénicos, e 5) síntese de ácidos biliares e vitaminas, como a B₁₂ e a K (Jandhyala *et al.*, 2015). Além disso, o hospedeiro fornece nutrientes, pH, e concentrações de oxigénio adequadas à microbiota

(Leser e Mølbaek, 2009). Dada a importância da microbiota intestinal na saúde do hospedeiro, alterações da sua composição (disbiose) - como redução da diversidade bacteriana, menor abundância de bactérias simbióticas produtoras de butirato, e aumento da abundância de bactérias patogênicas promotoras de inflamação (Donati Zeppa *et al.*, 2020) - têm sido associadas a patologias inflamatórias como a doença inflamatória intestinal, obesidade, diabetes e hipertensão arterial (DeGruttola *et al.*, 2016).

Um estudo realizado em doentes COVID-19 (Moreira-Rosario *et al.*, 2021), mostrou que o perfil da microbiota intestinal se correlacionou com a severidade clínica da doença, nomeadamente que doentes mais severos apresentaram maior abundância de bactérias patogênicas associadas a bacteremia (por exemplo *Staphylococcus epidermidis*) nas fezes em comparação com doentes menos severos. Pelo contrário, diversidade bacteriana (medida pelo Índice de Shannon) e a abundância de *Bifidobacterium* e bactérias produtoras de butirato do género *Roseburia* diminuíram nas fezes de doentes COVID-19 mais severos em comparação com os menos severos. Além disso, a probabilidade de doentes mais severos terem concentrações plasmáticas de proteína C reativa (PCR), um importante marcador inflamatório sistémico (Nehring *et al.*, 2021), $\geq 96,8$ mg/L foi 3,45 vezes maior do que em doentes menos severos.

Considerando a importância da FA na redução da inflamação e na manutenção da função de barreira intestinal, e que doentes COVID-19 mais severos apresentam disbiose intestinal e maior inflamação sistémica, levantamos a hipótese de que estes últimos teriam uma diminuição da atividade da FAI. Além de avaliar a atividade da FAI em doentes COVID-19 com diferentes graus de severidade, foi também nosso objetivo determinar a influência de parâmetros clínicos e da microbiota na atividade da FAI desses doentes.

METODOLOGIA:

Desenho do estudo e população

O estudo foi aprovado pelas Comissões de Ética dos Centros participantes, considerando-o um trabalho de investigação de risco mínimo usando dados recolhidos para a prática clínica de rotina e dispensaram a obrigatoriedade de obtenção de consentimento informado. Os doentes (ou os seus familiares) receberam informações sobre o estudo e foram informados sobre o direito de se recusarem a participar. O estudo foi registado no *ClinicalTrials.gov* - NCT04355741. Este estudo transversal multicêntrico foi realizado em seis centros portugueses geograficamente diferentes (regiões Norte e Centro). Com um total de 115 doentes, a sua distribuição por cada centro foi de 38 para o Centro Universitário São João (33,0%), 33 para o Hospital São Sebastião, Centro Hospitalar entre Douro e Vouga (28,7%), 18 para o Hospital São Francisco Xavier, Centro Hospitalar Lisboa Ocidental (15,7%), 12 para o Hospital Curry Cabral, Centro Hospitalar Universitário Lisboa Central (10,4%), 8 de Instituições de acolhimento de Terceira Idade (7,0%) e 6 para o Hospital CUF Infante Santo (5,2%). Os critérios de elegibilidade dos doentes incluíram idade igual ou superior a 18 anos e um teste positivo para SARS-CoV-2 por zaragatoa nasofaríngea usando a técnica *Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) realizado em laboratórios de referência nacionais e de acordo com as recomendações da Direção-Geral da Saúde (DGS, 2020). Os doentes diagnosticados com COVID-19 foram recrutados entre 21 de abril e 1 de julho de 2020, durante primeira vaga da COVID-19 em Portugal, e o tamanho da amostra foi determinado com base na viabilidade de recrutamento durante esse período. Os centros participantes recolheram os dados dos doentes incluídos no estudo e classificaram-nos de acordo com a gravidade da doença usando a Escala Ordinal de Progressão Clínica da OMS (assintomático/ligeira, moderada e severa) (WHO, 2020).

Recolha de dados

As características demográficas dos doentes, hábitos tabágicos, co-morbididades antes da hospitalização (diabetes e obesidade ou excesso de peso), e exposição a antibióticos 6 meses

antes do diagnóstico da COVID-19 foram registados para todos os doentes imediatamente após o seu recrutamento. Posteriormente foi recolhida a concentração de PCR.

Recolha de fezes

As amostras de fezes de doentes com COVID-19 foram obtidas após o seu recrutamento, utilizando um kit de colheita de fezes (EasySampler, ALPCO) contendo RNAlater (Sigma-Aldrich). Em seguida, o SARS-CoV-2 foi inativado utilizando *Triton X-100* a 5% (Sigma-Aldrich), tal como descrito por Roberts e colaboradores (Roberts, 2008), e as amostras fecais foram mantidas a -80°C até ao dia da experiência.

Microbiota intestinal

O DNA genómico foi extraído e purificado das amostras de fezes usando o *NZY Tissue gDNA Isolation Kit* (NZYTech). Para cada amostra, a diversidade alfa e a abundância relativa de espécies bacterianas patogénicas e comensais foram obtidas após a sequenciação do gene *16S rRNA* usando o *Ion 16STM Metagenomics Kit* (Thermo Fisher Scientific) e *Ion Xpress™ Barcode Adapters Kits*, de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos resultados de sequenciação da microbiota intestinal foram previamente publicados por Moreira-Rosario e colaboradores (Moreira-Rosario *et al.*, 2021).

Deteção do SARS-CoV-2 nas fezes

Para a deteção do SARS-CoV-2 nas fezes foram realizadas as seguintes etapas: 1) extração de RNA total das fezes através do sistema *NucliSENS easyMAG* baseado na técnica *Boom* que utiliza partículas magnéticas de sílica a partir de 200-300 mg de fezes e 2) deteção do RNA de SARS-CoV-2 extraído utilizando o teste *EURORealTime SARS-CoV-2*. O último é baseado na transcrição reversa para converter RNA viral em DNA complementar, seguido de amplificação por PCR e deteção em tempo real baseado em fluorescência de duas seções definidas dentro dos genes ORF1ab e N do SARS-CoV-2. A transcrição reversa, amplificação e deteção do cDNA do SARS-CoV-2 foram realizadas utilizando *primers* e sondas específicas para o SARS-CoV-2.

Atividade da fosfatase alcalina

Para cada amostra, preparou-se um homogeneizado utilizando 1 mg de fezes por 50 μ L de solução amortecedora de diluição (MgCl_2 1 mM, Tris HCl 10 mM, pH=8). Após homogeneização vigorosa, os homogeneizados foram centrifugados 10000 $\times$ g durante 20 minutos a 4°C e recolheu-se 1550 μ L de sobrenadante aos quais foram adicionados 1550 μ L de solução amortecedora de ensaio (MgCl_2 1 mM, Tris base 200 mM, pH=10.4). Posteriormente, o homogeneizado diluído foi agitado rapidamente e utilizado na determinação da atividade da FA total e intestinal e da concentração total de proteínas (em duplicado).

Após manter 990 μ L de homogeneizado diluído a 37°C durante 10 minutos, adicionou-se 10 μ L de paranitrofenilfosfato 5 mM. Decorridos 5 minutos de incubação, a reação enzimática foi terminada adicionando de 5 mL de NaOH 0,2 M. Em seguida, os homogeneizados foram mantidos 10 minutos a 4°C, e 15 minutos à temperatura ambiente antes da leitura espectrofotométrica. A absorvância do paranitrofenol (pNP) gerado após hidrólise do paranitrofenilfosfato pela FA foi medida a 410 nm utilizando um espectrofotômetro de feixe duplo UV/Vis. Para a determinação da atividade da FAI, foi realizada uma pré-incubação de 20 minutos com o inibidor específico da FAI, a L-fenilalanina 30 mM, antes da incubação de 5 minutos com paranitrofenilfosfato. A atividade da fosfatase alcalina foi expressa em nmol de pNP/min/g proteína, após construção de uma curva de calibração usando concentrações conhecidas de pNP.

Doseamento de proteínas

A concentração de proteínas presente nos homogeneizados diluídos usados na determinação da atividade da fosfatase alcalina, foi determinada usando o kit *EZQ Protein Quantitation* (R33200, Molecular Prober [™], Invitrogen) de acordo com as instruções do fabricante. De forma resumida, colocou-se 1 μ L de cada amostra (em duplicado) numa membrana de ensaio. Depois de secar ao ar, a membrana foi imersa em metanol durante 5 minutos com agitação suave, e posteriormente seca com ar quente durante 1 minuto. Seguidamente, a membrana de ensaio foi imersa em reagente EZQ[®] (Componente A) com agitação suave durante 30

minutos. Após esse período, a membrana foi lavada 3 vezes durante 1 minuto com solução de metanol a 10% e ácido acético a 7%. Após secagem, a fluorescência presente na membrana foi determinada num leitor de microplacas utilizando um comprimento de onda de emissão/absorção de 450/618 nm. Para o cálculo da concentração de proteínas presentes na amostra construiu-se uma curva de calibração usando concentrações conhecidas de ovalbumina.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o GraphPad Prism® v9. Para avaliar o significado estatístico da diferença da atividade da FA entre dois grupos, usou-se o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. Os resultados da atividade enzimática foram apresentados na forma de medianas e respectivos intervalo de confiança (IC) a 95%. Com o objetivo de quantificar a direção e a intensidade com que duas variáveis estão relacionadas, foram feitas correlações entre a atividade da FA e os parâmetros clínicos ou de microbiota usando os coeficientes de correlação de Pearson ou Spearman para variáveis contínuas com distribuição normal ou não normal, respectivamente, e o coeficiente de correlação ponto bisserial para variáveis categóricas binárias. A análise de regressão multivariada foi usada para identificar e estimar quais as variáveis preditivas (independentes) de natureza clínica e da microbiota capazes de prever a atividade da FA (variável dependente) nos doentes diagnosticados com COVID-19. Os valores das estimativas com IC a 95% foram considerados estatisticamente significativo quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas dos doentes COVID-19

As características clínicas dos doentes COVID-19 foram previamente publicadas (Moreira-Rosario *et al.*, 2021). Em resumo, um total de 115 doentes COVID-19 (63,5% homens, mediana de idades de 68 anos e mediana das concentrações plasmática de PCR de 72 mg/dL) foram incluídos neste estudo. Em relação às comorbilidades, mais de metade dos doentes (69 [65,7%]) apresentavam excesso de peso ou obesidade e 45 diabetes (42,1%). Em relação à exposição a antibióticos, 42 doentes (38,9%) tomaram antibióticos pelo menos uma vez durante os 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19. De acordo com a gravidade de doença definida pela Escala de Progressão Clínica da OMS (WHO, 2020), 53 doentes foram classificados como ligeiros a moderados (pontuação de 1-5) e 57 como severos (pontuação de 6-9).

Atividade da FA em doentes COVID-19

Determinou-se a atividade da FA nas fezes de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e severos (**figura 1A**). A atividade da FA nos doentes severos foi cerca de 40% inferior comparativamente à atividade da FA nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados (mediana de 120,6 e IC a 95% de [227,6 – 500,7] nmol PNP/min/g proteína nos doentes COVID-19 severos; e mediana de 202,8 e IC a 95% de [289,3 – 518,2] nmol PNP/min/g proteína nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados) (**figura 1A**). Com o objetivo de identificar a principal isoforma da FA presente nas fezes dos doentes COVID-19, determinou-se a atividade da FA na presença de L-fenilalanina, um inibidor específico da FAI (Ghosh e Fishman, 1966), numa subamostra aleatória de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos (**figura 1B**). Os resultados evidenciaram que a L-fenilalanina inibiu mais de 80% da atividade da FA tanto nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados como nos doentes COVID-19 severos, não havendo diferença entre eles (**figura 1B**). Este resultado indica que a isoforma intestinal é provavelmente a responsável pela quase totalidade da atividade fosfatásica alcalina presente nas fezes de doentes COVID-19, independentemente da severidade da doença.

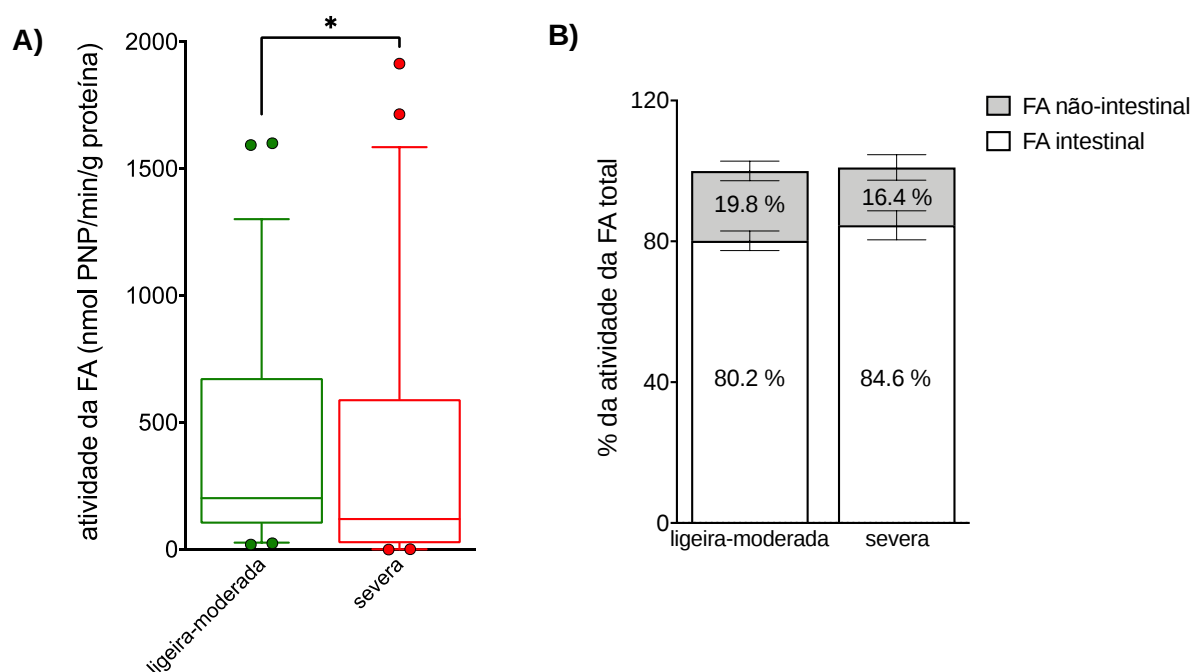


Figura 1. Atividade da fosfatase alcalina (FA) nas amostras de fezes de doentes COVID-19. (1A) Atividade total da FA fecal de doentes COVID-19 ligeiros a moderados (n=53) e doentes COVID-19 severos (n=57). (1B) Contribuição da isoforma intestinal para a atividade da FA fecal de doentes COVID-19 ligeiros a moderados (n=6) e doentes COVID-19 severos (n=6). *p <0,05 (Mann-Whitney)

Considerando que o SARS-CoV-2 foi detetado nas fezes de 44 dos 110 doentes COVID-19, e estando descrito que a ECA2 é largamente expressa nas células epiteliais intestinais (Penninger *et al.*, 2021), avaliou-se se a presença do SARS-CoV-2 nas fezes dos doentes COVID-19 estaria associada a uma alteração da atividade total da FA fecal (**figura 2**). Apesar da atividade da FA ser tendencialmente mais baixa nos doentes positivos para presença do vírus nas fezes comparativamente aos doentes negativos, este resultado não foi estatisticamente significativo (mediana de 158,8 e IC a 95% [159,0 – 324,5] nmol PNP/min/g proteína nos doentes positivos para o SARS-CoV-2 nas fezes e mediana 193,4 e IC a 95% [338,2 – 649,6] nmol PNP/min/g proteína nos doentes negativos para o SARS-CoV-2 nas fezes; p=0,06). (**figura 2**). Como tal, a presença do vírus nas fezes não parece influenciar a atividade da FA.

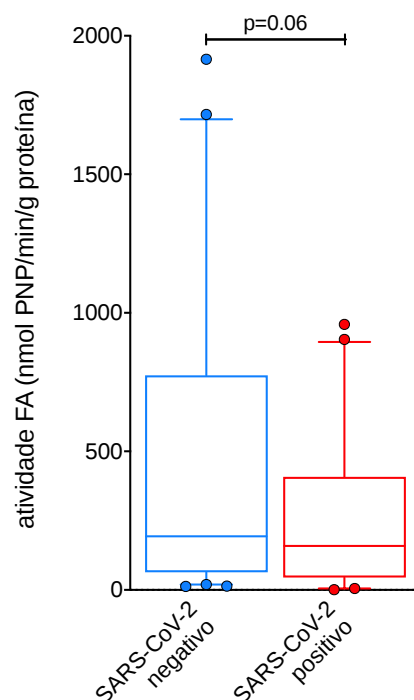


Figura 2. Atividade total da FA fecal em doentes COVID-19 negativos (n=66) e doentes COVID-19 positivos (n=44) para o SARS-CoV-2 nas fezes. *p <0,05 (Mann-Whitney)

Correlações entre FA e parâmetros clínicos ou da microbiota intestinal

Através de uma análise de correlação, determinou-se a direção e a intensidade das associações entre a atividade total da FA fecal e os parâmetros clínicos de doentes COVID-19 (idade, género, concentração plasmática de PCR, comorbilidades e antibioterapia) (**tabela 1**). Nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados a atividade da FA correlacionou-se negativamente com a idade, enquanto nos doentes COVID-19 severos não se observou uma correlação significativa (**tabela 1**). Contudo, neste último grupo de doentes a atividade da FA correlacionou-se positivamente com o sexo masculino (**tabela 1**). Relativamente à concentração plasmática de PCR, observou-se uma correlação negativa entre este parâmetro e a atividade da FA nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados, enquanto nos doentes COVID-19 severos não se observou uma correlação significativa (**tabela 1**). As comorbilidades excesso de peso ou obesidade e diabetes correlacionaram-se de maneira distinta com a atividade da FA. Enquanto a primeira correlacionou-se positivamente nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados, a segunda correlacionou-se negativamente nos doentes COVID-19

severos (**tabela 1**). No que diz respeito à antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19, este foi o parâmetro clínico que mais fortemente se correlacionou com a atividade da FA nos doentes COVID-19 (**tabela 1**). Quer nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados quer nos doentes COVID-19 severos, a atividade da FA correlacionou-se negativamente com a antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19 (**tabela 1**). No seu conjunto, estes resultados sugerem que nos doentes COVID-19 severos a atividade da FA diminui com o fato de estes serem mulheres, terem diabetes e terem feito antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19. Quanto aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados, a atividade da FA aumentou quanto menor a sua idade e concentração plasmática de PCR e com o fato de terem excesso peso ou obesidade e de não terem feito antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19

Tabela 1. Coeficientes de correlação entre a atividade da fosfatase alcalina (FA) e parâmetros clínicos de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos.

Parâmetros Clínicos	Correlação com a atividade da FA		
	Doentes Ligeiros a moderados	Doentes Severos	Todos os doentes
Idade	-0,401**	-0,151	-0,254**
Sexo masculino	0,066	0,275*	0,174
Proteína C reativa	-0,345*	-0,006	-0,094
Excesso de peso ou Obesidade	0,406*	0,097	0,211*
Diabetes	-0,097	-0,369*	-0,228*
Antibioterapia (últimos 6 meses)	-0,425**	-0,276*	-0,292**

Para variáveis categóricas binárias (sexo, excesso de peso ou obesidade, diabetes e antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19) é mostrado o coeficiente de correlação ponto bisserial. Para variáveis contínuas sem distribuição normal (idade e proteína C reativa), é mostrado o coeficiente de correlação de Spearman. *p < 0,05; **p < 0,01.

Resultados previamente publicados nesta população (Moreira-Rosario *et al.*, 2021) mostraram que os doentes COVID-19 mais severos apresentavam importantes alterações na composição da microbiota fecal, nomeadamente: a) redução da diversidade bacteriana

(índice de Shannon), b) aumento da abundância de espécies bacterianas patogénicas como *S. epidermidis* e *Citrobacter freundii*, e c) redução da abundância de espécies bacterianas simbióticas particularmente *Bifidobacterium brevis*, *Roseburia faecis*, *Coprococcus eutactus* e *Thermoanaerobacterium saccharolyticum*. Como tal, determinou-se a associação entre cada um destes parâmetros e a atividade total da FA fecal nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos (**tabela 2**). Nos doentes COVID-19 severos a atividade da FA correlacionou-se positivamente com o índice de diversidade de Shannon, enquanto nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados não se observou uma correlação estatisticamente significativa (**tabela 2**). Relativamente à abundância relativa de espécies bacterianas, o *B. brevis* foi o único que se correlacionou significativamente (e de forma negativa) com a atividade da FA nos doentes COVID-19 ligeiros a moderados (**tabela 2**). Relativamente à abundância relativa de *C. eutactus* e *R. faecis*, constatou-se que houve uma correlação negativa entres estes dois parâmetros (particularmente o segundo) e a atividade da FA nos doentes COVID-19 severos. Ainda neste grupo de doentes, constatou-se que a abundância relativa de *C. freundii* se correlacionou positivamente com a atividade da FA (**tabela 2**). A abundância relativa de *T. saccharolyticum* e *S. epidermidis* não se correlacionou com a atividade da FA nos doentes COVID-19 severos (**tabela 2**). No seu conjunto, estes resultados sugerem que nos doentes COVID-19 severos a atividade da FA diminuía quanto menor a diversidade bacteriana e a abundância relativa de *C. freundii* e quanto maior a abundância relativa de *C. eutactus* e *R. faecis*. Quanto aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados, a atividade da FA aumentava quanto menor a abundância de *B. brevis*.

Tabela 2. Coeficientes de correlação entre atividade da fosfatase alcalina (FA) e os parâmetros da microbiota de doentes COVID-19 ligeiros a moderados e doentes COVID-19 severos

Parâmetros da microbiota	Correlação com atividade da FA		
	Doentes ligeiros a moderados	Doentes severos	Todos os doentes
Índice de diversidade Shannon	0,185	0,306*	0,203*
<i>B. brevis</i> a.r.	-0,506***	-0,162	-0,301*
<i>C. eutactus</i> a.r.	0,016	-0,287**	-0,062
<i>R. faecis</i> a.r.	0,127	-0,481***	-0,198*
<i>T. saccharolyticum</i> a.r.	0,090	-0,093	0,037
<i>C. freundii</i> a.r.	-0,140	0,4516***	0,227*
<i>S. epidermidis</i> a.r.	-0,001	0,069	0,008

Para variáveis normalmente distribuídas (índice de diversidade de Shannon) é mostrado o coeficiente de correlação de Pearson. Para variáveis não normalmente distribuídas (abundâncias relativas das bactérias) é mostrado o coeficiente de correlação de Spearman. *p < 0,05; **p < 0,01 ***p < 0,001. a.r.: abundância relativa.

Análise de regressão linear multivariada: influência de parâmetros clínicos ou da microbiota na atividade da FA

No sentido de prever a influência simultânea de diferentes parâmetros clínicos na atividade total da FA fecal dos doentes COVID-19, realizou-se uma análise de regressão linear multivariada (**tabela 3**). Os resultados dessa análise previram que a atividade da FA diminuiria em média 154 nmol/min/g proteína nos doentes COVID-19 severos (comparativamente aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados) após ajuste para o sexo, a concentração plasmática de PCR, a presença de diabetes e a antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19 (**tabela 3**). Curiosamente, além da severidade, os resultados da análise de regressão mostraram também que a atividade da FA poderia ser prevista pelo sexo, diabetes e antibioterapia, mas não pela concentração plasmática da PCR (**tabela 3**).

Tabela 3. Análise de regressão linear multivariada usando a atividade da fosfatase alcalina (FA) como variável dependente e os parâmetros clínicos como variáveis independentes ou preditoras.

Variáveis preditoras	Estimativa	IC a 95%	Valor de p	Qualidade do ajustamento
Severidade da doença	-153,7	-292,1 a -15,3	0,030	R ² = 0,37 (ponderada)
Sexo masculino	227,0	94,3 a 359,8	0,001	
Proteína C reativa	-0,101	-0,257 a 0,054	0,199	
Diabetes	80,0	33,1 a 127,0	0,001	
Antibioterapia (últimos 6 meses)	-283,1	-502,4 a -63,9	0,012	

IC: Intervalo de confiança

No sentido de prever a influência simultânea de parâmetros da microbiota na atividade da FA dos doentes COVID-19, realizou-se uma segunda análise de regressão linear multivariada (**tabela 4**). Os resultados dessa análise previram que a atividade da FA aumentaria em média 240 nmol/min/g proteína por cada aumento de uma unidade do índice de Shannon nos doentes COVID-19, após ajuste para antibioterapia nos 6 meses anteriores e abundância relativa de *B. brevis*, *C. eutactus* e *S. epidermidis* (**tabela 4**). Além da diversidade bacteriana, os resultados da análise de regressão mostraram também que a atividade da FA poderia ser prevista pela antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19 e pela abundância de *B. brevis*, *C. eutactus*, e *S. epidermidis* (**tabela 4**). Curiosamente, a antibioterapia nos 6 meses anteriores foi capaz de prever a atividade da FA nas duas análises de regressão realizadas, demonstrando a grande influência deste parâmetro na atividade da FA de doentes COVID-19. De facto, a atividade da FA diminuiria em média 270-280 nmol/min/g proteína em doentes COVID-19 que fizeram antibioterapia nos 6 meses anteriores (comparativamente aos que não fizeram) após o ajuste para parâmetros clínicos (severidade da COVID-19, sexo, PCR plasmática e presença de diabetes) (**tabela 3**) e de microbiota (índice de Shannon e abundância de *B. brevis*, *C. eutactus* e *S. Epidermidis*) (**tabela 4**). No seu conjunto, estes resultados sugerem que a atividade da FA nos doentes COVID-19 pode ser prevista não só pela severidade da doença, mas também pela antibioterapia nos 6 meses anteriores ao diagnóstico da COVID-19 e pela diversidade e abundância de certas espécies bacterianas da microbiota.

Tabela 4. Análise de regressão linear multivariada usando a atividade da fosfatase alcalina (FA) como variável dependente e os parâmetros da microbiota como variáveis independentes ou preditoras.

Variáveis preditoras	Estimativa	IC a 95%	Valor de p	Qualidade do ajuste
Antibioterapia (últimos 6 meses)	-270,7	-376,5 a -164,9	0,0001	R ² = 0,45 (ponderada)
Índice de Shannon	240,3	88,7 a 391,9	0,002	
A.r de <i>B. Brevis</i> .	-108767	-142419 a -75114	0,0001	
A.r de <i>C. eutactus</i>	-38401	-60703 a -16100	0,0009	
A.r de <i>S. epidermidis</i>	-1302	-1669 a -935	0,0001	

A.r.: abundância relativa

DISCUSSÃO

A nível intestinal, dois importantes fatores têm sido associados à severidade da COVID-19: a disbiose, isto é, redução da diversidade bacteriana e da abundância de bactérias simbióticas produtoras de butirato (Moreira-Rosario *et al.*, 2021) e a inflamação caracterizada por elevadas concentrações fecais de calprotectina (Effenberger *et al.*, 2020). Considerando o papel da FAI na inativação de moléculas pró-inflamatória de origem bacteriana, como o LPS (Lallès, 2019), e que a redução da sua atividade está associada a inflamação, disbiose (Kaliannan *et al.*, 2013) e redução da integridade do epitélio intestinal (Malo *et al.*, 2014; Okazaki e Katayama, 2019), colocou-se a hipótese de que a atividade da FAI estaria diminuída em doentes COVID-19 severos. Para confirmar esta hipótese, determinou-se a atividade da FA nas fezes de doentes COVID-19 classificados como 1) ligeiros a moderados e 2) severos, de acordo com a escala de progressão clínica da OMS (WHO, 2020). Os resultados do presente estudo mostraram pela primeira vez que a atividade de FAI está diminuída em cerca de 40% em doentes COVID-19 severos comparativamente aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados. Utilizando um modelo de regressão múltipla, prevê-se que a atividade da FAI diminua em média 154 nmol/min/g proteína nos doentes COVID-19 severos comparativamente aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados após ajuste para o sexo, concentração plasmática de PCR, presença de diabetes e antibioterapia nos 6 meses anteriores. Apesar da FAI ser a principal isoforma da FA presente nas fezes dos doentes COVID-19 (cerca de 80%), não podemos excluir uma contribuição, ainda que reduzida (inferior a 20%), da FA de origem bacteriana expressa por exemplo em bactérias do género *Staphylococcus* (Gwynne *et al.*, 2021) e *Escherichia* (Zhang *et al.*, 2020). Além disso, considerando a reduzida expressão da FA tecidual não-específica no epitélio intestinal (Malo, 2015), é pouco provável que esta isoforma contribua para atividade da FA nas fezes dos doentes COVID-19.

O presente estudo foi, até ao momento, o único que avaliou a atividade da FAI em doentes COVID-19. Estudos previamente publicados nestes doentes (Cai *et al.*, 2020; Hajifathalian *et al.*, 2020; Kumar *et al.*, 2020) avaliaram apenas a atividade da FA sérica, que reflete maioritariamente a atividade da isoforma tecidual não-específica de origem hepática (Sharma e Prasad, 2014). Os resultados desses estudos mostraram que a atividade da FA sérica não se alterou (Hajifathalian *et al.*, 2020; Cai *et al.*, 2020) ou foi superior (Kumar *et al.*, 2020) em

doentes COVID-19 severos comparativamente aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados. Esta diferença encontrada na concentração da FA sérica, poderá ser explicada pelo fato da inflamação associada a lesão hepática induzida pela infeção por SARS-CoV-2 (e o consequente aumento da atividade da FA sérica) ocorrer apenas em 15-30% dos doentes COVID-19 (Cai *et al.*, 2020). Além disso, a classificação dos doentes COVID-19 e os critérios de elegibilidade nestes estudos foram diferentes, podendo justificar a diferença dos resultados. Apesar da dificuldade em comparar estes resultados com os nossos, devido às isoformas e aos tecidos onde a atividade da FA foi determinada serem distintos, a inflamação parece ser o mecanismo comum subjacente à alteração (aumento ou diminuição) da atividade da FA tecidual não-específica e FAI em doentes COVID-19 severos. De acordo com o referido, já foi comprovado que estes doentes apresentam um aumento acentuado dos marcadores de inflamação quer hepática (Kumar *et al.*, 2020; Cichoż-Lach e Michalak, 2021) quer intestinal (Trottein e Sokol, 2020; Effenberger *et al.*, 2020).

A diabetes e a obesidade são considerados dois importantes fatores de risco para o desenvolvimento de um quadro clínico mais severo da COVID-19 (Zhou *et al.*, 2020; Kompaniyets *et al.*, 2020). Através de uma análise de correlação, os resultados deste estudo mostram que em doentes COVID-19 severos a diabetes se correlaciona com menor atividade da FAI. Num estudo conduzido por Borzouei e colaboradores (Borzouei *et al.*, 2021), o aumento da atividade da FA sérica em doentes COVID-19 diabéticos estava associado a lesão hepática e maior severidade da COVID-19. No seu conjunto, estes dados sugerem que a atividade da FA intestinal ou sérica pode eventualmente ser usada como um marcador de severidade da COVID-19. Relativamente ao excesso de peso ou obesidade, os nossos resultados não mostram uma correlação entre estas duas comorbilidades e a atividade da FAI em doentes COVID-19 severos. Uma possível explicação para este resultado, reside no facto dos doentes não terem sido estratificados, de acordo com o IMC (WHO, 2000), em doentes com excesso de peso (IMC de 25 a 30 Kg/m²) e obesidade (IMC superior a 30 Kg/m²), pois o valor de IMC não constava nos registos clínicos. Como tal, a existência de doentes COVID-19 severos com uma grande amplitude de valores de IMC poderá ter ocultado uma eventual correlação entre obesidade e atividade da FAI nestes doentes. Com efeito, já foi reportado que o aumento da atividade da FA sérica em doentes COVID-19 com obesidade estava associado a esteatose hepática e maior severidade da COVID-19 (Sharma e Kumar, 2020).

Os resultados deste estudo mostram também que ser mulher está correlacionado com menor atividade da FAI no grupo de indivíduos com maior severidade de doença. Curiosamente, esta diferença de género foi também observada para a atividade da FA sérica em doentes COVID-19 severos e com lesão hepática (Sharma e Kumar, 2020). A razão para esta diferença na atividade da FA de acordo com o sexo, pode dever-se às maiores concentrações plasmáticas de estrogénios normalmente encontradas nas mulheres (Brocklehurst e Wilde, 1984).

Independentemente da severidade da COVID-19, os nossos resultados evidenciam que a antibioterapia nos 6 meses anteriores estava associada a uma menor atividade da FAI. Utilizando um modelo de regressão linear multivariada prevê-se que a atividade da FAI diminua em média 283 nmol/min/g proteína nos doentes COVID-19 que fizeram antibioterapia, comparativamente aos que não fizeram, após ajuste para a severidade da doença, o sexo, a concentração de PCR e a presença de diabetes. Os antibióticos modulam de forma distinta a atividade da FAI. Enquanto por exemplo a amoxicilina foi descrita como inibidora, a neomicina foi descrita como estimuladora da atividade da FAI (Geddes e Philpott, 2008; Lallès, 2019). Uma limitação do nosso estudo foi o fato das classes de antibióticos usadas pelos doentes COVID-19 não constarem nos registos clínicos. No entanto, entre os doentes COVID-19 que faziam antibioterapia, sugere-se que tenham consumido essencialmente antibióticos com capacidade inibidora da FAI, devido a diminuição da atividade da FAI observada.

Moreira-Rosário e colaboradores (Moreira-Rosario *et al.*, 2021) previamente demonstraram que nos indivíduos considerados neste estudo, a severidade da COVID-19 estava associada a disbiose intestinal após ajuste para a antibioterapia, nomeadamente: menor diversidade bacteriana global, menor abundância de bactérias simbióticas produtoras de butirato como *Roseburia faecis* e *Coprococcus eutactus*, e maior abundância de bactérias patogénicas promotoras de inflamação como *Citrobacter freundii*. Neste estudo subsequente, observou-se que nos doentes COVID-19 severos a diminuição da atividade da FAI se associa a menor diversidade bacteriana. Além disso, a diminuição da atividade da FAI associa-se a menor abundância da bactéria LPS-positiva *C. freundii* e a uma maior abundância de bactérias produtoras de butirato. Devido ao papel da FAI na desfosforilação, e consequente inativação de moléculas pró-inflamatórias intestinais, como o LPS, a diminuição da sua atividade e expressão tem sido associada a uma maior colonização intestinal por bactérias patogénicas,

como a *S. Typhimurium* e *C. difficile* (Alam *et al.*, 2014), e menor colonização por diversas bactérias simbióticas, como *Bifidobacterium* (Kaliannan *et al.*, 2015; Malo *et al.*, 2014; Lallès, 2019). À exceção da diversidade, os resultados deste estudo não corroboram os estudos previamente publicados. Uma eventual explicação para esta discrepância é o facto de a antibioterapia interferir com a FAI e a sua capacidade para regular a abundância de espécies bacterianas constituintes da microbiota (Bilski *et al.*, 2017). De facto, além da antibioterapia correlacionar-se negativamente com a atividade da FAI, prevê-se que esta última diminua em média 271 nmol/min/g proteína em doentes COVID-19 que fazem antibioterapia (comparativamente aos que não fazem) após ajuste para a diversidade bacteriana e abundância de bactérias simbióticas e patogénicas. Os mecanismos fisiopatológicos subjacentes à diminuição da atividade da FAI encontrada nos doentes COVID-19 severos permanecem ainda desconhecidos. Contudo, é provável que a redução da atividade da FAI, eventualmente exacerbada pela antibioterapia, aumente a inflamação intestinal bem como a permeabilidade e a translocação de moléculas inflamatórias, como o LPS, do lúmen intestinal para a circulação sistémica, contribuindo assim para a severidade da COVID-19 (Gueddes e Philpott, 2008; Kaliannan *et al.*, 2013; Bilski *et al.*, 2017). Para uma melhor compreensão destes mecanismos, seria relevante quantificar o LPS nas fezes e marcadores de lesão do epitélio intestinal, nomeadamente a citrulina, a proteína de ligação aos ácidos gordos e a claudina-3 no plasma (Habes *et al.*, 2017) de doentes COVID-19.

CONCLUSÃO

Este trabalho revelou pela primeira vez que a atividade da FAI está alterada em doentes COVID-19, nomeadamente naqueles que apresentam maior gravidade de doença. Comparativamente aos doentes COVID-19 ligeiros a moderados, verificou-se que a atividade da FAI diminui nos doentes COVID-19 severos, e que essa diminuição estava associada ao consumo de antibióticos, presença de diabetes, e disbiose intestinal. Como tal, a atividade da FAI pode eventualmente contribuir para a severidade da COVID-19. Tendo isto em consideração, intervenções terapêuticas que aumentem a atividade da FA, como suplementos de FA (Kaliannan *et al.*, 2013) e prebióticos (Okazaki e Katayama, 2019) ou probióticos (Parada Venegas *et al.*, 2019) produtores de butirato, um reconhecido ativador da FA (Melo *et al.*, 2016), podem ser úteis nestes doentes. Além de estimularem a atividade da FAI, estas intervenções podem ter também a vantagem de atenuar a disbiose (Moreira-Rosario *et al.*, 2021) e a inflamação (Effenberger *et al.*, 2020) intestinais associadas à severidade da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- Alam, S. N., Yamine, H., Moaven, O., Ahmed, R., Moss, A. K., Biswas, B., Muhammad, N., Biswas, R., Raychowdhury, A., Kaliannan, K., Ghosh, S., Ray, M., Hamarneh, S. R., Barua, S., Malo, N. S., Bhan, A. K., Malo, M. S., & Hodin, R. A. (2014). Intestinal alkaline phosphatase prevents antibiotic-induced susceptibility to enteric pathogens. *Annals of surgery*, 259(4), 715–722.
- Bilski, J., Mazur-Bialy, A., Wojcik, D., Zahradnik-Bilska, J., Brzozowski, B., Magierowski, M., Mach, T., Magierowska, K., & Brzozowski, T. (2017). The Role of Intestinal Alkaline Phosphatase in Inflammatory Disorders of Gastrointestinal Tract. *Mediators of inflammation*, 2017, 9074601.
- Borzouei, S., Mohammadian-Khoshnoud, M., Omid, T., Bashirian, S., Bahreini, F., Heidarimoghadam, R., & Khazaei, S. (2021). Predictors of COVID-19 related death in diabetes patients: A case-control study in Iran. *Diabetes & metabolic syndrome*, 15(4), 102149. Advance online publication.
- Brocklehurst, D., & Wilde, C. E. (1984). Evidence for the hormonal regulation of the multimolecular forms of serum alkaline phosphatase. *Progress in clinical and biological research*, 166, 277–288.
- Cai, Q., Huang, D., Yu, H., Zhu, Z., Xia, Z., Su, Y., Li, Z., Zhou, G., Gou, J., Qu, J., Sun, Y., Liu, Y., He, Q., Chen, J., Liu, L., & Xu, L. (2020). COVID-19: Abnormal liver function tests. *Journal of hepatology*, 73(3), 566–574.
- Cichoż-Lach, H., & Michalak, A. (2021). Liver injury in the era of COVID-19. *World journal of gastroenterology*, 27(5), 377–390.
- Cole-Jeffrey, C. T., Liu, M., Katovich, M. J., Raizada, M. K., & Shenoy, V. (2015). ACE2 and Microbiota: Emerging Targets for Cardiopulmonary Disease Therapy. *Journal of cardiovascular pharmacology*, 66(6), 540–550.
- de Groot, R. J., Baker, S. C., Baric, R. S., Brown, C. S., Drosten, C., Enjuanes, L., Fouchier, R. A., Galiano, M., Gorbalenya, A. E., Memish, Z. A., Perlman, S., Poon, L. L., Snijder, E. J., Stephens,

G. M., Woo, P. C., Zaki, A. M., Zambon, M., & Ziebuhr, J. (2013). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): announcement of the Coronavirus Study Group. *Journal of virology*, 87(14), 7790–7792.

DeGruttola, A. K., Low, D., Mizoguchi, A., & Mizoguchi, E. (2016). Current Understanding of Dysbiosis in Disease in Human and Animal Models. *Inflammatory bowel diseases*, 22(5), 1137–1150.

DGS. (2020, Abril). COVID-19: Diagnóstico Laboratorial - Diagnóstico laboratorial; produtos biológicos; SARS-CoV-2; COVID-19. Retirado de: <https://www.dgs.pt/directrizes-da-dgs/orientacoes-e-circulares-informativas/orientacao-n-0152020-de-23032020-pdf.aspx>

Direção-Geral da Saúde (DGS). (2021, Junho). Covid-19. Retirado de: : <https://www.sns24.gov.pt/tema/doencas-infecciosas/covid-19/>

Donati Zeppa, S., Agostini, D., Piccoli, G., Stocchi, V., & Sestili, P. (2020). Gut Microbiota Status in COVID-19: An Unrecognized Player?. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 576551

Effenberger, M., Grabherr, F., Mayr, L., Schwaerzler, J., Nairz, M., Seifert, M., Hilbe, R., Seiwald, S., Scholl-Buergi, S., Fritsche, G., Bellmann-Weiler, R., Weiss, G., Müller, T., Adolph, T. E., & Tilg, H. (2020). Faecal calprotectin indicates intestinal inflammation in COVID-19. *Gut*, 69(8), 1543–1544.

Fawley, J., & Gourlay, D. M. (2016). Intestinal alkaline phosphatase: a summary of its role in clinical disease. *The Journal of surgical research*, 202(1), 225–234.

Fu, L., Wang, B., Yuan, T., Chen, X., Ao, Y., Fitzpatrick, T., Li, P., Zhou, Y., Lin, Y. F., Duan, Q., Luo, G., Fan, S., Lu, Y., Feng, A., Zhan, Y., Liang, B., Cai, W., Zhang, L., Du, X., Li, L., ... Zou, H. (2020). Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China: A systematic review and meta-analysis. *The Journal of infection*, 80(6), 656–665.

Geddes, K., & Philpott, D. J. (2008). A new role for intestinal alkaline phosphatase in gut barrier maintenance. *Gastroenterology*, 135(1), 8–12.

Ghosh, N. K., & Fishman, W. H. (1966). On the mechanism of inhibition of intestinal alkaline phosphatase by L-phenylalanine. I. Kinetic studies. *The Journal of biological chemistry*, 241(11), 2516–2522.

Gwynne, L., Williams, G. T., Yan, K. C., Patenall, B. L., Gardiner, J. E., He, X. P., Maillard, J. Y., James, T. D., Sedgwick, A. C., & Jenkins, A. (2021). TCF-ALP: a fluorescent probe for the selective detection of *Staphylococcus* bacteria and application in "smart" wound dressings. *Biomaterials science*, 9(12), 4433–4439.

Habes, Q., Linssen, V., Nooijen, S., Kiers, D., Gerretsen, J., Pickkers, P., Scheffer, G. J., & Kox, M. (2017). Markers of Intestinal Damage and their Relation to Cytokine Levels in Cardiac Surgery Patients. *Shock (Augusta, Ga.)*, 47(6), 709–714.

Hajifathalian, K., Krisko, T., Mehta, A., Kumar, S., Schwartz, R., Fortune, B., Sharaiha, R. Z., & WCM-GI research group* (2020). Gastrointestinal and Hepatic Manifestations of 2019 Novel Coronavirus Disease in a Large Cohort of Infected Patients From New York: Clinical Implications. *Gastroenterology*, 159(3), 1137–1140.e2.

Jandhyala, S. M., Talukdar, R., Subramanyam, C., Vuyyuru, H., Sasikala, M., & Nageshwar Reddy, D. (2015). Role of the normal gut microbiota. *World journal of gastroenterology*, 21(29), 8787–8803.

Jiang, F., Deng, L., Zhang, L., Cai, Y., Cheung, C. W., & Xia, Z. (2020). Review of the Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Journal of general internal medicine*, 35(5), 1545–1549.

Kaliannan, K., Hamarneh, S. R., Economopoulos, K. P., Nasrin Alam, S., Moaven, O., Patel, P., Malo, N. S., Ray, M., Abtahi, S. M., Muhammad, N., Raychowdhury, A., Teshager, A., Mohamed, M. M., Moss, A. K., Ahmed, R., Hakimian, S., Narisawa, S., Millán, J. L., Hohmann, E., Warren, H. S., ... Hodin, R. A. (2013). Intestinal alkaline phosphatase prevents metabolic syndrome in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(17), 7003–7008.

Kaliannan, K., Wang, B., Li, X. Y., Kim, K. J., & Kang, J. X. (2015). A host-microbiome interaction mediates the opposing effects of omega-6 and omega-3 fatty acids on metabolic endotoxemia. *Scientific reports*, 5, 11276.

Kim, E. E., & Wyckoff, H. W. (1991). Reaction mechanism of alkaline phosphatase based on crystal structures. Two-metal ion catalysis. *Journal of molecular biology*, 218(2), 449–464.

Ksiazek, T. G., Erdman, D., Goldsmith, C. S., Zaki, S. R., Peret, T., Emery, S., Tong, S., Urbani, C., Comer, J. A., Lim, W., Rollin, P. E., Dowell, S. F., Ling, A. E., Humphrey, C. D., Shieh, W. J., Guarner, J., Paddock, C. D., Rota, P., Fields, B., DeRisi, J., ... SARS Working Group (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *The New England journal of medicine*, 348(20), 1953–1966.

Kompaniyets, L., Goodman, A., Belay, B., Freedman, D., Sucusky, M., Lange, S., Gundlapalli, A., Boehmer, T. & Blanck, H. (2020) Body Mass Index and Risk for COVID-19–Related Hospitalization, Intensive Care Unit Admission, Invasive Mechanical Ventilation, and Death — United States, *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, 70, 355–361

Kühn, F., Adiliaghdam, F., Cavallaro, P. M., Hamarneh, S. R., Tsurumi, A., Hoda, R. S., Munoz, A. R., Dhole, Y., Ramirez, J. M., Liu, E., Vasan, R., Liu, Y., Samarbafzadeh, E., Nunez, R. A., Farber, M. Z., Chopra, V., Malo, M. S., Rahme, L. G., & Hodin, R. A. (2020). Intestinal alkaline phosphatase targets the gut barrier to prevent aging. *JCI insight*, 5(6), e134049.

Kumar, A., Kumar, P., Dungdung, A., Kumar Gupta, A., Anurag, A., & Kumar, A. (2020). Pattern of liver function and clinical profile in COVID-19: A cross-sectional study of 91 patients. *Diabetes & metabolic syndrome*, 14(6), 1951–1954.

Lallès J. P. (2019). Recent advances in intestinal alkaline phosphatase, inflammation, and nutrition. *Nutrition reviews*, 77(10), 710–724.

Leser, T. D., & Mølbak, L. (2009). Better living through microbial action: the benefits of the mammalian gastrointestinal microbiota on the host. *Environmental microbiology*, 11(9), 2194–2206.

Liu, W., Hu, D., Huo, H., Zhang, W., Adiliaghdam, F., Morrison, S., Ramirez, J. M., Gul, S. S., Hamarneh, S. R., & Hodin, R. A. (2016). Intestinal Alkaline Phosphatase Regulates Tight Junction Protein Levels. *Journal of the American College of Surgeons*, 222(6), 1009–1017.

Malard, F., Dore, J., Gaugler, B. & Mohty, M. (2021) Introduction to host microbiome symbiosis in health and disease. *Mucosal Immunol*, 14, 547–554

Malo, M. S., Moaven, O., Muhammad, N., Biswas, B., Alam, S. N., Economopoulos, K. P., Gul, S. S., Hamarneh, S. R., Malo, N. S., Teshager, A., Mohamed, M. M., Tao, Q., Narisawa, S., Millán, J. L., Hohmann, E. L., Warren, H. S., Robson, S. C., & Hodin, R. A. (2014). Intestinal alkaline phosphatase promotes gut bacterial growth by reducing the concentration of luminal nucleotide triphosphates. *American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, 306(10), G826–G838.

Malo, M. S. (2015). A High Level of Intestinal Alkaline Phosphatase Is Protective Against Type 2 Diabetes Mellitus Irrespective of Obesity. *EBioMedicine*, 2(12), 2016–2023.

McFee R. B. (2020). SARS 2 human coronavirus (COVID -19, SARS CoV2). *Disease-a-month : DM*, 66(9), 101063.

Melo, A. D., Silveira, H., Bortoluzzi, C., Lara, L. J., Garbossa, C. A., Preis, G., Costa, L. B., & Rostagno, M. H. (2016). Intestinal alkaline phosphatase and sodium butyrate may be beneficial in attenuating LPS-induced intestinal inflammation. *Genetics and molecular research : GMR*, 15(4), 10.4238/gmr15048875.

Millán J. L. (2006). Alkaline Phosphatases : Structure, substrate specificity and functional relatedness to other members of a large superfamily of enzymes. *Purinergic signalling*, 2(2), 335–341.

Mizrahi, B., Shilo, S., Rossman, H., Kalkstein, N., Marcus, K., Barer, Y., Keshet, A., Shamir-Stein, N., Shalev, V., Zohar, A. E., Chodick, G., & Segal, E. (2020). Longitudinal symptom dynamics of COVID-19 infection. *Nature communications*, 11(1), 6208.

Montalto, M., D’Onofrio, F., Gallo, A., Cazzato, A. & Gasbarrini, G. (2009). Intestinal microbiota and its functions, *Digestive and Liver Disease Supplements*, 3(2), 30–34.

Moreira Rosário, A., Marques, C., Pinheiro, H., Araújo, JR., Mota, I., Ribeiro, R., Pereira, A., Ribeiro, P., de Sousa, MJ., Pereira-Leal, J., de Sousa, J., Morais, J., Teixeira, D., Pestana, D., Rocha, JC., Silvestre, M., Príncipe, N., Gatta, N., Amado, J., Santos, L., Maltez, F., Boquinhás, A., de Sousa, G., Germano, N., Sarmiento, G., Granja, C., Póvoa, P., Faria, A. & Calhau, C. (2021). Imbalanced gut microbiota is a potential new risk factor for COVID-19 severity. *Front. Microbiol.* Aceite para publicação

Nehring, S. M., Goyal, A., Bansal, P., & Patel, B. C. (2021). C Reactive Protein. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Okazaki, Y., & Katayama, T. (2019). Consumption of non-digestible oligosaccharides elevates colonic alkaline phosphatase activity by up-regulating the expression of IAP-I, with increased mucins and microbial fermentation in rats fed a high-fat diet. *The British journal of nutrition*, 121(2), 146–154.

Oliveira, J., & Reygaert, W. C. (2021). Gram Negative Bacteria. In *StatPearls*. StatPearls Publishing.

Parada Venegas, D., De la Fuente, M. K., Landskron, G., González, M. J., Quera, R., Dijkstra, G., Harmsen, H., Faber, K. N., & Hermoso, M. A. (2019). Short Chain Fatty Acids (SCFAs)-Mediated Gut Epithelial and Immune Regulation and Its Relevance for Inflammatory Bowel Diseases. *Frontiers in immunology*, 10, 277.

Penninger, J. M., Grant, M. B., & Sung, J. (2021). The Role of Angiotensin Converting Enzyme 2 in Modulating Gut Microbiota, Intestinal Inflammation, and Coronavirus Infection. *Gastroenterology*, 160(1), 39–46.

Perlot, T., & Penninger, J. M. (2013). ACE2 - from the renin-angiotensin system to gut microbiota and malnutrition. *Microbes and infection*, 15(13), 866–873.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., & Beutler, B. (1998). Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science (New York, N.Y.)*, 282(5396), 2085–2088.

Roberts P. L. (2008). Virus inactivation by solvent/detergent treatment using Triton X-100 in a high purity factor VIII. *Biologicals : journal of the International Association of Biological Standardization*, 36(5), 330–335.

Sharma, P., & Kumar, A. (2020). Metabolic dysfunction associated fatty liver disease increases risk of severe Covid-19. *Diabetes & metabolic syndrome*, 14(5), 825–827.

Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014). Alkaline phosphatase: an overview. *Indian journal of clinical biochemistry : IJCB*, 29(3), 269–278.

Tay, M. Z., Poh, C. M., Rénia, L., MacAry, P. A., & Ng, L. (2020). The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. *Nature reviews. Immunology*, 20(6), 363–374.

The Lancet Respiratory Medicine (2020). COVID-19 transmission-up in the air. *The Lancet. Respiratory medicine*, 8(12), 1159.

Thursby, E., & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *The Biochemical journal*, 474(11), 1823–1836.

Trottein, F., & Sokol, H. (2020). Potential Causes and Consequences of Gastrointestinal Disorders during a SARS-CoV-2 Infection. *Cell reports*, 32(3), 107915.

Viana, S. D., Nunes, S., & Reis, F. (2020). ACE2 imbalance as a key player for the poor outcomes in COVID-19 patients with age-related comorbidities - Role of gut microbiota dysbiosis. *Ageing research reviews*, 62, 101123.

Wang, C., Horby, P. W., Hayden, F. G., & Gao, G. F. (2020). A novel coronavirus outbreak of global health concern. *Lancet (London, England)*, 395(10223), 470–473.

WHO Working Group on the Clinical Characterisation and Management of COVID-19 infection (2020). A minimal common outcome measure set for COVID-19 clinical research. *The Lancet. Infectious diseases*, 20(8), e192–e197.

World Health Organization. (2020, Fevereiro). Report of the WHO-China Joint Mission on Coronavirus Disease 2019 (COVID-19).

WHO Consultation on Obesity (1999: Geneva, Switzerland) & World Health Organization. (2000). Obesity : preventing and managing the global epidemic : report of a WHO consultation. *World Health Organization*

World Health Organization. (2020, Março 11). Director-General's opening remarks at the media briefing on COVID19 -March 2020. Retirado de: <https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>

World Health Organization (2021, Julho 6). Weekly epidemiological update on COVID-19 - 6 July 2021. Retirado de: <https://www.who.int/publications/m/item/weekly-epidemiological-update-on-covid-19---6-july-2021>

Zhang, X., Ren, C., Hu, F., Gao, Y., Wang, Z., Li, H., Liu, J., Liu, B., & Yang, C. (2020). Detection of Bacterial Alkaline Phosphatase Activity by Enzymatic In Situ Self-Assembly of the AIEgen-Peptide Conjugate. *Analytical chemistry*, 92(7), 5185–5190.

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., Zheng, X. S., ... Shi, Z. L. (2020). Addendum: A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*, 588(7836), E6.

Zhou, Y., Yang, Q., Chi, J., Dong, B., Lv, W., Shen, L., & Wang, Y. (2020). Comorbidities and the risk of severe or fatal outcomes associated with coronavirus disease 2019: A systematic review and meta-analysis. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, 99, 47–56.

