

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

CAROLINA SPONCHIADO MIURA

**Prevalência do SARS-CoV-2 em crianças submetidas à
adenotonsilectomia, na ausência de sintomas de
infecção respiratória aguda**

**RIBEIRÃO PRETO
2023**

CAROLINA SPONCHIADO MIURA

**Prevalência do SARS-CoV-2 em crianças submetidas à
adenotonsilectomia, na ausência de sintomas de
infecção respiratória aguda**

Versão corrigida

**Versão original encontra-se na unidade que aloja o Programa de
Pós-Graduação**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de
Estruturas Faciais.

**Orientadora: Profa. Dra. Fabiana
Cardoso Pereira Valera**

RIBEIRÃO PRETO

2023

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Miura, Carolina Sponchiado
Prevalência do SARS-CoV-2 em crianças submetidas à adenotonsilectomia, na ausência de sintomas de infecção respiratória aguda. / Carolina Sponchiado Miura; orientadora, Fabiana Cardoso Pereira Valera. - Ribeirão Preto, 2023.
90f.: 12il.

Tese (Doutorado) - Programa de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Área de concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

1. SARS-CoV-2. 2. COVID-19. 3. Tonsilas. 4. ACE2. 5. TMPRSS2.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Carolina Sponchiado Miura

Título: Prevalência do SARS-CoV-2 em crianças submetidas à adenotonsilectomia, na ausência de sintomas de infecção respiratória aguda

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Morfofisiologia de Estruturas Faciais

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Dedicatória

Aos meus pais, Thais e Carlos, por tudo que abdicaram e pelos sacrifícios que fizeram para que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos, Marina e Diogo, pelas inúmeras palavras de incentivo e por, mesmo longe, tornarem minha vida mais leve.

Ao meu marido Diego, pelo amor e apoio incondicionais e por ser a minha paz.

À minha terapeuta, Letícia, por me ensinar que para ir longe eu preciso dar um passo de cada vez.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Fabiana Cardoso Pereira Valera, pela confiança, amizade e generosidade. Seus ensinamentos e a forma como se dedica a tudo que faz me inspiram a buscar ser sempre melhor.

Aos professores Wilma T. Anselmo-Lima e Edwin Tamashiro, pelo apoio imprescindível durante toda a execução deste estudo.

Aos professores Eurico de Arruda Neto e Ronaldo Bragança Martins Junior, pela ajuda na elaboração e viabilização do projeto.

Aos técnicos, alunos e pós-graduandos do Laboratório de Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que auxiliaram na execução das etapas laboratoriais, especialmente à Thais Melquiades de Lima, pela parceria em todas as etapas.

Aos funcionários do Laboratório de Fisiopatologia, audição, olfato e visão da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram com auxílio técnico e logístico para a execução deste estudo.

A todos os funcionários do Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, que contribuíram com este estudo, direta ou indiretamente, especialmente à Maria Cecília Onofre pela paciência e pelo cuidado.

Ao Prof. Dr. Wilson Salgado Junior e toda a equipe do centro cirúrgico do Hospital Estadual de Ribeirão Preto, que viabilizaram a coleta das amostras para esta pesquisa.

Apoio Financeiro

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES, cujo apoio financeiro foi imprescindível para a execução deste projeto.

Resumo

Miura CS. **Prevalência do SARS-CoV-2 em crianças submetidas à adenotonsilectomia, na ausência de sintomas de infecção respiratória aguda.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introdução: Desde o início da pandemia, em dezembro de 2019, o SARS-CoV-2 já causou mais de seis milhões de mortes. Pelo menos para as variantes iniciais, acreditou-se que as crianças eram menos suscetíveis à infecção, tanto por estarem menos expostas, como por apresentarem quadros predominantemente leves ou assintomáticos. No entanto, a real prevalência da infecção pelo SARS-CoV-2 em crianças é desconhecida, assim como por quanto tempo o vírus persiste no organismo após a infecção aguda. **Objetivos:** Avaliar a prevalência do SARS-CoV-2 em tonsilas palatinas, adenoides e secreções respiratórias de crianças, sem sinais agudos de infecção de vias aéreas superiores, submetidas à adenotonsilectomia durante a pandemia e avaliar a expressão da enzima conversora da angiotensina 2 (ACE2) e da protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) nestes tecidos. **Casística e Métodos:** Foram selecionadas crianças entre três e 12 anos submetidas à adenotonsilectomia. O principal critério de exclusão era ter apresentado sintomas de infecção aguda de vias aéreas superiores no mês anterior à cirurgia. Durante a cirurgia foram coletadas amostras de tonsilas palatinas e adenoides, lavado nasal, *cytobrush* nasal e sangue. As tonsilas palatinas e adenoides foram testadas por meio de qRT-PCR. Os tecidos positivos também foram submetidos à imuno-histoquímica. O qRT-PCR também foi utilizado para testar os lavados nasais e *cytobrushes* nasais. As amostras de sangue foram testadas utilizando um teste rápido de IgM/IgG contra o SARS-CoV-2. Por fim, foi utilizada imunofluorescência para avaliar a expressão de ACE2 e TMPRSS2 nas amostras de tonsilas palatinas e adenoides. **Resultados:** Quarenta e oito crianças (18 meninas, com idade média de 5,5 anos) participaram do estudo. Nenhuma delas havia sido vacinada contra COVID no momento da cirurgia. Apenas duas tinham histórico de diagnóstico de COVID entre três e cinco meses antes da cirurgia. O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado em pelo menos uma amostra de 12 (25%) pacientes - 20% das tonsilas palatinas, 16,27% das adenoides, 10,41% dos *cytobrushes* nasais e 6,25% dos lavados nasais. Das 16 amostras de tonsilas palatinas e adenoides positivas, 15 também demonstraram positividade para nucleoproteína do SARS-CoV-2 na imuno-histoquímica. A imunofluorescência *in situ* revelou maior expressão de ACE2 e TMPRSS2 nos tecidos tonsilares infectados pelo SARS-CoV-2. **Conclusões:** De acordo com esses resultados, a prevalência de infecção por SARS-CoV-2 parece ser maior do que a reportada em literatura para crianças nessa faixa etária. As tonsilas palatinas e adenoides são locais importantes de infecção e podem ser um reservatório para o vírus, além de perpetuar o processo inflamatório. Além disso, tonsilas palatinas e adenoides infectadas pelo SARS-CoV-2 expressam maiores concentrações das proteínas ACE2 e TMPRSS2, essenciais para a entrada do SARS-CoV-2 na célula. No entanto, ainda não está claro o impacto desses resultados na transmissão da doença.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. COVID-19. Tonsilas. ACE2. TMPRSS2.

Abstract

Miura CS. **Prevalence of SARS-CoV-2 in children submitted to adenotonsillectomy, in the absence of symptoms of acute respiratory infection.** Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2023.

Introduction: Since the start of the pandemic in December 2019, SARS-CoV-2 has caused more than six million deaths. At least for the initial variants, it was believed that children were less susceptible to infection, both because they were less exposed and because they had predominantly mild or asymptomatic conditions. However, the actual prevalence of SARS-CoV-2 infection in children is unknown, as is how long the virus persists in the body after acute infection. **Objectives:** were: i) to assess the prevalence of SARS-CoV-2 in tonsils, adenoids and respiratory secretions of children without acute signs of upper airway infection, who underwent adenotonsillectomy during the pandemic; ii) to evaluate the expression of ACE2 and TMPRSS2 in these tissues. **Casuistic and Methods:** Children between 3 and 12 years old who underwent adenotonsillectomy were selected. The main exclusion criterion was having presented symptoms of acute upper airway infection in the month prior to surgery. During surgery, samples of tonsils and adenoids, nasal wash, nasal cytobrush and blood were collected. Tonsils and adenoids were tested by qRT-PCR. Positive tissues were also submitted to immunohistochemistry. qRT-PCR was also used to test nasal washes and nasal cytobrushes. Blood samples were tested using a rapid IgM/IgG test against SARS-CoV-2. Finally, immunofluorescence was used to evaluate the expression of angiotensin converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane serine protease 2 (TMPRSS2) in tonsil and adenoid samples. **Results:** Forty eight children (18 girls, mean age 5.5 years) participated in the study. None of them had been vaccinated against COVID at the time of surgery. Only two of them had a history of previous diagnosis of COVID between three and five months before the surgery. SARS-CoV-2 RNA was detected in at least one sample of 12 (25%) patients - 20% of palatine tonsils, 16.27% of adenoids, 10.41% of nasal swabs and 6.25% of nasal washes. Of the 16 positive palatine tonsil and adenoid samples, 15 also showed positivity for SARS-CoV-2 nucleoprotein in immunohistochemistry. In situ immunofluorescence revealed increased expression of ACE2 and TMPRSS2 in tonsillar tissues infected by SARS-CoV-2. **Conclusions:** According to these results, the prevalence of SARS-CoV-2 infection seems to be higher than that reported in the literature for children in this age group. Palatine tonsils and adenoids are important sites of infection and can be a reservoir for the virus, as well as perpetuate the inflammatory process. In addition, tonsils and adenoids of children infected by SARS-CoV-2 express higher levels of ACE2 and TMPRSS2 proteins, essential for the entry of SARS-CoV-2 into the cell. However, the impact of these results on disease transmission is still unclear.

Keywords: SARS-CoV-2. COVID-19. Tonsils. ACE2. TMPRSS2.

Lista de Figuras

Figura 1 -	Estrutura e organização do vírus SARS-CoV-2	21
Figura 2 -	Vias de entrada do SARS-CoV-2 na célula.....	22
Figura 3 -	Patofisiologia da COVID-19	23
Figura 4 -	Manifestações extrapulmonares da COVID-19.....	24
Figura 5 -	Cinética de carga viral de RNA e vírus infecciosos em pacientes com COVID-19 leve a moderada	26
Figura 6 -	Exemplo de teste LFA positivo para o SARS-CoV-2	27
Figura 7 -	Gráfico demonstrando a resposta de anticorpos em relação ao tempo de início da doença	28
Figura 8 -	Amostras colhidas de cada paciente durante a cirurgia de adenotonsilectomia	40
Figura 9 -	Gráfico de amplificação das amostras positivas pelo qRT-PCR	48
Figura 10 -	Amostras de imuno-histoquímica demonstrando positividade para o SARS-CoV-2 (A) adenoide (epitélio), e (B, C e D) tonsila palatina: (B) epitélio, (C) zona extrafolicular; e (D) folicular	49
Figura 11 -	(A) Figura de imunofluorescência demonstrando a expressão de ACE-2 e TMPRSS2 na amostra de tecido tonsilar de pacientes controles e pacientes positivos para a presença da proteína <i>spike</i> do SARS-CoV-2; (B) Gráfico demonstrando o aumento na expressão de ACE2 e TMPRSS2 nos tecidos positivos para o SARS-CoV-2 em relação aos negativos	50
Figura 12 -	Imunofluorescência de células do epitélio nasal revelando positividade para o SARS-CoV-2.....	51

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Set de <i>primers</i> e sondas para detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR	41
Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos	46
Tabela 3 - Dados demográficos, clínicos e resultados de RT-PCR e sorologia de cada participante do estudo. Em destaque as crianças que tiveram pelo menos uma das amostras positivas para o SARS-CoV-2.....	52

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

ACE2-	Enzima conversora da angiotensina 2
AOS-	Apneia obstrutiva do sono
CDC-	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
ddPCR-	droplet digital PCR
DRGE-	Doença do refluxo gastroesofágico
DRS-	Distúrbios respiratórios do sono
E-	Envelope
ELISA-	Ensaio imunoadsorvente ligado à enzima
HCFMRP-USP-	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HERP-	Hospital Estadual de Ribeirão Preto
IAV-	Vírus influenza A
IVAS-	Infecções das vias aéreas superiores
LFA-	Ensaio de fluxo lateral
M-	Membrana
MALT-	Tecido linfoide associado à mucosa
MEM-	Meio mínimo essencial
N-	Nucleocapsídeo
NP-	Nucleoproteína
OCDE-	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS-	Organização Mundial de Saúde
PBS-	Tampão fosfato-salino
PCR-	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>polymerase chain reaction</i>)
PFA-	Paraformaldeído

qRT-PCR-	PCR em tempo real
R0-	R zero
RT-PCR-	<i>Reverse-transcriptase polymerase chain reaction</i>
S-	Proteínas “spike”
S1-	Subunidade 1
S2-	Subunidade 2
SRAG-	Síndrome Respiratória Aguda Grave
TBS-T-	<i>Tris-Buffered Saline com Tween 20</i>
TMPRSS2-	Protease transmembrana serina 2
UBS-	Unidade Básica de Saúde
VTM- M	Meio de transporte viral
WHO -	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

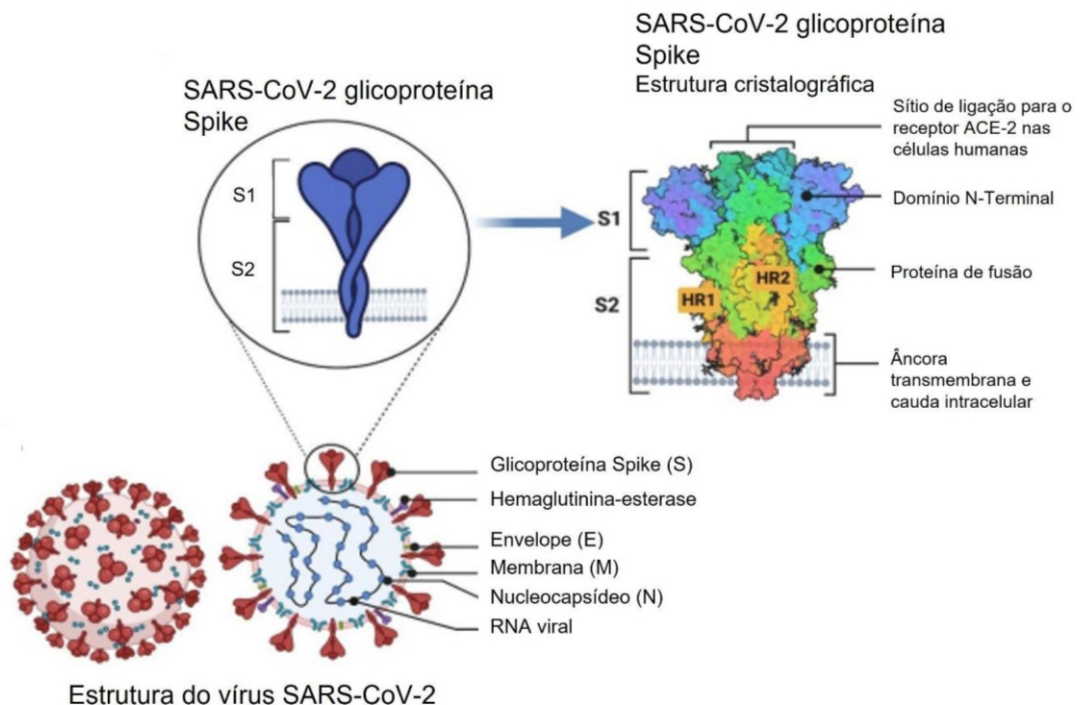
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2	20
1.2. Manifestações clínicas da COVID-19.....	23
1.3. Transmissão do SARS-CoV-2.....	25
1.4. Diagnóstico SARS-CoV-2	26
1.5. SARS-CoV-2 em crianças.....	29
1.6. O papel das tonsilas em infecções virais	30
1.6.1. Detecção de vírus respiratórios em tonsilas palatinas e adenoides de crianças.....	31
1.6.2. Detecção do SARS-CoV-2 em tonsilas palatinas e adenoides	33
2. OBJETIVOS.....	35
3. CASUÍSTICA E MÉTODOS	37
3.1. Considerações éticas	38
3.2. Tipo de estudo e escolha dos pacientes.....	38
3.3. Coleta e processamento de amostras	39
3.3.1. Detecção do RNA do SARS-CoV-2	41
3.3.2. Imuno-histoquímica para SARS-CoV-2 em tecido adenotonsilar	42
3.3.3. Imunocoloração de fluorescência <i>in situ</i> para ACE2, TMPRSS2 e <i>Spike</i> SARS-CoV-2	42
3.3.4. Coloração de imunofluorescência indireta para células <i>cytobrush</i> nasais infectadas com nucleoproteína SARS-CoV-2	43
3.3.5. Teste imunocromatográfico rápido IgG/IgM	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1. Dados demográficos e clínicos (Tabela 2).....	46
4.2. Detecção do RNA e antígeno do SARS-CoV-2 nas amostras.....	47
4.3. Expressão de ACE2 e TMPRSS2 em tonsilas	49
4.4. Detecção do antígeno de SARS-CoV-2 em <i>cytobrushes</i> nasais	51
4.5. Sorologia SARS-CoV-2.....	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
8. ANEXOS	77
9. APÊNDICES	85

1- Introdução

Em 31 de dezembro de 2019, a Comissão Municipal de Saúde de Wuhan, província de Hubei, China, reportou à Organização Mundial de Saúde (OMS) um conjunto de casos de pneumonia de origem desconhecida. Em um mês já eram 7818 casos confirmados na China e em mais 18 países (WHO - World Health Organization, 2021). Logo descobriu tratar-se de um novo coronavírus que foi chamado de SARS-CoV-2 por sua semelhança genética com o coronavírus que causou o surto de SARS em 2002-2004 (Zoppi; Henderson, 2020). Desde então, a doença se espalhou pelo mundo, e atualmente são mais de 600 milhões de casos confirmados e cerca de 6,7 milhões de mortes. No Brasil já são mais de 36 milhões de casos confirmados e aproximadamente 700 mil mortes até julho de 2023 (WHO, 2023).

1.1 Fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2

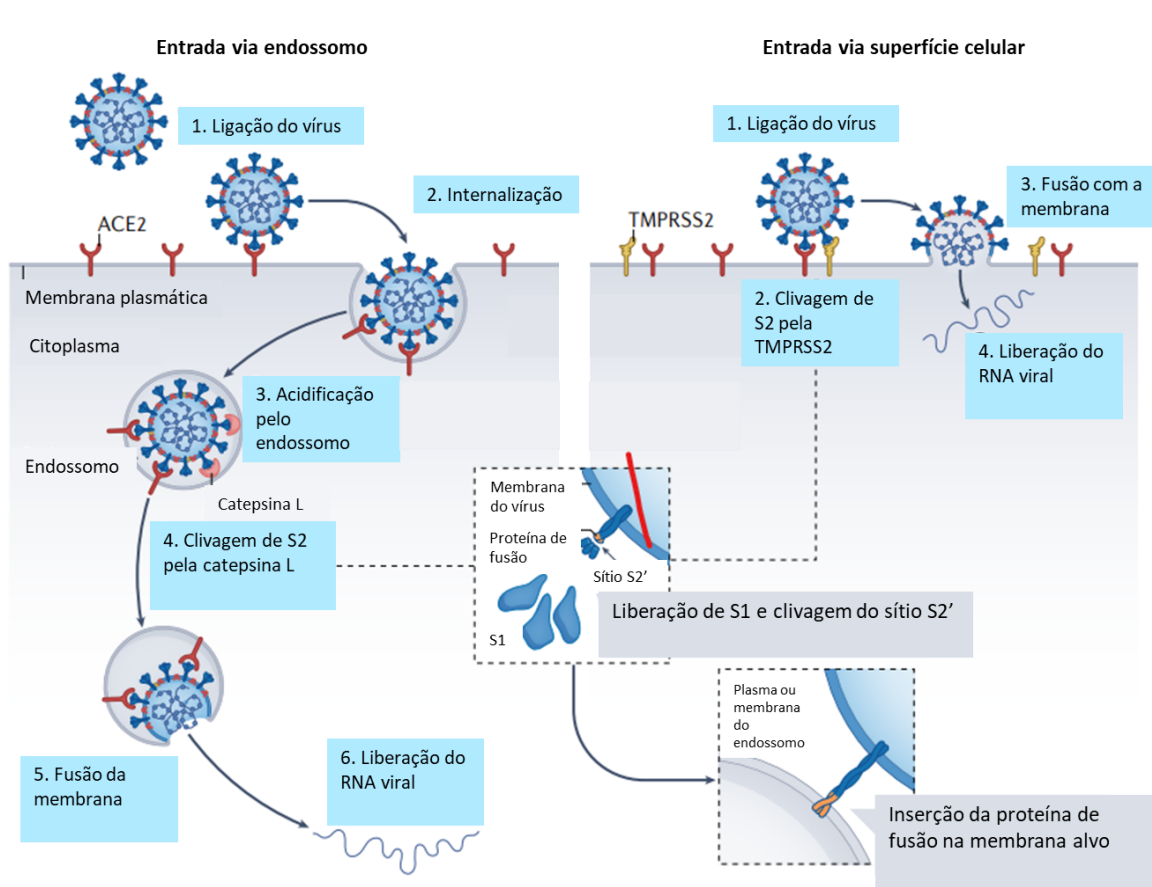
O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA de cadeia simples, envelopado, de sentido positivo, do gênero Betacoronavirus (Lu et al., 2020). É composto por nucleocapsídeo (N), membrana (M), envelope (E) e proteínas “spike” (S), que são proteínas estruturais (Figura 1) (Chilamakuri; Agarwal, 2021).

Figura 1 - Estrutura e organização do vírus SARS-CoV-2

Fonte: Adaptada de Chilamakuri e Agarwal (2021).

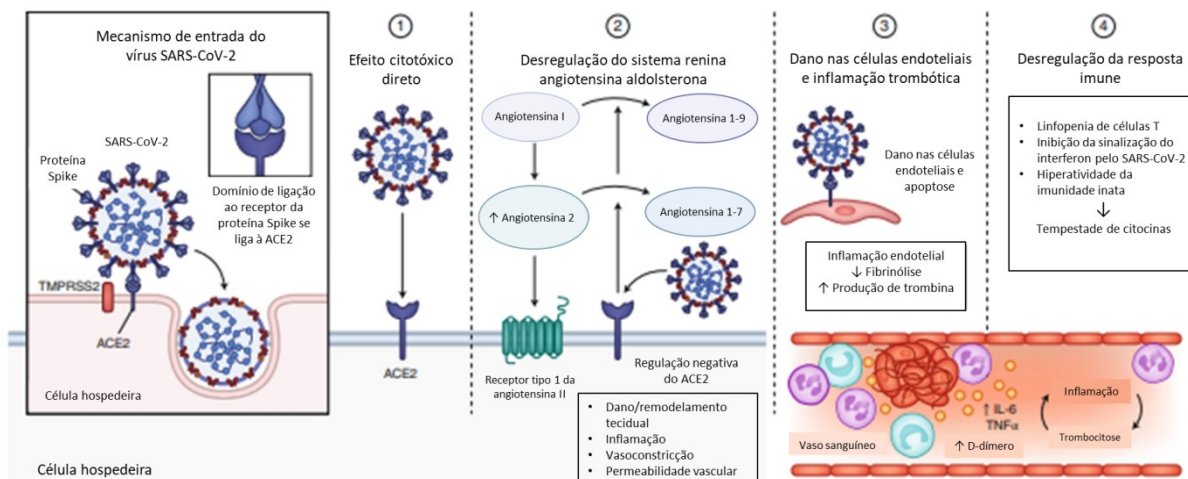
A entrada do vírus nas células depende da coexpressão na membrana celular de seu receptor obrigatório, a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), e da serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2) (Gupta et al., 2020; Lan et al., 2020; Shang et al., 2020; Walls et al., 2020; Wang Q et al., 2020; Zhou et al., 2020; Wong et al., 2021). O vírus se fixa na membrana através da proteína S. Em seguida, enzimas do tipo convertase clivam a proteína S em duas subunidades, a subunidade 1 (S1), que se liga à ACE2, e a subunidade 2 (S2), que ancora o vírus à membrana (Hoffmann; Kleine-Weber; Pöhlmann, 2020; Shang et al., 2020).

Uma vez ligada ao receptor na membrana celular, a glicoproteína S, sob a ação da TMPRSS2 (Matsuyama et al., 2010; Glowacka et al., 2011; Shulla et al., 2011), sofre clivagem adicional na S2, liberando o peptídeo de fusão e iniciando a formação do poro de fusão. Essa clivagem também pode ocorrer no citoplasma, mais precisamente no endossomo, sob a ação de outra protease, a catepsina L (Simmons et al., 2005; Huang et al., 2006) (Figura 2) (Jackson et al., 2022).

Figura 2 - Vias de entrada do SARS-CoV-2 na célula

Fonte: Adaptado de Jackson et al. (2022).

Após a fusão com a membrana, o conteúdo viral é liberado dentro do citoplasma da célula dando início ao processo de replicação e transcrição. As novas fitas de RNA passam a sintetizar as proteínas virais (Lai; Cavanagh, 1997; File:Coronavirus replication.png, 2012; Yang; Shen, 2020). Os novos vírus são transportados via vesículas de Golgi para a membrana celular e, por meio do processo de exocitose, são liberados no espaço extracelular, onde podem infectar novas células ou participar da transmissão comunitária da COVID-19 (Cascella et al., 2023). Os fatores envolvidos na patogênese da doença são: toxicidade viral direta, dano às células endoteliais, inflamação vascular e desregulação da resposta imune e do sistema renina-angiotensina-aldosterona (Figura 3) (Gupta et al., 2020).

Figura 3 - Patofisiologia da COVID-19

Fonte: Adaptada de Gupta et al. (2020).

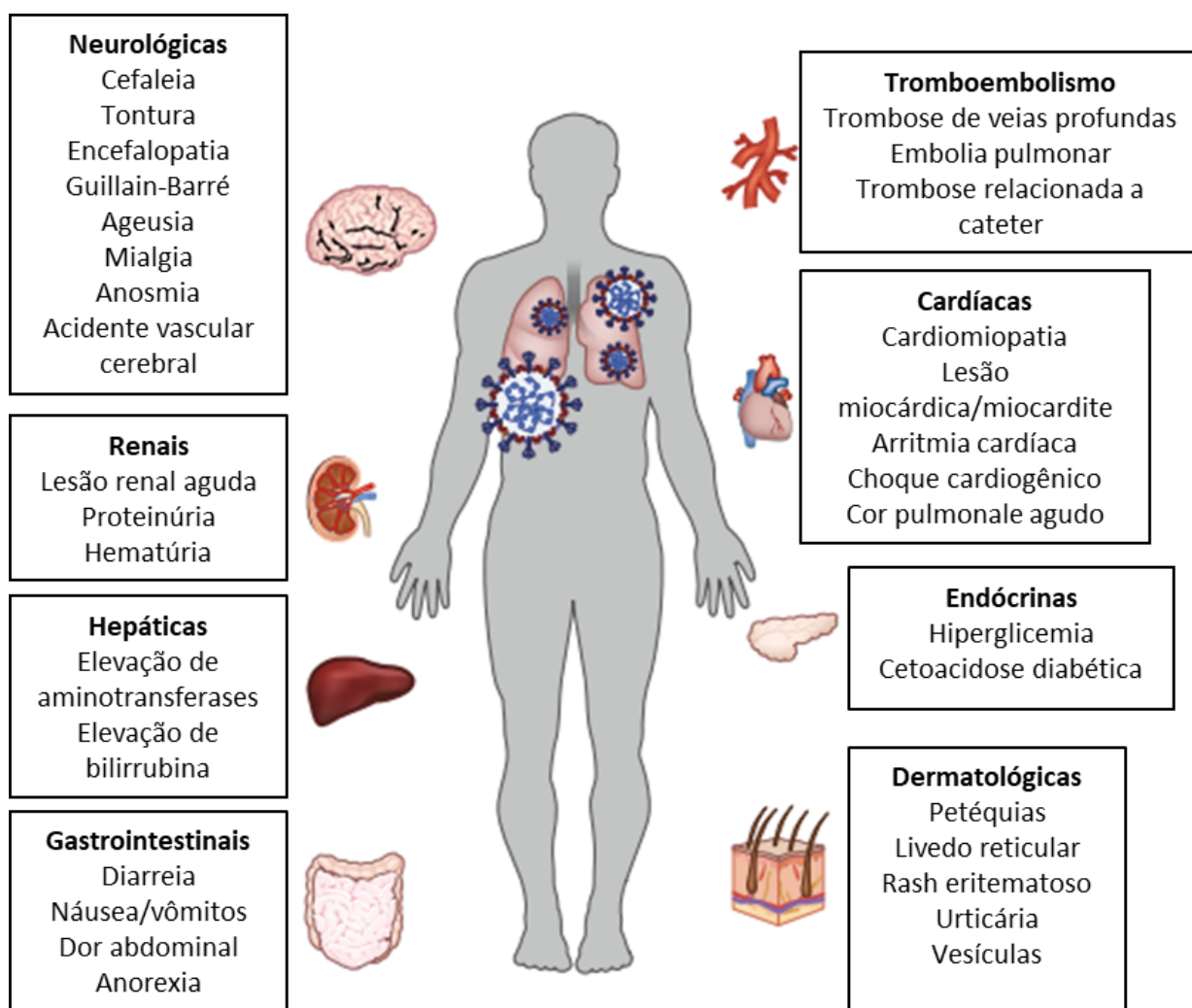
1.2 Manifestações clínicas da COVID-19

O SARS-CoV-2 entra no hospedeiro pelo trato respiratório superior. As células epiteliais das vias aéreas superiores e inferiores, as células endoteliais vasculares e os macrófagos alveolares são os primeiros sítios de infecção e replicação viral, provavelmente devido à expressão da ACE2 e TMPRSS2 (Shulla et al., 2011; Sun et al., 2021).

Apesar de o trato respiratório ser o principal sítio acometido na infecção pelo SARS-CoV-2, os tecidos que mais expressam a ACE-2 são o intestino delgado, testículo, rim, miocárdio, cólon e tireoide (Ye et al., 2004; Wang Y et al., 2020). O período de incubação varia entre dois e 14 dias, com média de 5,7 dias (Lauer et al., 2020). A apresentação clínica inclui desde infecção assintomática até sintomas severos. Entre os indivíduos sintomáticos, as queixas mais comuns são: febre, tosse, mialgia e alteração do olfato e paladar (Huang et al., 2020; Lechien et al., 2020; Wang D et al., 2020). O acometimento pulmonar pode resultar em pneumonia grave, insuficiência respiratória e até a morte (Schaefer et al., 2020; John et al., 2021). Além disso, a infecção disseminada pode ter manifestações hematológicas, cardiovasculares, renais, gastrointestinais, hepatobiliares, endocrinológicas e neurológicas (Figura 4) (Gupta et al., 2020).

Evidências indicam que a doença está associada a alterações na coagulação sanguínea, predispondo os pacientes a fenômenos tromboembólicos venosos e arteriais e aumentando o risco de mortalidade (Tang et al., 2020). De acordo com metanálise publicada no final de 2020, a taxa de tromboembolismo venoso pode chegar a 31% dos pacientes com COVID-19 internados em unidade de terapia intensiva e a de tromboembolismo arterial 5% (Malas et al., 2020).

Figura 4 - Manifestações extrapulmonares da COVID-19



Fonte: Adaptada de Gupta et al. (2020).

Segundo o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), pessoas com algumas condições apresentam risco aumentado para formas graves de COVID-19. A principal delas é a idade. O número de mortes entre idosos acima de 65 anos é 97 vezes maior que entre adultos de 18 a 29 anos. Além disso, a presença de uma ou mais condições médicas como, por exemplo, obesidade, doenças crônicas, diabetes, cardiopatias, doenças autoimunes, entre outras, aumenta o risco de internação, necessidade de terapia intensiva, ventilação mecânica e morte, entre outras (CDC, 2023a).

1.3 Transmissão do SARS-CoV-2

Desde o início da pandemia, o SARS-CoV-2 se mostrou um vírus com alta capacidade de disseminação, que pode ser quantificada pelo número básico de reprodução, ou R zero (R_0), que reflete o número médio de transmissões secundárias a partir de uma pessoa infectada. Nos primeiros meses da pandemia esse número foi estimado em 2,68 (Wu; Leung K; Leung GM, 2020), podendo chegar à média de 5,08 para a variante delta (Liu; Rocklöv, 2021) e de 9,5 para a variante ômicron (Liu; Rocklöv, 2022).

As principais formas de transmissão são por meio de gotículas respiratórias e aerossóis, mas outras, como contato direto com superfícies contaminadas e transmissão fecal-oral, também foram reportadas (Harrison; Lin; Wang, 2020).

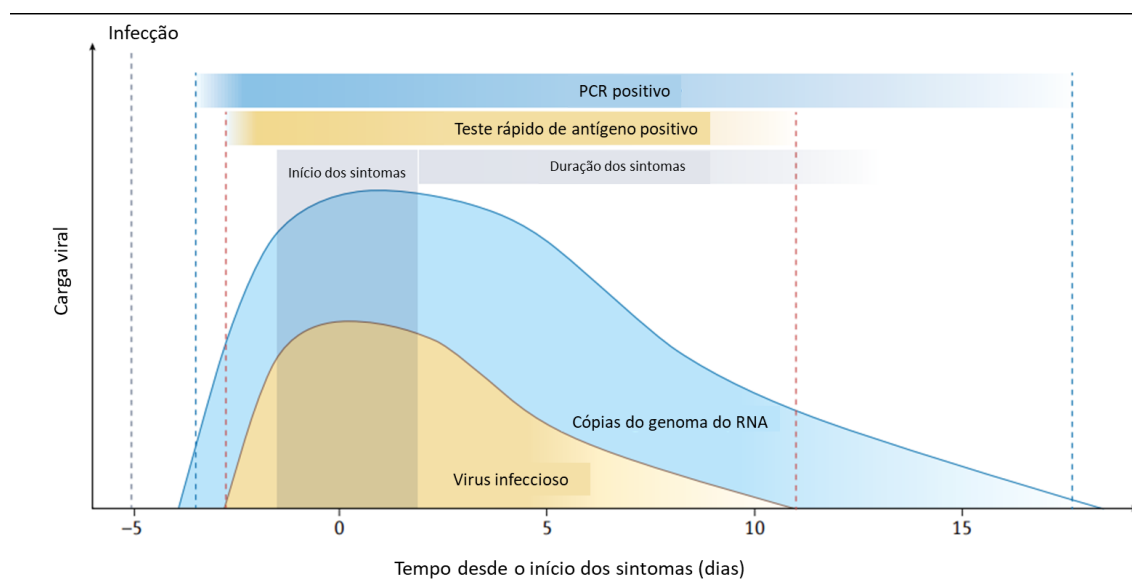
Uma grande proporção da transmissão da COVID-19 pode ocorrer por meio de aerossóis produzidos por indivíduos assintomáticos durante a respiração e fala (Anderson et al., 2020; Asadi et al., 2020; Morawska; Cao, 2020).

Li R et al. (2020) estimaram que em Wuhan, China, até 23 de janeiro de 2020, quando começaram as restrições para viagens, 86% de todas as infecções não haviam sido documentadas, geralmente por não serem sintomáticas. Essas infecções em assintomáticos foram a fonte de 79% dos casos documentados.

Indivíduos infectados podem ser altamente contagiosos por vários dias, com o pico durante, ou, antes do início dos sintomas (Figura 5) (Puhach; Meyer; Eckerle, 2023) e, por esse motivo, estratégias para prevenir a disseminação da doença

baseadas apenas em indivíduos sintomáticos não são eficazes (Prather; Wang; Schooley, 2020).

Figura 5 - Cinética de carga viral de RNA e vírus infecciosos em pacientes com COVID-19 leve a moderada



Fonte: Adaptada de Puhach, Meyer e Eckerle (2023).

A infecção ocorre por contato direto ou indireto com a mucosa nasal, conjuntival ou oral, quando as partículas respiratórias são inaladas ou se depositam sobre essas superfícies de mucosas (Hui et al., 2020).

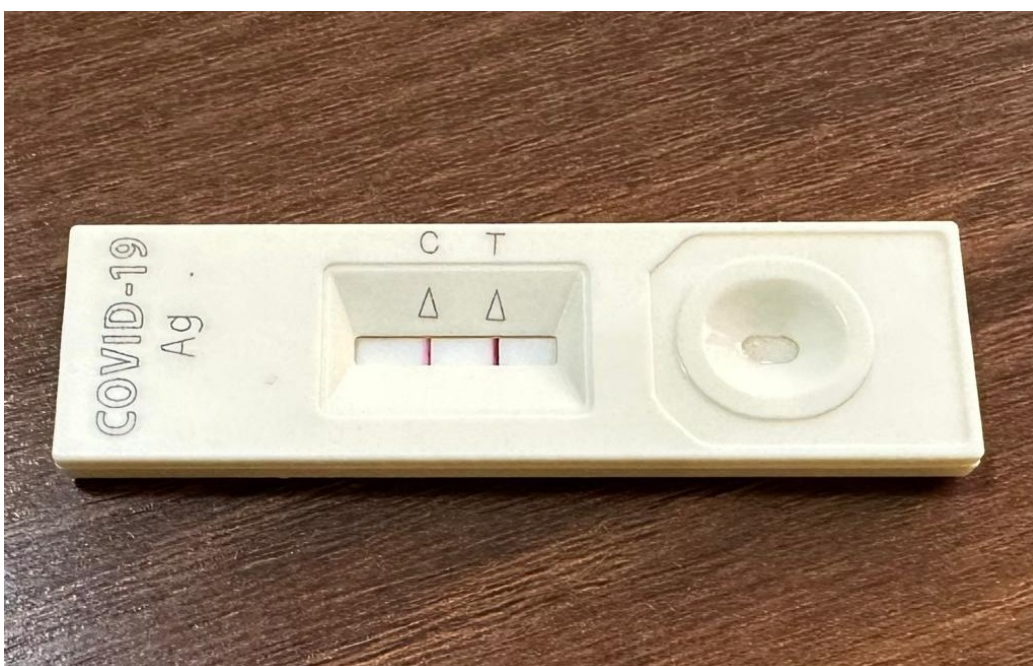
1.4 Diagnóstico SARS-CoV-2

Os principais métodos para o diagnóstico de COVID-19, disponíveis atualmente, são o RT-PCR (do inglês reverse-transcriptase polymerase chain reaction), os testes para detecção de anticorpos e os testes para detecção de antígenos. O RT-PCR é considerado o exame padrão ouro atualmente por permitir a detecção direta de material genético do SARS-CoV-2 em secreções e tecidos. A técnica se baseia em duas reações: a conversão do RNA em DNA complementar, por meio da ação da enzima transcriptase reversa, e a amplificação do DNA complementar por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando

primers para genes específicos e sondas marcadas com fluorescência. Apesar de ser mais comumente utilizado em *swabs* nasais e de orofaringe, o RT-PCR também pode detectar o SARS-CoV-2 a partir de amostras de outros fluidos e tecidos corporais.

Os testes de antígeno detectam componentes virais como a glicoproteína S, a proteína M e a proteína N, ou o vírus diretamente, mas sem utilizar técnicas de amplificação, o que pode diminuir a sua sensibilidade em relação ao RT-PCR (Guglielmi, 2020). O mais conhecido é o ensaio de fluxo lateral (LFA) utilizado no teste rápido. O LFA é um teste rápido qualitativo. Nele, a presença dos antígenos do SARS-CoV-2 é determinada por meio de anticorpos marcados. O dispositivo é composto por um cassete com um *display* e, dentro, uma tira de membrana contendo duas linhas: uma linha controle e uma linha de teste. A amostra é depositada através de uma pequena abertura no cassete e corre a tira de membrana por capilaridade. As proteínas virais do SARS-CoV-2 se ligam aos anticorpos presentes na linha de teste. Outras partículas se ligam à linha controle, obrigatória para a validade do teste (Mahmoudinobar; Britton; Montclare, 2021). Dessa forma, quando o resultado do teste é positivo, observam-se duas linhas verticais no *display* (Figura 6).

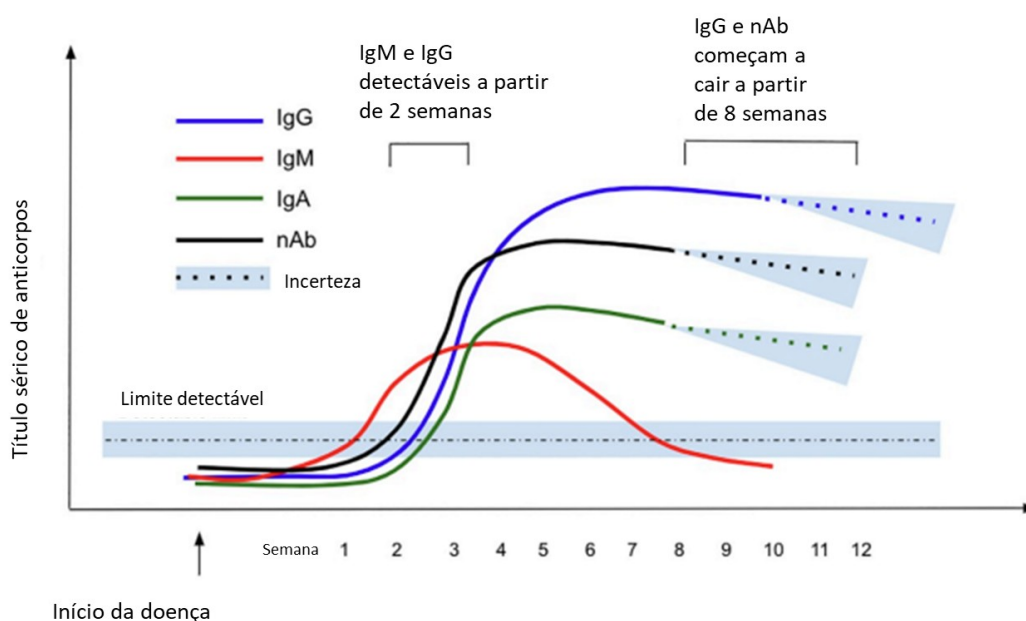
Figura 6 - Exemplo de teste LFA positivo para o SARS-CoV-2



Já os testes de anticorpo detectam a presença e concentração de imunoglobulinas dos tipos IgG e IgM, específicas contra o SARS-CoV-2, no sangue, soro ou plasma. O principal teste de anticorpos para o diagnóstico de COVID-19, é o ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA) (Yüce; Filiztekin; Özkaya, 2021).

O teste de ELISA utiliza antígeno viral recombinante, que mimetiza o SARS-CoV-2, como molécula alvo, recobrando a superfície de pequenos poços em placas de plástico. O soro do paciente é adicionado a esses poços e, caso contenha IgM ou IgG anti SARS-CoV-2, a ligação ocorre, e essa ligação é medida em uma reação enzimática que produz fluorescência. A intensidade da cor é então lida por um espectômetro e a concentração de anticorpos anti-SARS-CoV-2 pode ser mensurada. Após a infecção pelo SARS-CoV-2, os níveis de IgM aumentam gradualmente durante a primeira semana, atingindo o pico de duas até cinco semanas e depois, diminuem até valores basais. Já os níveis de IgG aumentam após a primeira semana, atingindo o pico de três a sete semanas após o início da doença, podendo se manter em baixos níveis por um período prolongado (Hou et al., 2020; Post et al., 2020) (Figura 7).

Figura 7 - Gráfico demonstrando a resposta de anticorpos em relação ao tempo de início da doença



Fonte: Adaptada de Post et al. (2020).

1.5 SARS-CoV-2 em crianças

Nos estágios iniciais da pandemia, acreditava-se que as crianças raramente eram afetadas pelo SARS-CoV-2 (Wu; McGoogan, 2020), possivelmente por serem menos expostas. Atualmente, estudos sugerem que as crianças são tão suscetíveis ao vírus quanto os adultos (Zimmermann; Curtis, 2020a, 2020b; Fazolo et al., 2021). No entanto, frequentemente apresentam infecção assintomática ou formas leves da doença, com exceção de raros casos de síndrome inflamatória sistêmica (Dong et al., 2020).

Os principais sintomas da COVID-19 em crianças são: febre, tosse seca, fadiga, obstrução nasal, coriza e dor de garganta, com recuperação após uma semana a duas semanas do início dos sintomas (Cui et al., 2021). Alguns pacientes também podem apresentar sintomas gastrointestinais como desconforto abdominal, náusea, vômitos, dor abdominal e diarreia (Cao et al., 2020). Ao contrário dos adultos, em que a persistência dos sintomas por período prolongado após o início da infecção, condição conhecida como COVID longa, tem sido descrita com alta frequência (Chen et al., 2022), os estudos com crianças são poucos e muito heterogêneos. Zimmermann, Pittet e Curtis (2021), em uma revisão de literatura, encontraram prevalência de COVID longa em crianças e adolescentes entre 4 e 66%, sendo os principais sintomas cefaleia, fadiga, distúrbios do sono e dificuldade de concentração.

Já a síndrome inflamatória sistêmica em crianças e adolescentes relacionada ao SARS-CoV-2 é definida pela OMS pela presença de febre há mais de três dias associada a pelo menos dois dos seguintes sintomas: *rash* ou conjuntivite não purulenta bilateral ou sinais de inflamação mucocutânea; problemas gastrointestinais agudos; disfunção cardíaca; evidência de coagulopatia; hipotensão ou choque. Além disso, deve haver elevação de marcadores inflamatórios, evidência de COVID-19 ou provável contato com paciente com COVID-19, além da exclusão de outras causas infecciosas de inflamação (WHO, 2020). Exames laboratoriais demonstram uma tempestade de citocinas inflamatórias com aumento expressivo de interleucina-6 (Rowley, 2020). O tratamento precoce com imunoglobulina e glicocorticoides diminui o risco de disfunção cardiovascular persistente (Son et al., 2021).

De acordo com os dados mais recentes da Academia Americana de Pediatria (2023), as crianças representam 18% de todos os casos reportados de COVID-19 nos Estados Unidos desde o início da pandemia. Apesar do número expressivo de casos, a mortalidade por COVID-19 em crianças é consideravelmente menor. Desde o início da pandemia morreram 109.723 pessoas nos Estados Unidos e entre os mortos, apenas 1.436 tinham idade entre zero e 18 anos (CDC, 2023b).

Os motivos pelos quais a gravidade da COVID-19 é menor em crianças ainda não foram totalmente esclarecidos, mas a principal suspeita é a presença de fatores relacionados ao hospedeiro como diferenças na resposta imune ao vírus, baixa predisposição a estados pró-inflamatórios, e menor prevalência de comorbidades nessa faixa etária (Williams et al., 2020). Estudos sugerem que as crianças têm resposta de imunidade inata ao SARS-CoV-2 mais robusta que os adultos (Consiglio et al., 2020; Gruber et al., 2020; Pierce et al., 2020; Weisberg et al., 2021), além de apresentarem maior frequência de células dendríticas maduras capazes de gerar respostas imunes eficientes contra o vírus (Fazolo et al., 2021). Outro fator importante seria a menor expressão de ACE2 e TMPRSS2 no trato respiratório de crianças (Bunyavanich; Do; Vicencio, 2020; Hasan et al., 2021; Silva et al., 2023), dificultando a entrada de vírus nas células e, conseqüentemente, a replicação viral, a inflamação e a lesão tecidual.

1.6 O papel das tonsilas em infecções virais

As tonsilas palatinas e adenoide fazem parte do anel linfático de Waldeyer, um tecido linfoide associado à mucosa (MALT) não contíguo, presente na nasofaringe e orofaringe (Fossum et al., 2017). Por sua localização estratégica, na entrada do trato respiratório e alimentar, exercem papel importante na resposta imune. Quando os antígenos atravessam o epitélio da tonsila, são processados pelas células apresentadoras de antígenos (como células dendríticas e macrófagos) e, em seguida, são apresentadas aos linfócitos T e B da região extrafolicular, desencadeando uma resposta imune que resulta na produção de imunoglobulinas (Arambula; Brown; Neff, 2021).

A tonsilectomia e a adenoidectomia estão entre os procedimentos cirúrgicos mais realizados no mundo (Cullen; Hall; Golosinskiy, 2009). Em crianças, as principais indicações são tonsilites recorrentes e sintomas de distúrbios respiratórios do sono (DRS) (Mitchell et al., 2019).

Em relação às tonsilites de repetição, a indicação de tonsilectomia se baseia nos critérios de Paradise et al. (1984). Para a criança ser elegível para cirurgia, os episódios devem atingir padrões definidos em cada uma de quatro categorias: 1) frequência: ocorrência de sete ou mais episódios no último ano, cinco ou mais episódios por ano nos últimos dois anos ou três ou mais episódios por ano nos últimos três anos; 2) características clínicas: cada episódio deve apresentar pelo menos umas das seguintes características clínicas: febre com temperatura maior que 38,3°C, presença de linfadenopatia cervical, presença de exsudato tonsilar ou faríngeo, ou cultura positiva para estreptococo beta-hemolítico do grupo A; 3) tratamento: a criança deve ter recebido antibióticos na dose convencional para o episódio estreptocócico suspeito ou confirmado; 4) documentação: cada episódio e suas características devem ter sido documentados em um registro clínico.

Além de sítio de infecção, as tonsilas também podem causar obstrução da orofaringe, quando hipertrofiadas. A hipertrofia adenotonsilar é a principal causa de DRS em crianças. Os DRS são caracterizados por obstrução parcial ou completa recorrente da via aérea alta durante o sono, resultando em interrupção da oxigenação/ventilação normais e alterando a arquitetura do sono (American Thoracic Society, 1996). Há evidências de que os DRS aumentam o risco de agressividade, hiperatividade, depressão, problemas de memória e atenção, déficit cognitivo, baixo rendimento escolar, enurese noturna e déficit de crescimento, e que a adenotonsilectomia é efetiva em melhorar esses sinais e sintomas na maioria dos casos (Mitchell et al., 2019).

1.6.1 Detecção de vírus respiratórios em tonsilas palatinas e adenoides de crianças

As tonsilas são uma das primeiras portas de entrada para os vírus, principalmente os respiratórios.

Estudos utilizando amostras de tonsilas palatinas e adenoides provenientes de adenotonsilectomias eletivas em crianças já revelaram a presença de material genético de diferentes vírus nesses tecidos, inclusive de outros coronavírus endêmicos. Proença-Modena et al. (2012), em estudo com 121 crianças submetidas à adenotonsilectomia eletiva, sem história de infecção de vias aéreas superiores nos 30 dias anteriores à cirurgia, detectaram vírus respiratórios em 85,7% das adenoides e 68,6% das tonsilas palatinas, com destaque para adenovírus humano (47,1%), enterovírus (40,5%) e rinovírus (38%). Neste estudo, os coronavírus endêmicos OC43 e 229E foram detectados em 3,3% das crianças.

Prevalência menor foi encontrada por Yeshuroon-Koffler et al. (2015), que compararam a detecção de vírus respiratórios em amostras de tonsilas palatinas e adenoides de crianças submetidas à adenotonsilectomia por apneia obstrutiva do sono (AOS) com as de crianças submetidas à mesma cirurgia por tonsilites recorrentes, e encontraram positividade em 50% das amostras, todas do grupo com AOS ($p < 0,001$). Os vírus mais detectados em ordem de frequência foram rinovírus, adenovírus, metapneumovírus humano, vírus sincicial respiratório e coronavírus NL63.

Günel et al. (2015), em estudo com 51 crianças, encontraram positividade para o vírus Epstein-Barr em 43,1% das tonsilas palatinas e 41,1% das adenoides e para o bocavirus humanos em 19,3% das tonsilas palatinas e 43,1% das adenoides ($p < 0,001$). Faden et al. (2016), em estudo com 59 crianças submetidas à adenotonsilectomia eletiva, detectaram vírus respiratórios em 70,9% das tonsilas palatinas e 94,7% das adenoides ($p < 0,001$). Os vírus encontrados em maior frequência foram o adenovírus humano (56%), o vírus Epstein-Barr (43%) e o rinovírus (38%). O coronavírus endêmico foi encontrado na frequência de 14% neste estudo.

Buzatto et al. (2017) observaram a presença de nove vírus respiratórios e cinco bactérias em amostras de adenoide e lavado de orelha média de 37 crianças com diagnóstico de otite média com efusão e hipertrofia adenoideana comparadas a 14 crianças controle. Os autores encontraram taxas de detecção de vírus semelhantes na adenoide nos dois grupos. Os vírus mais frequentemente encontrados na adenoide nos dois grupos foram, em ordem de frequência:

enterovírus, adenovírus, rinovírus, vírus sincicial respiratório, bocavirus, metapneumovirus, coronavírus endêmico e parainfluenza.

Mais recentemente, Castro et al. (2020), utilizando RT-PCR, testaram a presença de material genético do vírus influenza A (IAV) em fragmentos de tonsilas palatinas e adenoides de 103 crianças sem sintomas agudos submetidas à adenotonsilectomia e encontraram positividade em pelo menos um tecido em sete (6,8%) crianças. Além disso, lisados dos tecidos desses sete pacientes foram inoculados em monocamadas de células MDCK e sinais de infecção foram observados em uma das amostras. Esse achado sugere que tonsilas palatinas e adenoides de pacientes sem sintomas de infecção viral recente, além de expressarem proteínas do IAV, podem conter vírus viáveis. Em conjunto, os achados reforçam que as tonsilas, no geral, podem ter impacto importante na transmissão da doença, por serem reservatórios de vírus viáveis, capazes de replicação no interior dos seus tecidos.

1.6.2 Detecção do SARS-CoV-2 em tonsilas palatinas e adenoides

No início da pandemia, assim que foi descoberta a transmissão do SARS-CoV-2 via gotículas respiratórias e aerossóis, uma das primeiras medidas tomadas para prevenção de contágio foi a suspensão de cirurgias eletivas pelo alto risco de contágio dos médicos cirurgiões e anestesistas. As adenotonsilectomias foram especialmente comprometidas por exigirem contato próximo do cirurgião com a via aérea do paciente.

Com o início da vacinação e a redução do número de casos, começou-se a pensar em formas de retomar as cirurgias eletivas com segurança. Cada hospital estabeleceu seu próprio protocolo, geralmente baseado na ausência de sintomas clínicos de infecção aguda de vias aéreas superiores e teste RT-PCR negativo para o SARS-CoV-2 antes da cirurgia. Alguns, no entanto, (inclusive o nosso serviço) optaram apenas pelos critérios clínicos, por causa da escassez de testes disponíveis à época.

Considerando o comportamento de outros vírus respiratórios, que podem permanecer por período prolongado nas tonsilas palatinas e adenoides de crianças

sem sintomas de infecção aguda de vias aéreas superiores, torna-se essencial o entendimento sobre a possibilidade de presença do SARS-CoV-2 em amostras desses tecidos, assim como estudos que avaliem a sua viabilidade.

Kadriyan et al. (2021) reportaram dois casos de adultos submetidos à tonsilectomia por tonsilites recorrentes e que tiveram amostras de tonsilas palatinas testadas por RT-PCR positivas para o SARS-CoV-2 no momento do procedimento cirúrgico. Uma mulher de 26 anos com tonsilites recorrentes, diagnosticada para COVID-19 (teste de IgM e IgG e RT-PCR positivos) 24 dias antes da cirurgia e um homem de 19 anos com hipertrofia tonsilar e tonsilites de repetição que teve teste de IgM e IgG positivos para COVID-19 duas semanas antes da cirurgia (apesar de RT-PCR negativo). Ambos apresentavam teste rápido de COVID-19 positivo para IgG e negativo para IgM no pré-operatório imediato.

Muderris et al. (2022) estudaram 48 amostras de tecidos de 32 pacientes entre três e 59 anos, submetidos à cirurgia de adenotonsilectomia, e que tiveram RT-PCR para o SARS-CoV-2 negativo dentro das 24 horas prévias à cirurgia. Os autores observaram que amostras de dois pacientes foram positivas (utilizando o RT-PCR), apesar de o teste sanguíneo estar negativo.

Xu et al. (2023) analisaram amostras de tonsilas palatinas e adenoides de 110 crianças submetidas à adenotonsilectomia, com teste de RT-PCR para o SARS-CoV-2 negativo dentro das 72 horas anteriores à cirurgia. Vinte e quatro dessas crianças já haviam testado positivo para SARS-CoV-2 (RT-PCR ou teste de antígeno) entre 25 e 303 dias antes da cirurgia. Por meio de RT-PCR nos tecidos tonsilares, foi detectado o RNA do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em sete das nove amostras testadas de adenoide, e em 19 de 22 amostras de tonsilas palatinas do grupo que já havia tido comprovada infecção por COVID-19. Em contrapartida, nenhuma amostra tonsilar apresentou positividade no grupo de crianças sem história de infecção prévia pela COVID-19.

2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos:

1. Avaliar a prevalência de SARS-CoV-2 nas tonsilas e secreções respiratórias de crianças submetidas à adenotonsilectomia, sem sintomas de infecção de vias aéreas superiores nos 30 dias que precederam a cirurgia.
2. Avaliar se existe relação entre a expressão dos receptores ACE2 e TMPRSS2 e a positividade para SARS-CoV-2 nas tonsilas de crianças.

3. Casuística e Métodos

3.1 Considerações éticas

O estudo foi desenvolvido na Divisão de Otorrinolaringologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP) em conjunto com o Laboratório de Virologia da mesma Universidade. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCFMRP - USP, Processo nº CAAE: 31490720.1.0000.5440 (Anexo A). O estudo foi conduzido de acordo com as boas práticas clínicas e de laboratório e seguindo os princípios da Declaração de Helsinque.

3.2 Tipo de estudo e escolha dos pacientes

Foi realizado estudo clínico observacional do tipo transversal, conduzido entre outubro de 2020 e setembro de 2021. Foram selecionados pacientes entre três e 11 anos de idade com indicação de adenoidectomia e/ou tonsilectomia para o tratamento de tonsilites recorrentes ou sintomas de AOS. Todas as cirurgias foram realizadas no Hospital Estadual de Ribeirão Preto (HERP), um hospital de nível secundário, ligado ao HCFMRP.

Os critérios de exclusão foram: presença de sinais ou sintomas de infecção de vias aéreas superiores no mês anterior à cirurgia, malformações craniofaciais, síndromes genéticas, doenças de depósito, imunodeficiências ou suspeita de neoplasia de nasofaringe e/ou orofaringe.

É importante ressaltar que no período do estudo a vacinação contra a COVID-19 para crianças ainda não havia sido aprovada no Brasil. O início da vacinação na faixa etária entre cinco e onze anos no Brasil só teve início em janeiro de 2022.

No dia da cirurgia, os pais ou responsáveis legais das crianças que seriam submetidas à tonsilectomia e/ou adenoidectomia e não apresentavam nenhum critério de exclusão eram esclarecidos sobre o estudo e convidados a participar. Aqueles que aceitaram, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e as crianças que tinham capacidade de compreensão assinaram um Termo de Assentimento. Após, os pais ou responsáveis responderam um questionário contendo informações sobre os participantes da pesquisa (demográficas, dados

clínicos, e história de exposição prévia à COVID-19) (Anexo B). Todas as informações obtidas no questionário foram coletadas e armazenadas utilizando o software *REDCap* (Vanderbilt University - Tennessee, USA) (Harris et al., 2009, 2019).

3.3 Coleta e processamento de amostras

Durante a cirurgia, foram colhidas as seguintes amostras (Figura 8):

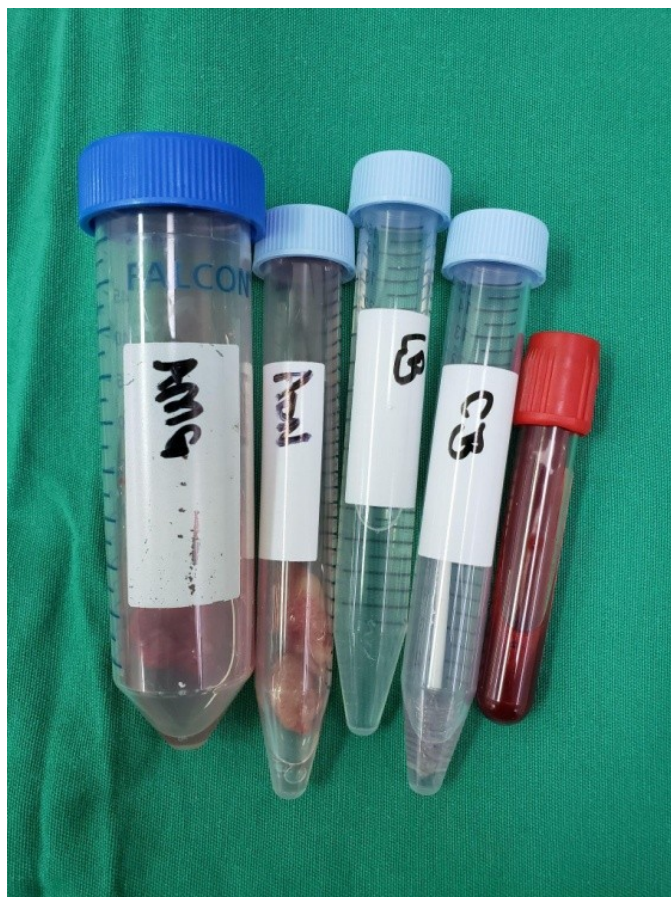
Lavado nasal: lavagem nasal bilateral com cerca de 10 ml de solução salina 0,9% seguida da aspiração em dispositivo coletor.

Cytobrush nasal: inserção de um pequeno *cytobrush* na região entre a concha média e o septo nasal em uma das fossas nasais, sob visualização com óptica rígida de 0°. Foi realizada rotação do *cytobrush* 10 vezes com colocação imediata em tubo estéril contendo meio RPMI com 4% de solução antibiótica/antimicótica (penicilina-estreptomicina 10,000 U/ml e anfotericina B 200 µg/ml) (Gibco, Gran Island, NY, USA).

Sangue periférico: Coleta de 4 ml de sangue periférico para sorologia.

Adenoide e/ou tonsila palatina: todas as cirurgias foram realizadas utilizando instrumentos frios e as amostras foram imediatamente colocadas em tubos estéreis contendo meio RPMI com 0% FBS e solução antibiótica-antimicótica 4% e mantidas em gelo até a chegada ao laboratório.

Figura 8 - Amostras colhidas de cada paciente durante a cirurgia de adenotonsilectomia



Uma vez no laboratório, as amostras teciduais foram lavadas em PBS (Tampão fosfato-salino) para remover debris e sangue. Depois foram divididas em quatro partes e processadas da seguinte forma: 1) Corte em pedaços de $0,25\text{ cm}^3$, tratados com colagenase (100 U/ml) e dispase (0,6 U/ml), e passados por um filtro de células de nylon (Falcon) para se obter uma suspensão de células; 2) Isolamento de células mononucleares por Ficoll-Paque™; 3) Colocado em fixador de Carnoy e embebido em parafina para histologia; 4. Mantido em meio de transporte viral (VTM) constituído por meio mínimo essencial (MEM) com 20% FBS e 15% glicerol, Trizol (Invitrogen) e RNA-later (Invitrogen). Com exceção dos tecidos embebidos em parafina, todas as amostras foram armazenadas a -70°C . A lavagem nasal e o *cytobrush* nasal foram diluídos em VTM e Trizol (Invitrogen) e centrifugados. As

células suspensas foram colocadas em lâminas, fixadas com acetona e armazenadas a -20°C.

3.3.1 Detecção do RNA do SARS-CoV-2

O RNA total foi extraído do tecido homogeneizado utilizando o reagente Trizol de acordo com as instruções do fabricante. O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado e quantificado pelo TaqMan™ PCR em tempo real (qRT-PCR) com *primers* e sondas para os genes N2 e E, de acordo com os protocolos propostos, respectivamente, pelos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA e o grupo Charité (Tabela 1).

Tabela 1 - Set de *primers* e sondas para detecção do SARS-CoV-2 por RT-PCR

Gene	Oligo	Sequência
E	Foward	5'-ACAGGTACGTTAATAGTTAATAGCGT-3'
	Reverse	5'-ATATTGCAGCAGTACGCACACA-3'
	Probe	5'-Fam- ACACTAGCCATCCTTACTGCGCTTCG-BHQ1-3'
N2	Foward	5'-TTA CAA ACA TTG GCC GCA AA-3'
	Reverse	5'-GCG CGA CAT TCC GAA GAA-3'
	Probe	5'-Fam-ACAATTTGCCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-3'
RNase-P	Foward	5'-AGATTTGGACCTGCGAGCG-3'
	Reverse	5'-GAGCGGCTGTCTCCACAAGT-3'
	Probe	5'-FAM-TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG-BHQ-1-3'

O ensaio qRT-PCR foi realizado em um volume final de 10 µl contendo 2 µl de RNA, 10 µM de *primers* direto e reverso, 5 µM de sonda específica e TaqMan qPCR BIO Probe 1-Step Go Separate-ROX (PCR Biosystems), utilizando equipamento de RT-PCR StepOnePlus (Applied Biosystems). Foram utilizados os seguintes parâmetros: 45°C por 10 minutos, 95°C por dois minutos e 40 ciclos de 95°C por cinco segundos e 60°C por 30 segundos. Todas as etapas experimentais descritas foram realizadas em salas separadas para evitar contaminação, e cada

placa continha controles positivos e negativos. Plasmídeos contendo produtos de PCR definidos por cada conjunto de *primers*, bem como estoques de vírus, foram usados como controles positivos. Água destilada ultrapura e sobrenadante de células VERO não infectadas foram usados como controles negativos. Todos os ensaios de SARS-CoV-2 qPCR foram realizados em triplicata e os resultados confirmados pela amplificação do gene RNaseP.

3.3.2 Imuno-histoquímica para SARS-CoV-2 em tecido adenotonsilar

Tecidos positivos e negativos para SARS-CoV-2 por qRT-PCR foram testados quanto à presença do antígeno SARS-CoV-2 por imuno-histoquímica. Fragmentos de tonsila palatina e tecido adenoideano foram fixados em Carnoy, desidratados, embebidos em parafina e, posteriormente, seccionados e colocados em lâminas de microscópio. As seções de tecido foram desparafinizadas, reidratadas e submetidas à recuperação antigênica por tratamento com tampão citrato a 95°C por 15 min. Após bloqueio da peroxidase endógena com 10% de H₂O₂ e incubação com SuperBlock™ (PBS) *Blocking Buffer*, as seções de tecido foram incubadas com anticorpo policlonal para nucleoproteína (NP) anti-SARS-CoV-2 primário de coelho (Creative Diagnostics) durante a noite. Os anticorpos primários foram detectados com o anticorpo secundário Universal *Immunoperoxidase Polymer* (Nichirei Biosciences), e o desenvolvimento da cor foi feito com o *kit* AEC (Vector Laboratory, Burlingame, CA, EUA), seguido de contracoloração com hematoxilina de Harris. As seções de tecido foram digitalizadas com *ScanScope* VS120 (Olympus Life Sciences, Tóquio, Japão) em campo claro usando ampliação de 400X.

3.3.3 Imunocoloração de fluorescência *in situ* para ACE2, TMPRSS2 e Spike SARS-CoV-2

As amostras de amígdalas foram fixadas com paraformaldeído (PFA) a 4% e bloqueadas com albumina sérica bovina (Sigma-Aldrich, Cat. A9418) em PBS. Todas as amostras foram coradas com os seguintes anticorpos: *Spike* anti-SARS-CoV-2 monoclonal de coelho (Invitrogen; clone T01KHuRb; Cat. 703959; 1:500), enzima conversora antiangiotensina policlonal de cabra 2 (ACE2; R&D systems ;

Cat. AF933; 1:200) e anti-TMPRSS2 monoclonal de camundongo (Millipore; Cat. MABF2158; Clone P5H9-A3). As lâminas foram lavadas com TBS-T (Tris-Buffered Saline com Tween 20) e incubadas com anticorpos secundários de alpaca antirrato IgG AlexaFluor 488 (Jackson ImmunoResearch; Cat. 615-545-214; 1:1000) e de alpaca anticoelho IgG AlexaFluor 594 (Jackson ImmunoResearch; Cat. 611-585-215; 1:1000). Os núcleos de todas as amostras foram corados com DAPI (Vector, Cat# H-1200-10). As imagens foram adquiridas pelo *Axio Observer* combinado com o microscópio confocal LSM 780 (Carl Zeiss) com ampliação de 63x na mesma configuração de zoom e taxa de laser. Finalmente, 10 campos por amostra foram analisados aleatoriamente no plano focal x e y para medir a intensidade média de fluorescência de ACE2 e TMPRSS2. As imagens adquiridas foram analisadas usando Fiji por *Image J*.

3.3.4 Coloração de imunofluorescência indireta para células *cytobrush* nasais infectadas com nucleoproteína SARS-CoV-2

Para análise da infecção por NP no *cytobrush* nasal, as células foram fixadas com PFA a 4% em PBS por 15 minutos e depois lavadas três vezes com PBS. Para detectar antígenos virais nas células, utilizou-se o anticorpo policlonal anti-SARS-CoV-2 NP primário (Creative Diagnostics) a 37°C por uma hora. Após o bloqueio com SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer, um anticorpo secundário anticoelho conjugado com 594 (Abcam cat. ab150116) foi adicionado para coloração. Os núcleos foram corados com DAPI (Thermo Fisher cat. 62248) e as imagens foram obtidas com microscópio confocal de fluorescência Leica TCS SP8 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

3.3.5 Teste imunocromatográfico rápido IgG/IgM

A detecção de imunoglobulinas anti SARS-CoV-2 nas amostras de sangue foi realizada utilizando o *kit* de teste rápido Egens COVID-19 IgM/IgG (Nantong Egens Biotechnology Co., Ltd.) e o *kit* de teste IgG/IgM para novo coronavírus (2019-nCoV) (Genrui Biotech Inc.), seguindo as orientações dos fabricantes. Ambos os testes detectam IgM e IgG separadamente em amostras de soro, plasma e sangue total. De acordo com os fabricantes, a sensibilidade do *kit* é de 84,6% e 75,4% para IgG e 72,3% e 67,7% para IgM, respectivamente, e a especificidade é de 90,9% e 99,5% para IgG e 89,3% e 95,4% para IgM, respectivamente (Tollânes et al., 2021).

4. Resultados

4.1 Dados demográficos e clínicos (Tabela 2)

Quarenta e oito pacientes com idade entre três e onze anos (média $5,9 \pm 2,0$) foram incluídos no estudo entre outubro de 2020 e setembro de 2021, sendo 30 meninos (62,5%) e 18 meninas (37,5%). Em relação à etnia, 56,2% dos pacientes eram de origem caucasiana e 43,8% de origem afro-americana. De acordo com o questionário preenchido no dia da cirurgia, a principal indicação cirúrgica foi a presença de roncos e apneias (56,3%). Oito pacientes (16,7%) tiveram indicação cirúrgica por apresentarem tonsilites recorrentes e treze (27%) por apresentarem as duas queixas. Entre as comorbidades, 19 (39,6%) referiram possuir rinite alérgica, seis (12,5%) referiram otite média aguda recorrente ou otite média serosa crônica, quatro (8,3%) asma e um (2,1%) referiu doença do refluxo gastroesofágico (DRGE). Metade dos pacientes (50%) negou quaisquer comorbidades.

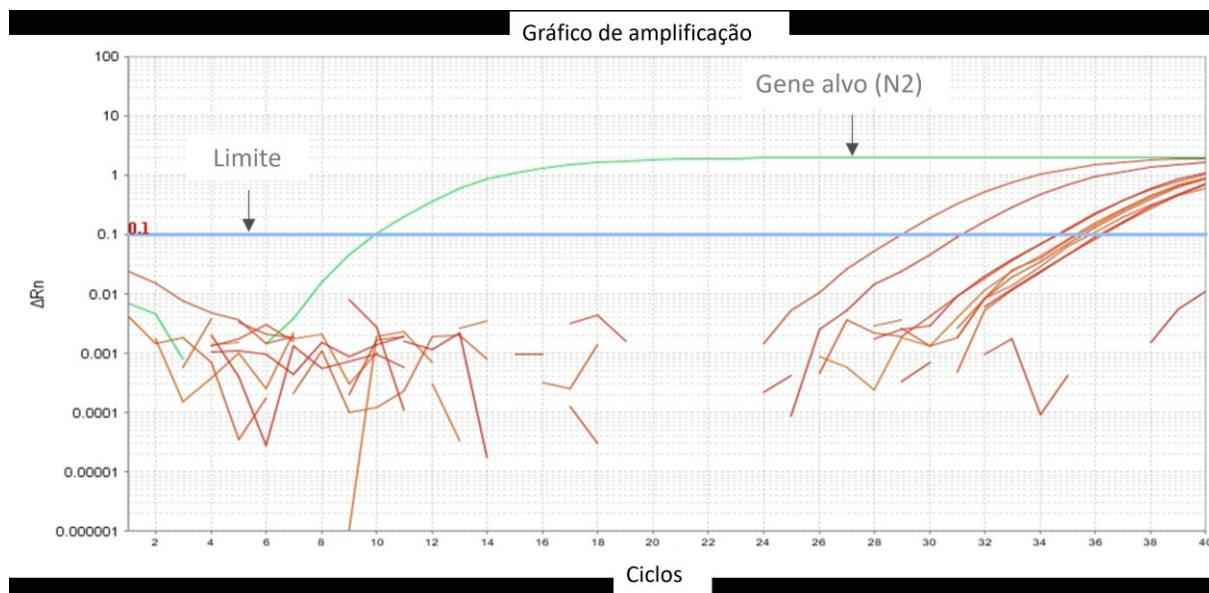
Tabela 2 - Dados demográficos e clínicos

Características	Número de pacientes (%)
Sexo	
Masculino	30 (62,5%)
Feminino	18 (37,5%)
Idade	
3 a <6	23 (47,9%)
6 a <9	17 (35,4%)
9 a <12	8 (16,7%)
Indicação cirúrgica	
Distúrbio respiratório do sono	27 (56,3%)
Tonsilites recorrentes	8 (16,7%)
Ambos	13 (27%)
Doenças associadas	
Rinite alérgica	19 (39,6%)
Otite média recorrente	6 (12,5%)
Asma	4 (8,3%)
Nenhuma	24 (50%)
Diagnóstico prévio de COVID-19	2 (4,1%)
Contato prévio com pessoa infectada	8 (16,7%)

De acordo com os pais ou responsáveis legais, oito crianças foram expostas a um contactante domiciliar com COVID-19 confirmado entre 40 dias e seis meses antes da cirurgia. Apenas dois pacientes (4,2%) tiveram um teste de COVID-19 positivo antes da cirurgia: um teve um teste de IgM positivo para SARS-CoV-2 três meses antes da cirurgia e o outro teve um teste RT-PCR SARS-CoV-2 positivo cinco meses antes da cirurgia. Os pais ou responsáveis legais referiram que o último episódio de tonsilite bacteriana havia ocorrido entre um mês e 24 meses antes da cirurgia (média de 9,2 meses) e o último episódio de IVAS (infecções das vias aéreas superiores) entre 31 e 720 dias antes da cirurgia (média de 278 dias). Apenas uma criança se queixou de alteração do olfato meses antes da cirurgia, mas na ocasião ela não foi submetida ao teste de COVID-19.

4.2 Detecção do RNA e antígeno do SARS-CoV-2 nas amostras

Foram colhidas 232 amostras: 45 de tonsilas palatinas, 43 de adenoides, 48 *cytobrushes* nasais, 48 lavados nasais e 48 amostras de sangue. O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado por qRT-PCR em pelo menos uma amostra de 12 dos 48 pacientes (25%) (Figura 9). Entre os 12 pacientes com pelo menos uma amostra positiva, oito (66,7%) também apresentaram positividade em outras amostras (Tabela 4). As taxas de detecção de SARS-CoV-2 foram de 20% em tonsilas palatinas, 16% em adenoides, 10% em *cytobrushes* nasais e 6% em lavados nasais. As cargas virais de SARS-CoV-2 variaram amplamente de 186 a 7114 cópias de equivalentes de genoma por μg de RNA, considerando tonsilas palatinas e adenoides, lavados nasais e *cytobrushes* nasais e, embora a carga viral média nos tecidos tonsilares tenha sido cerca de duas vezes maior do que nas amostras nasais, não houve diferença significativa entre as amostras.

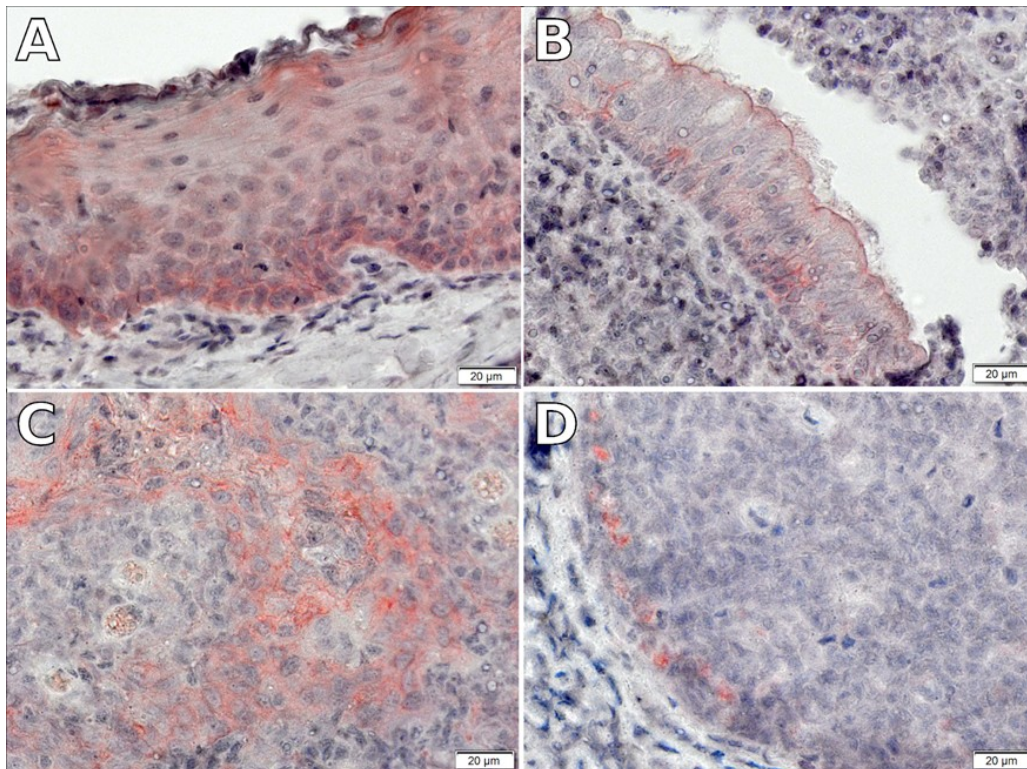
Figura 9 - Gráfico de amplificação das amostras positivas pelo qRT-PCR

Entre os pacientes com pelo menos uma amostra positiva, apenas um tinha história de teste positivo para o SARS-CoV-2 cinco meses antes da cirurgia (RT-PCR) e quatro foram expostos a um contactante domiciliar com COVID-19 confirmado entre 40 dias e seis meses antes da cirurgia. Cinco das 12 crianças SARS-CoV-2 positivas (41,7%) não tinham comorbidades. Entre aquelas com história de comorbidades, a mais frequente foi a rinite alérgica (4 de 12).

Infecção ou exposição prévia também ocorreu em crianças com amostras negativas neste estudo. Uma criança havia testado positivo para o SARS-CoV-2 três meses antes da cirurgia e quatro crianças foram expostas a um contactante domiciliar com COVID-19, confirmado entre 49 dias e 13 meses antes da cirurgia.

Foi realizada imuno-histoquímica em todas as 16 amostras de tecido positivas para SARS-CoV-2 (9 tonsilas palatinas e 7 adenoides), e dois terços delas foram positivas para o antígeno SARS-CoV-2, detectado no epitélio tonsilar e também em células dispersas no compartimento linfóide, incluindo folículos linfóides e áreas extrafoliculares (Figura 10).

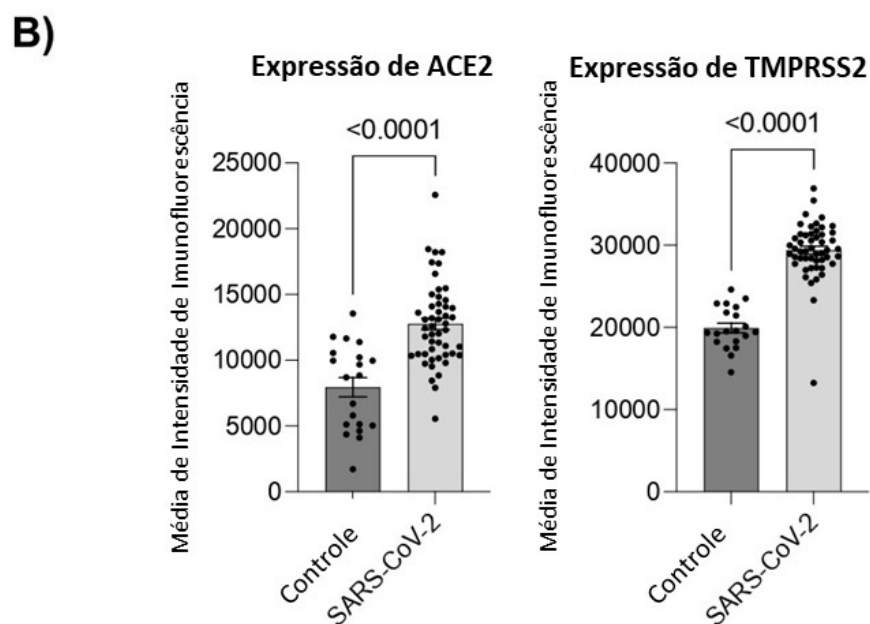
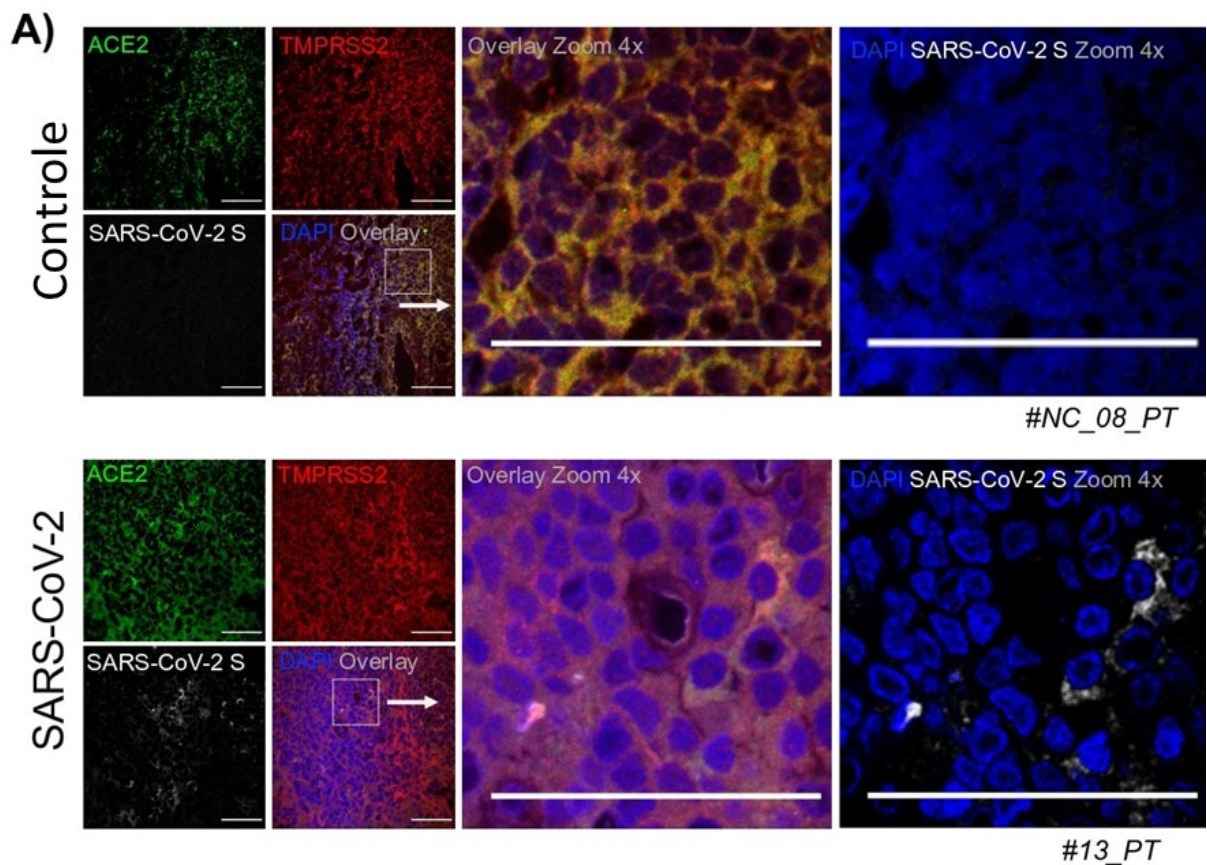
Figura 10 - Amostras de imuno-histoquímica demonstrando positividade para o SARS-CoV-2 (A) adenoide (epitélio), e (B, C e D) tonsila palatina: (B) epitélio, (C) zona extrafolicular; e (D) folicular



4.3 Expressão de ACE2 e TMPRSS2 em tonsilas

A imunofluorescência revelou que a expressão dos antígenos de ACE2 e TMPRSS2 em secções de tecido tonsilar foram significativamente mais intensas nas amostras positivas para a proteína *spike* SARS-CoV-2 em comparação aos negativos (Figura 11A). As diferenças médias na intensidade de fluorescência entre pacientes infectados e não infectados por SARS-CoV-2 foram $4815,0 \pm 840,8$ para ACE2 e $9471,0 \pm 847,5$ para TMPRSS2 ($p < 0,0001$) (Figura 11B).

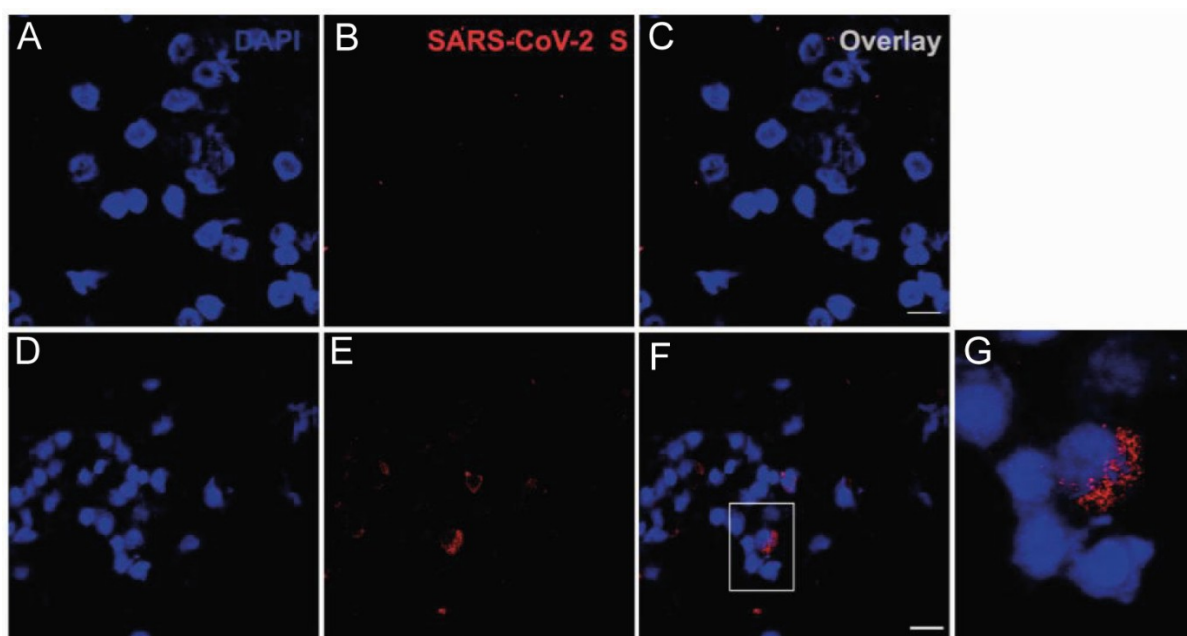
Figura 11 - (A) Figura de imunofluorescência demonstrando a expressão de ACE-2 e TMPRSS2 na amostra de tecido tonsilar de pacientes controles e pacientes positivos para a presença da proteína *spike* do SARS-CoV-2; **(B)** Gráfico demonstrando o aumento na expressão de ACE2 e TMPRSS2 nos tecidos positivos para o SARS-CoV-2 em relação aos negativos



4.4 Detecção do antígeno de SARS-CoV-2 em *cytobrushes* nasais

Entre os cinco pacientes que apresentaram qRT-PCR positivo para SARS-CoV-2 no *cytobrush*, (todos também positivos nos tecidos tonsilares), a imunofluorescência das células do *cytobrush* revelou positividade para SARS-CoV-2 em dois deles (Figura 12).

Figura 12 - Imunofluorescência de células do epitélio nasal revelando positividade para o SARS-CoV-2



4.5 Sorologia SARS-CoV-2

Foram realizados testes rápidos para anticorpos IgM e IgG anti-SARS-CoV-2 em 11 dos 12 pacientes positivos para SARS-CoV-2 (pela disponibilidade de soro), e a IgG foi detectado em cinco desses pacientes (45%), enquanto nenhum paciente apresentou positividade para IgM (Tabela 4). Os soros de todos os cinco pacientes IgG positivos foram capazes de neutralizar o SARS-CoV-2 *in vitro*, ainda que em títulos baixos, conforme determinado por VNT100. Isso indica que pelo menos cinco dos 12 pacientes positivos para SARS-CoV-2 haviam sido previamente expostos ao vírus (mesmo sem história positiva) e não estavam na fase aguda da infecção.

Tabela 3 - Dados demográficos, clínicos e resultados de RT-PCR e sorologia de cada participante do estudo. Em destaque as crianças que tiveram pelo menos uma das amostras positivas para o SARS-CoV-2

ID	Idade	Sexo	Etnia	Indicação cirúrgica	Doenças associadas	Diagnóstico prévio de COVID-19	Contato prévio com pessoa infectada	Amostras positivas para o SARS-CoV 2	Ct para o gene E	Ct para o Gene N2	Teste sorológico
1	6	Masculino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica e otite média recorrente	Não	Não	Nenhuma			
2	5	Feminino	Afroamericana	DRS	Rinite alérgica e otite média recorrente	Sim (94 dias antes da cirurgia) - sorologia	Não	Nenhuma			
3	6	Feminino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica e asma	Não	Não	Nenhuma			
4	3	Masculino	Afroamericana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
5	10	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Não	Não	Adenoide	32.7	30.7	Não realizado
6	10	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
7	5	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes e DRS	Asma	Não	Não	Tonsila palatina	32.3	34.1	Negativo
								Adenoide	32.9	32.7	
8	7	Feminino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
9	5	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
10	4	Feminino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
11	8	Masculino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
12	5	Feminino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Lavado nasal	31.2	29.7	
13	8	Masculino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
14	6	Masculino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
15	5	Masculino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
16	3	Masculino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica e asma	Não	Não	Nenhuma			
17	7	Masculino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Otite média recorrente	Não	Não	Tonsila palatina	31.4	28.3	Negativo
								Cytobrush	31.9	27.7	
18	4	Feminino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes e DRS	Nenhuma	Não	Não	Tonsila palatina	28.5	25.3	Negativo
								Cytobrush	31.6	25.6	
19	3	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Tonsila palatina	31.2	29.1	IgG
								Cytobrush	28.8	26.5	
								Lavado nasal	31.4	28.7	
20	11	Feminino	Afroamericana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			

continua

continuação

ID	Idade	Sexo	Etnia	Indicação cirúrgica	Doenças associadas	Diagnóstico prévio de COVID-19	Contato prévio com pessoa infectada	Amostras positivas para o SARS-CoV 2	Ct para o gene E	Ct para o Gene N2	Teste sorológico
21	6	Feminino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
22	9	Feminino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Sim (156 dias antes da cirurgia) - PCR	Sim (156 dias antes da cirurgia) - PCR	Tonsila palatina Adenoide Cytobrush Lavado nasal	27.8 31.4 32.9 32.6	28.4 32.2 34.2 31.6	IgG
23	5	Masculino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
24	5	Masculino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
25	8	Masculino	Afroamericana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
26	6	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Otite média recorrente	Não	Não	Nenhuma			
27	4	Feminino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Tonsila palatina Cytobrush	34.9 36.01	35 35	Negativo
28	3	Feminino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
29	6	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes e DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Tonsila palatina Adenoide Cytobrush	32.6 30.7 35	32.2 31.1 34	Negativo
30	3	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
31	5	Feminino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
32	4	Feminino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Nenhuma	Não	Sim (399 dias antes da cirurgia) - PCR	Nenhuma			
33	8	Masculino	Afroamericana	DRS	Rinite alérgica e otite média recorrente	Não	Não	Nenhuma			
34	4	Masculino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
35	8	Feminino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Não	Nenhuma			
36	4	Feminino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Sim (49 dias antes da cirurgia) - PCR	Tonsila palatina Adenoide	33 31	31 27	IgG
37	3	Feminino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes e DRS	Nenhuma	Não	Sim (49 dias antes da cirurgia) - PCR	Nenhuma			
38	5	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Otite média recorrente	Não	Não	Nenhuma			
39	7	Masculino	Caucasiana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
40	5	Masculino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
41	7	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			

continua

conclusão

ID	Idade	Sexo	Etnia	Indicação cirúrgica	Doenças associadas	Diagnóstico prévio de COVID-19	Contato prévio com pessoa infectada	Amostras positivas para o SARS-CoV 2	Ct para o gene E	Ct para o Gene N2	Teste sorológico
42	9	Masculino	Afroamericana	Tonsilites recorrentes e DRS	Nenhuma	Não	Sim (61 dias antes da cirurgia) - PCR	Adenoide	35.4	33.8	IgG
43	4	Masculino	Afroamericana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
44	3	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Não	Nenhuma			
45	6	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Sim (119 dias antes da cirurgia) - PCR	Nenhuma			
46	7	Feminino	Afroamericana	DRS	Asma	Não	Não	Nenhuma			
47	10	Feminino	Caucasiana	DRS	Rinite alérgica	Não	Sim (535 dias antes da cirurgia) - PCR	Tonsila palatina	33	29	IgG
48	10	Masculino	Caucasiana	DRS	Nenhuma	Não	Sim (173 dias antes da cirurgia) - PCR	Nenhuma			

5. Discussão

Estudos anteriores à pandemia demonstraram que vírus respiratórios podem infectar de forma assintomática as tonsilas e adenoides de uma parcela significativa das crianças submetidas à adenotonsilectomia (Proenca-Modena et al., 2012; Yeshuroon-Koffler et al., 2015; Faden et al., 2016; Buzatto et al., 2017). Entre eles, coronavírus endêmicos, não SARS-CoV-2, como o 229E, o NL63 e o OC43 já foram encontrados em tecidos tonsilares com prevalência entre 3,3 (Proenca-Modena et al., 2012) e 23,7% (Faden et al., 2016).

Devido à sua localização na faringe e à sua especificidade enquanto tecido linfóide, as tonsilas palatinas e adenoides constituem a primeira linha de defesa do organismo humano contra vírus inalados ou ingeridos. No entanto, pouco se sabe sobre as respostas imunes ao SARS-CoV-2, ou a interação entre patógenos e hospedeiros nesses tecidos.

O presente estudo demonstrou que até 25% das crianças submetidas à adenotonsilectomia apresentam RNA e proteínas do SARS-CoV-2 em secreções respiratórias e/ou tecidos tonsilares, mesmo na ausência de história recente de COVID-19 ou de sintomas agudos de infecção de vias aéreas superiores. Além disso, 15 das 16 amostras de tecido linfóide (tonsilas palatinas e adenoide) com qRT-PCR positivo também apresentaram fragmentos virais detectados por imunohistoquímica, tanto no epitélio como no tecido folicular e extrafolicular. Entre as crianças com amostras positivas, apenas uma tinha evidência de COVID-19 prévia, confirmada por RT-PCR, cerca de cinco meses antes da cirurgia.

Poucos estudos avaliaram a presença do SARS-CoV-2 em tonsilas. Kadriyan et al. (2021) identificaram RNA do SARS-CoV-2 nas tonsilas palatinas de dois pacientes submetidos à tonsilectomia por tonsilites recorrentes e que haviam tido infecção prévia pelo SARS-CoV-2. Muderris et al. (2022) utilizaram o RT-PCR para testar amostras de tonsilas palatinas e adenoides de 32 pacientes submetidos à tonsilectomia com ou sem adenoidectomia e encontraram positividade em 4,2% das amostras. Todos os pacientes tiveram um teste de *swab* de naso e orofaringe (RT-PCR) para o SARS-CoV-2 negativo até 24 horas antes da cirurgia. Já Wong et al. (2021) avaliaram amostras tonsilares provenientes de autópsias de oito pacientes entre 55 e 83 anos que foram a óbito em decorrência da COVID-19. Os autores

detectaram RNA genômico e replicante do SARS-CoV-2, além da expressão da ACE-2 e da TMPRSS2, nas tonsilas palatinas de sete desses pacientes.

Mais recentemente, Xu et al. (2023) avaliaram amostras de tonsilas de 110 crianças submetidas à tonsilectomia e/ou adenoidectomia entre setembro de 2020 e janeiro de 2021 em Washington DC, todas com *swab* negativo para o SARS-CoV-2 até 72 horas antes da cirurgia. Dessas, 24 tinham evidência de COVID-19 prévia (RT-PCR ou sorologia). Utilizando ddPCR (droplet digital PCR), os autores encontraram RNA do nucleocapsídeo do SARS-CoV-2 em sete de nove adenoides e 15 de 22 amígdalas de indivíduos que haviam sido infectados previamente por COVID-19, e em nenhuma amostra dos indivíduos sem evidência ou história prévia de COVID-19.

Essa taxa de positividade de 25% é superior à apresentada pelos estudos do início da pandemia, que sugeriram menores taxas de infecção pelo SARS-CoV-2 em crianças em comparação com adultos (Li Q et al., 2020). Essa diferença entre os achados pode ser decorrente da intensa circulação do SARS-CoV-2 no Brasil em 2021 e/ou da maior propensão do SARS-CoV-2 para infectar tonsilas.

Li Q et al. (2020) analisaram as características de 425 casos de COVID-19 confirmados por RT-PCR até 22 de janeiro de 2020 e não encontraram nenhuma criança na faixa etária de zero a quinze anos. Ma et al. (2021), em estudo de meta-análise sobre infecção assintomática pelo SARS-CoV-2, incluindo 95 estudos publicados até fevereiro de 2021 e 29.776.306 indivíduos de diversas origens e países, encontraram prevalência de 1,27% de infecção assintomática entre os indivíduos testados de zero a 19 anos, e ainda observaram que 60,21% dos indivíduos que testaram positivo com idade até 19 anos de idade eram assintomáticos.

Um estudo nacional no Reino Unido realizou rastreamento de prevalência de casos de COVID-19 em toda a Inglaterra por meio de amostragem aleatória na sua população. Os pesquisadores testaram 600.000 indivíduos em quatro datas diferentes entre os dias 1º de maio e 8 de setembro de 2020, independentemente dos sintomas, e relataram prevalência máxima de aproximadamente 0,2% na faixa etária de cinco a doze anos e de 0,25% na faixa etária de 12 a 17 anos (Riley et al., 2021).

Outro estudo de *screening* nos moradores de Wuhan entre 23 de janeiro e 8 de abril de 2020 identificou apenas 300 casos positivos na coorte entre seis e 17 anos de idade, o que representava apenas 0,00124% daquela população do estudo, todos pacientes assintomáticos (Cao et al., 2020). Estudo semelhante realizado no Japão entre dezembro de 2021 e fevereiro de 2022 testou mais de um milhão de indivíduos assintomáticos com RT-PCR para o SARS-CoV-2 e encontrou taxa de positividade máxima de cerca de 0,8% em indivíduos menores de 20 anos (Suzuki et al., 2022). Apesar de baixa, essa taxa foi maior que em outras faixas etárias. Além dos estudos de *screening* populacional, a prevalência de testes positivos entre crianças também é inferior quando comparada a de adultos.

Mehta et al. (2020) publicaram uma revisão sistemática que incluiu 24 artigos, contendo quase que exclusivamente dados e experiências da China. Essa revisão cita uma análise nacional dos primeiros 72.314 casos de COVID-19 na China, até 11 de fevereiro de 2020, em que apenas 2,1% eram crianças entre zero e 19 anos.

O CDC da Coreia do Sul (KDCA), um dos países com maior taxa de testagem do mundo, reportou número três vezes maior: até março de 2020, em torno de 6,3% de todos os casos com resultado positivo para COVID-19 eram de crianças entre zero e 19 anos.

Uma das explicações para a baixa taxa de crianças entre os casos de COVID-19 foi a adoção de medidas de isolamento social por muitos países logo no início da pandemia com o objetivo de conter a transmissão do SARS-CoV-2. Para as crianças, o isolamento social significou o fechamento das escolas e, uma vez em casa, elas foram menos expostas ao vírus e a pessoas infectadas.

No Brasil, a pandemia de COVID-19 levou ao fechamento das escolas em março de 2020. De acordo com relatório da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) de setembro de 2021 (OCDE, 2021), o Brasil foi o país que manteve as escolas pré-primárias e primárias fechadas por mais tempo em 2020, totalizando 178 dias.

O retorno gradual às aulas iniciou em abril de 2021, portanto durante o período de coleta das amostras para este estudo, a maioria das crianças não estava frequentando a escola. No entanto, é fundamental considerar nesta análise de resultados, o recorte socioeconômico em que essas crianças estavam inseridas.

Todas as cirurgias foram realizadas em um hospital público de nível secundário em Ribeirão Preto/SP. Esse hospital atende, em sua maioria, as populações de classe média-baixa e média. Para as crianças que participaram do estudo, o fechamento das escolas não significou necessariamente isolamento social. Muitos pais ou responsáveis eram trabalhadores essenciais ou autônomos e não tiveram a possibilidade do trabalho remoto. Mesmo os que conseguiram ficar em casa tiveram que voltar ao trabalho presencial antes da reabertura das escolas. Isso significou que muitas crianças ficaram sob os cuidados de terceiros, ou em contato com pessoas expostas, o que pode justificar a alta taxa de positividade encontrada.

Na tentativa de comparar os dados encontrados com a população brasileira, ficou evidente que existe dificuldade em obter a real prevalência da infecção pelo SARS-CoV-2 em crianças no Brasil, assim como a taxa de crianças entre os casos de COVID-19. Isso porque desde o início da pandemia, o Brasil foi um dos países que menos testou sua população. Em outubro de 2021, quando terminou o período de coleta para a presente pesquisa, o Brasil era o 125º país no *ranking* mundial de testes para COVID-19 (Worldometer, 2023). A maior parte dos dados foi obtida por meio do Sivep-Gripe, plataforma do Ministério da Saúde que reúne informações sobre os casos de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) por COVID-19 no país.

De acordo com os boletins epidemiológicos do Ministério da Saúde (Brasil, 2023), em 2020, entre os casos de SRAG por COVID-19, 2,44% eram crianças. Em 2021 essa porcentagem diminuiu para 1,69%. Porém, é difícil estimar o número de crianças que foram de fato infectadas pelo SARS-CoV-2 no Brasil desde o início da pandemia, porque os dados do Sivep-Gripe não incluem casos assintomáticos, leves ou moderados da doença. Como a maioria das crianças e adolescentes é assintomática ou apresenta sintomas leves, eles raramente procuram atendimento médico ou testes para infecção por SARS-CoV-2 (Sousa; Silva; Ferraro, 2022).

Dois estudos demonstram o impacto de fatores sociais e regionais na dinâmica da pandemia no Brasil. O primeiro avaliou a dinâmica da infecção pelo SARS-CoV-2 em 667 contactantes domiciliares de 259 crianças entre zero e 14 anos, moradoras de uma favela do Rio de Janeiro, entre maio e setembro de 2020. Esses contactantes procuraram a Unidade Básica de Saúde (UBS) por vários

motivos, independentes da COVID-19. De todas as crianças testadas, 45 (13,9%) realizaram um teste de RT-PCR para o SARS-CoV-2, sendo que 74,3% delas eram assintomáticas. Todas as crianças tiveram contato com um adulto com evidência de infecção recente (Lugon et al., 2021). O segundo estudo de *screening*, realizado no sul do Brasil com 12.558 voluntários (membros da comunidade acadêmica e seus parentes), assintomáticos ou com sintomas leves, encontrou taxa de positividade no teste de PCR para o SARS-CoV-2 de apenas 1,28% (Adamoski et al., 2021).

Os achados do presente estudo acendem um alerta para o quanto as crianças brasileiras estão vulneráveis à infecção pelo SARS-CoV-2. De fevereiro de 2020 a setembro de 2021 foram 31.638 casos de SRAG relacionada à COVID-19 em crianças, com 2383 mortes (Sousa; Silva; Ferraro, 2022). Esses números levaram o Brasil a ser considerado o país com maior mortalidade pediátrica pela COVID-19 do mundo em 2020, com índice de 23 mortes para cada 1.000.000 de crianças (Kitano et al., 2021). Soma-se a isso, a baixa cobertura vacinal entre as crianças brasileiras. De acordo com o último boletim epidemiológico do Ministério da Saúde (Brasil, 2023) de 6 de abril de 2023, das 33,4 milhões de crianças entre seis meses e 11 anos, aptas a serem imunizadas, apenas 11,7 milhões (35% do total) tomaram a segunda dose da vacina.

Essa vulnerabilidade é pouco perceptível porque as crianças apresentam mais frequentemente formas assintomáticas ou leves da doença em comparação aos adultos (Castagnoli et al., 2020; CDC COVID-19 Response Team, 2020), e por isso são menos submetidas a testes diagnósticos. É necessário ressaltar que, no presente estudo, 25% das crianças apresentaram o vírus nas tonsilas e/ou secreções respiratórias, sem terem manifestado nenhum sintoma de infecção aguda de vias aéreas superiores nos últimos 30 dias.

Tanto os estudos que analisaram a prevalência de SARS-CoV-2 por faixa etária como os que compararam intensidades de sintomas de COVID-19 entre crianças e adultos, podem passar falsa impressão de que as crianças são menos suscetíveis à exposição ao vírus.

Bi et al. (2020) avaliaram 1.286 contactantes próximos de indivíduos com COVID-19 na China e descobriram que as taxas de infecção em crianças de zero a 19 anos (7,3%) foram ligeiramente superiores às de adultos mais jovens (20-49

anos) (5,7%). Já Laws et al. (2021) estudaram 188 contactantes nos Estados Unidos e encontraram taxas de infecção secundária semelhantes para adultos (30%) e crianças (28%). Esses dois estudos reforçam que não há muita diferença de suscetibilidade ao SARS-CoV-2 entre adultos e crianças quando expostos ao contato próximo com uma pessoa infectada.

Entre os participantes do presente estudo, oito das 48 crianças tiveram contato próximo a um indivíduo que testou positivo para COVID-19 entre 40 dias e seis meses antes da cirurgia. Dessas, apenas uma criança tinha histórico de teste de RT-PCR positivo para COVID-19 cinco meses antes da cirurgia. Dessas oito crianças, quatro tiveram pelo menos uma amostra colhida no dia da cirurgia positiva para o SARS-CoV-2.

Além das questões epidemiológicas, o presente estudo levantou a questão sobre a segurança das cirurgias otorrinolaringológicas durante a pandemia. Considerando que o vírus pode sobreviver em superfícies por 72 horas e no ar por mais de 3 horas, procedimentos cirúrgicos geradores de aerossol, realizados no nariz, cavidade oral, faringe e traqueia devem ser considerados de alto risco de transmissão.

Entre as especialidades médicas, os otorrinolaringologistas estão entre os profissionais mais expostos à transmissão. No auge da pandemia, a Academia Americana de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço, assim como outras sociedades, chegou a recomendar que todos os otorrinolaringologistas limitassem seus atendimentos aos pacientes com condições médicas emergentes, como obstrução de via aérea, remoção de corpo estranho, complicações orbitárias de sinusites, epistaxe, mastoidite, entre outros (Al-Jabir et al., 2020). A maioria dos autores orientou suspender ou adiar cirurgias eletivas, embora alguns tenham alertado para o risco de sobrecarregar o sistema de saúde no futuro (Sharma; Bhardwaj, 2021).

A Universidade de Stanford chegou a publicar um *guideline* sobre precauções que o time cirúrgico deveria adotar antes de realizar uma cirurgia durante a pandemia, entre elas a realização apenas de procedimentos de urgência e emergência. De acordo com o *guideline*, os procedimentos otorrinolaringológicos são considerados de alto risco para transmissão do SARS-CoV-2. Todos os pacientes

deveriam ser triados em relação aos sintomas. Os sintomáticos deveriam ter sua cirurgia adiada enquanto os assintomáticos deveriam ser testados com RT-PCR e, caso o teste fosse negativo, o procedimento deveria ser realizado com todas as precauções (Forrester et al., 2020).

Infelizmente no Brasil, apesar de o guia do Ministério da Saúde para retomada de atividades eletivas recomendar a realização de triagem de sintomas respiratórios e testagem com RT-PCR entre 48 e 72 horas antes do procedimento cirúrgico (EBSERH, 2020), muitos hospitais da rede pública não dispunham de testes suficientes para atender a demanda. Dessa forma, os procedimentos foram adiados até que os números da pandemia melhorassem e, com o retorno das cirurgias eletivas, a triagem utilizada foi apenas a de sintomas respiratórios.

No entanto, o presente estudo demonstrou que nem a triagem meramente clínica e nem a testagem com RT-PCR são capazes de assegurar o *status* de infecção do paciente, uma vez que 12 de 48 pacientes tinham pelo menos uma amostra com RT-PCR positivo para o SARS-CoV-2 nas vias aéreas de forma assintomática e entre esses 12, apenas três apresentavam o vírus nas secreções respiratórias. Os outros nove apresentavam o vírus na mucosa nasal e nos tecidos tonsilares, mas lavado negativo. Esses pacientes, portanto, teriam obtido *swab* negativo, considerados aptos à cirurgia sob esse critério.

O RNA do SARS-CoV-2 foi detectado por qRT-PCR em mais de uma amostra de algumas das crianças positivas para o vírus, com cargas virais variando de centenas a milhares de cópias por micrograma de RNA, sugerindo que elas podem ter sido submetidas à adenotonsilectomia em diferentes momentos pós-infecção. É importante ressaltar que cinco das 12 crianças eram IgG positivas, mas nenhuma era IgM positiva para SARS-CoV-2, o que confirma que nenhuma delas tinha sido recentemente sensibilizada ao vírus. Além da detecção do RNA do SARS-CoV-2, que pode ser considerado como remanescente de uma infecção passada, o presente estudo revelou proteína viral estrutural *in situ* em adenoides e tonsilas palatinas, tanto em células epiteliais como linfomononucleares de diferentes compartimentos linfoides. Esta informação nunca havia sido antes demonstrada e fornece mais evidências para a presença de síntese de proteínas virais, portanto atividade viral, em tonsilas de crianças sem COVID-19 evidente.

As proteínas ACE2 e TMPRSS2 são altamente expressas no trato respiratório superior (Sungnak et al., 2020). Um estudo retrospectivo que examinou o epitélio nasal de 305 indivíduos entre quatro e 60 anos demonstrou que a expressão de ACE2 no epitélio nasal depende da faixa etária, sendo menor em crianças. Esse estudo sugeriu que a menor expressão de ACE2 no epitélio nasal de crianças poderia explicar a menor prevalência de SARS-CoV-2 neste grupo (Bunyavanich; Do; Vicencio, 2020).

Em relação à expressão de ACE2 pelo tecido tonsilar, a literatura traz dados conflitantes sugerindo que pode ser fraca a moderada (Descamps et al., 2020) até substancial (Huang et al., 2021; Hara et al., 2022). Ziegler et al. (2020) encontraram regulação positiva da expressão de ACE2 e TMPRSS2 nas células secretoras de amostras de etmoide e concha inferior após exposição ao IFN-alfa.

Essa regulação positiva pode ajudar a explicar o achado de expressões ainda mais altas de ACE2 e TMPRSS2 em tonsilas infectadas com SARS-CoV-2 (Hara et al., 2022). Alternativamente, uma expressão constitutiva mais alta de ACE2 e TMPRSS2, dependendo da variação individual, pode predispor algumas crianças à infecção por SARS-CoV-2 nas tonsilas. No entanto, pouco se sabe sobre a expressão dessas proteínas em tecidos tonsilares.

Este estudo teve algumas limitações, por ter sido adotado um modelo experimental transversal, ou seja, não era possível o acesso à cepa viral no momento da infecção da criança, tampouco meses após. A realização de novos testes meses após a cirurgia poderiam ter confirmado se o vírus ainda estava presente, e se teria sido da mesma cepa. Ainda, o fato de a maioria delas ter o SARS-CoV-2 nas amostras, mas sem histórico de infecção, dificultou a definição clara de correlações entre a duração da infecção e as cargas virais no momento da adenotonsilectomia.

Apesar das limitações, este é o primeiro estudo a demonstrar que o SARS-CoV-2, pode permanecer por tempo prolongado, clinicamente silencioso, no trato respiratório superior de crianças. Além do RNA do SARS-CoV-2, a proteína viral também foi detectada em tonsilas palatinas, adenoides e células epiteliais nasais, o que confirma não se tratar de falsos positivos no RT-PCR. Mesmo que não tenha sido avaliada a viabilidade do vírus, este achado acende o alerta para o SARS-CoV-

2 persistir no tecido nasal (cytobrush) e linfoide de forma crônica, acendendo também o alerta para a possibilidade de replicação e transmissão viral por pessoas assintomáticas.

7. Conclusões

O presente estudo evidenciou que até 25% das crianças submetidas à adenotonsilectomia na ausência de sintomas de infecção aguda de vias aéreas superiores apresentaram RNA do SARS-CoV-2 nas tonsilas palatinas, adenoides e secreções respiratórias. A positividade em RT-PCR foi confirmada pela presença do antígeno em imuno-histoquímica em tecidos na maioria das crianças. Além disso, demonstrou expressão das proteínas ACE2 e TMPRSS2 nas tonsilas palatinas e adenoides dessas crianças, e foi significativamente maior nos tecidos de pacientes infectados pelo SARS-CoV-2.

7. Referências Bibliográficas¹

¹Elaboradas de acordo com as Diretrizes para Apresentação de Dissertações e Teses da USP: Documento Eletrônico e Impresso - Parte IV Vancouver) 3ª ed. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

Adamoski D, et al. Large-scale screening of asymptomatic persons for Sars-Cov-2 variants of concern and gamma takeover, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2021;27(12):3124-7.

Al-Jabir A, et al. Impact of the Coronavirus (COVID-19) pandemic on surgical practice - Part 2 (surgical prioritization). *Int J Surg.* 2020;79:233-48.

American Academy of Pediatrics. Children and COVID-19: State-level data report. 2023. Disponível em: <https://www.aap.org/en/pages/2019-novel-coronavirus-covid-19-infections/children-and-covid-19-state-level-data-report/>. Acesso em 30 jul. 2023.

American Thoracic Society. Standards and indications for cardiopulmonary sleep studies in children. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996;153(2):866-78.

Anderson EL, et al. Consideration of the Aerosol Transmission for COVID-19 and Public Health. *Risk Anal.* 2020;40(5):902-7.

Arambula A, Brown JR, Neff L. Anatomy and physiology of the palatine tonsils, adenoids, and lingual tonsils. *World J Otorhinolaryngol Head Neck Surg.* 2021;7(3):155-60.

Asadi S, et al. The coronavirus pandemic and aerosols: Does COVID-19 transmit via expiratory particles? *Aerosol Sci Technol* 2020;54:635-8.

Bi Q, et al. Epidemiology and transmission of COVID-19 in 391 cases and 1286 of their close contacts in Shenzhen, China: a retrospective cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(8):911-9.

Brasil. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico Nº 148- Boletim COE Coronavírus. 06 de abril de 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/covid-19/2023>. Acesso em 30 jul. 2023.

Bunyavanich S, Do A, Vicencio A. Nasal Gene Expression of Angiotensin-Converting Enzyme 2 in Children and Adults. *JAMA.* 2020;323(23):2427-9.

Buzatto GP, et al. The pathogens profile in children with otitis media with effusion and adenoid hypertrophy. *PLoS One.* 2017;12(2):e0171049.

Cao Q, et al. SARS-CoV-2 infection in children: Transmission dynamics and clinical characteristics. *J Formos Med Assoc.* 2020;119(3):670-3.

Cascella M, et al. Features, Evaluation, and Treatment of Coronavirus (COVID-19). 2023 Jan 9. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

Castagnoli R, et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Infection in Children and Adolescents: A Systematic Review. *JAMA Pediatr.*

2020;174(9):882-9.

Castro IA, et al. Silent Infection of B and CD8+ T Lymphocytes by Influenza A Virus in Children with Tonsillar Hypertrophy. *J Virol*. 2020;94(9):e01969-19.

CDC COVID-19 Response Team. Coronavirus Disease 2019 in Children - United States, February 12-April 2, 2020. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2020;69(14):422-6.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). People with certain medical conditions. 2023a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/people-with-medical-conditions.html>. Acesso em 30 jul. 2023.

CDC (Center for Disease Control and Prevention). Deaths by select demographic and geographic characteristics. Provisional death counts for COVID-19. 2023b. Disponível em: https://www.cdc.gov/nchs/nvss/vsrr/covid_weekly/index.htm. Acesso em 30 jul. 2023.

Chen C, et al. Global Prevalence of Post-Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Condition or Long COVID: A Meta-Analysis and Systematic Review. *J Infect Dis*. 2022;226(9):1593-607.

Chilamakuri R, Agarwal S. COVID-19: Characteristics and therapeutics. *cells*. 2021;10(2):206.

Consiglio CR, et al. The immunology of multisystem inflammatory syndrome in children with COVID-19. *Cell*. 2020;183(4):968-81.e7.

Cui X, et al. A systematic review and meta-analysis of children with coronavirus disease 2019 (COVID-19). *J Med Virol*. 2021;93(2):1057-69.

Cullen KA, Hall MJ, Golosinskiy A. Ambulatory surgery in the United States, 2006. *Natl Health Stat Report*. 2009;(11):1-25.

Descamps G, et al. ACE2 Protein landscape in the head and neck region: The conundrum of SARS-CoV-2 infection. *Biology (Basel)*. 2020;9(8):235.

Dong Y, et al. Epidemiology of COVID-19 among children in China. *Pediatrics*. 2020;145(6):e20200702.

EBSERH (Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares). Guia para retomada das atividades eletivas durante a pandemia da COVID-19. Brasília: 2020. 29p.

Faden H, et al. The ubiquity of asymptomatic respiratory viral infections in the tonsils and adenoids of children and their impact on airway obstruction. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*. 2016;90:128-132.

Fazolo T, et al. Pediatric COVID-19 patients in South Brazil show abundant viral

mRNA and strong specific anti-viral responses. *Nat Commun.* 2021;12(1):6844.

File:Coronavirus replication.png. 2012. Disponível em: https://www.wikidoc.org/index.php/File:Coronavirus_replication.png. Acesso em 30 jul. 2023.

Forrester JD, et al. Precautions for operating room team members during the COVID-19 pandemic. *J Am Coll Surg.* 2020;230(6):1098-1101.

Fossum CC, et al. Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. *Histopathology.* 2017;70(7):1021-9.

Glowacka I, et al. Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response. *J Virol.* 2011;85(9):4122-34.

Gruber CN, et al. Mapping Systemic Inflammation and Antibody Responses in Multisystem Inflammatory Syndrome in Children (MIS-C). *Cell.* 2020;183(4):982-995.e14.

Guglielmi G. The explosion of new coronavirus tests that could help to end the pandemic. *Nature.* 2020;583(7817):506-9.

Günel C, et al. Detection of the Epstein-Barr virus, Human Bocavirus and novel KI and KU polyomaviruses in adenotonsillar tissues. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2015;79(3):423-7.

Gupta A, et al. Extrapulmonary manifestations of COVID-19. *Nat Med.* 2020;26(7):1017-32.

Hara M, et al. Virus-related stimuli modulate SARS-CoV-2 entry factor expression in pediatric tonsillar epithelial cells in vitro. *Allergy.* 2022;77(7):2240-2.

Harris PA, et al. Research electronic data capture (REDCap)--a metadata-driven methodology and workflow process for providing translational research informatics support. *J Biomed Inform.* 2009;42(2):377-81.

Harris PA, et al. The REDCap consortium: Building an international community of software platform partners. *J Biomed Inform.* 2019;95:103208.

Harrison AG, Lin T, Wang P. Mechanisms of SARS-CoV-2 Transmission and Pathogenesis. *Trends Immunol.* 2020;41(12):1100-15.

Hasan MR, et al. Nasopharyngeal expression of angiotensin-converting enzyme 2 and transmembrane serine protease 2 in children within SARS-CoV-2-infected family clusters. *Microbiol Spectr.* 2021;9(3):e0078321.

Hoffmann M, Kleine-Weber H, Pöhlmann S. A multibasic cleavage site in the spike protein of SARS-CoV-2 is essential for infection of human lung cells. *Mol Cell*. 2020;78(4):779-84.e5.

Hou H, et al. Detection of IgM and IgG antibodies in patients with coronavirus disease 2019. *Clin Transl Immunology*. 2020;9(5):e01136.

Huang C, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020;395(10223):497-506.

Huang IC, et al. SARS coronavirus, but not human coronavirus NL63, utilizes cathepsin L to infect ACE2-expressing cells. *J Biol Chem*. 2006;281(6):3198-203.

Huang N, et al. SARS-CoV-2 infection of the oral cavity and saliva. *Nat Med*. 2021;27(5):892-903.

Hui KPY, et al. Tropism, replication competence, and innate immune responses of the coronavirus SARS-CoV-2 in human respiratory tract and conjunctiva: an analysis in ex-vivo and in-vitro cultures. *Lancet Respir Med*. 2020;8(7):687-95.

Jackson CB, et al. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2022;23(1):3-20.

John AE, et al. COVID-19 and pulmonary fibrosis: A potential role for lung epithelial cells and fibroblasts. *Immunol Rev*. 2021;302(1):228-240.

Kadriyan H, et al. COVID-19 infection in the palatine tonsil tissue and detritus: the detection of the virus compartment with RT-PCR. *BMJ Case Rep*. 2021;14(2):e239108.

Kitano T, et al. The differential impact of pediatric COVID-19 between high-income countries and low- and middle-income countries: A systematic review of fatality and ICU admission in children worldwide. *PLoS One*. 2021;16(1):e0246326.

Lai MM, Cavanagh D. The molecular biology of coronaviruses. *Adv Virus Res*. 1997;48:1-100.

Lan J, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature*. 2020;581(7807):215-20.

Lauer SA, et al. The Incubation period of coronavirus disease 2019 (COVID-19) from publicly reported confirmed cases: Estimation and application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-82.

Laws RL, et al. Symptoms and Transmission of SARS-CoV-2 Among Children - Utah and Wisconsin, March-May 2020. *Pediatrics*. 2021;147(1):e2020027268.

Lechien JR, et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of

mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2020;277(8):2251-61.

Li Q, et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020;382(13):1199-207.

Li R, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*. 2020;368(6490):489-93.

Liu Y, Rocklöv J. The reproductive number of the Delta variant of SARS-CoV-2 is far higher compared to the ancestral SARS-CoV-2 virus. *J Travel Med*. 2021;28(7):taab124.

Liu Y, Rocklöv J. The effective reproductive number of the Omicron variant of SARS-CoV-2 is several times relative to Delta. *J Travel Med*. 2022;29(3):taac037.

Lu R, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020;395(10224):565-74.

Lugon P, et al. SARS-CoV-2 Infection Dynamics in Children and Household Contacts in a Slum in Rio de Janeiro. *Pediatrics*. 2021;148(1):e2021050182.

Ma Q, et al. Global Percentage of Asymptomatic SARS-CoV-2 infections among the tested population and individuals with confirmed COVID-19 diagnosis: A systematic review and meta-analysis. *JAMA Netw Open*. 2021;4(12):e2137257.

Mahmoudinobar F, Britton D, Montclare JK. Protein-based lateral flow assays for COVID-19 detection. *Protein Eng Des Sel*. 2021;34:gzab010.

Malas MB, et al. Thromboembolism risk of COVID-19 is high and associated with a higher risk of mortality: A systematic review and meta-analysis. *EClinicalMedicine*. 2020;29:100639.

Matsuyama S, et al. Efficient activation of the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein by the transmembrane protease TMPRSS2. *J Virol*. 2010;84(24):12658-64.

Mehta NS, et al. SARS-CoV-2 (COVID-19): What do we know about children? A systematic review. *Clin Infect Dis*. 2020;71(9):2469-79.

Mitchell RB, et al. Clinical Practice Guideline: Tonsillectomy in Children (Update). *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;160(Suppl. 1):S1-S42.

Morawska L, Cao J. Airborne transmission of SARS-CoV-2: The world should face the reality. *Environ Int*. 2020;139:105730.

Muderris T, et al. Is adenotonsillectomy safe in covid-19 era? Investigation of sars-cov2 in adenoid and tonsil tissues. *Am J Otolaryngol*. 2022;43(3):103458.

OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico). The State of Global Education: 18 Months into the Pandemic. Paris: OECD Publishing, 2021. 45p.

Paradise JL, et al. Efficacy of tonsillectomy for recurrent throat infection in severely affected children. Results of parallel randomized and nonrandomized clinical trials. *N Engl J Med*. 1984;310(11):674-83.

Pierce CA, et al. Immune responses to SARS-CoV-2 infection in hospitalized pediatric and adult patients. *Sci Transl Med*. 2020;12(564):eabd5487.

Post N, et al. Antibody response to SARS-CoV-2 infection in humans: A systematic review. *PLoS One*. 2020;15(12):e0244126.

Prather KA, Wang CC, Schooley RT. Reducing transmission of SARS-CoV-2. Masks and testing are necessary to combat asymptomatic spread in aerosols and droplets. *Science*. 2020;368(6498):1422-4.

Proenca-Modena JL, et al. High rates of detection of respiratory viruses in tonsillar tissues from children with chronic adenotonsillar disease. *PLoS One*. 2012;7(8):e42136.

Puhach O, Meyer B, Eckerle I. SARS-CoV-2 viral load and shedding kinetics. *Nat Rev Microbiol*. 2023;21(3):147-161.

Riley S, et al. Resurgence of SARS-CoV-2: Detection by community viral surveillance. *Science* 2021;372(6545):990-5.

Rowley AH. Understanding SARS-CoV-2-related multisystem inflammatory syndrome in children. *Nat Rev Immunol*. 2020;20(8):453-4.

Schaefer IM, et al. In situ detection of SARS-CoV-2 in lungs and airways of patients with COVID-19. *Mod Pathol*. 2020;33(11):2104-14.

Shang J, et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2. *Nature*. 2020;581(7807):221-4.

Sharma A, Bhardwaj R. COVID-19 and ENT surgery: a brief review of essential precautions and triage. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2021;278(5):1301-5.

Shulla A, et al. A transmembrane serine protease is linked to the severe acute respiratory syndrome coronavirus receptor and activates virus entry. *J Virol*. 2011;85(2):873-82.

Silva MG, et al. Effect of age on human ACE2 and ACE2-expressing alveolar type II cells levels. *Pediatr Res*. 2023;93(4):948-52.

Simmons G, et al. Inhibitors of cathepsin L prevent severe acute respiratory

syndrome coronavirus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(33):11876-81.

Son MBF, et al. Multisystem Inflammatory syndrome in children - initial therapy and outcomes. *N Engl J Med*. 2021;385(1):23-34.

Sousa BLA, Silva CA, Ferraro AA. An update on the epidemiology of pediatric COVID-19 in Brazil. *Rev Paul Pediatr*. 2022;40:e2021367.

Sun K, et al. Atlas of ACE2 gene expression reveals novel insights into transmission of SARS-CoV-2. *Heliyon*. 2021;7(1):e05850.

Sungnak W, et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med*. 2020;26(5):681-7.

Suzuki T, et al. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection in Japan. *JAMA Netw Open*. 2022;5(12):e2247704.

Tang N, et al. Abnormal coagulation parameters are associated with poor prognosis in patients with novel coronavirus pneumonia. *J Thromb Haemost*. 2020;18(4):844-7.

Tollånes MC, et al. Evaluation of 32 rapid tests for detection of antibodies against SARS-CoV-2. *Clin Chim Acta*. 2021;519:133-9.

Walls AC, et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. *Cell*. 2020;181(2):281-92.e6. Erratum in: *Cell*. 2020;183(6):1735.

Wang D, et al. Clinical characteristics of 138 hospitalized patients with 2019 novel coronavirus-infected pneumonia in Wuhan, China. *JAMA*. 2020;323(11):1061-9.

Wang Q, et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell*. 2020;181(4):894-904.e9.

Wang Y, et al. A comprehensive investigation of the mRNA and protein level of ACE2, the putative receptor of SARS-CoV-2, in human tissues and blood cells. *Int J Med Sci*. 2020;17(11):1522-31.

Weisberg SP, et al. Distinct antibody responses to SARS-CoV-2 in children and adults across the COVID-19 clinical spectrum. *Nat Immunol*. 2021;22(1):25-31.

WHO (World Health Organization). Multisystem inflammatory syndrome in children and adolescents temporally related to COVID-19. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/commentaries/detail/multisystem-inflammatory-syndrome-in-children-and-adolescents-with-covid-19>. Acesso em 30 jul. 2023.

WHO (World Health Organization). Listings of WHO's response to COVID-19. 2021. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/29-06-2020-covidtimeline> Acesso em 30 jul. 2023.

WHO (World Health Organization). WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. 2023. Disponível em: <https://covid19.who.int/>. Acesso em 30 jul. 2023.

Williams PCM, et al. SARS-CoV-2 in children: spectrum of disease, transmission and immunopathological underpinnings. *Pathology*. 2020;52(7):801-8.

Wong DWL, et al. Multisystemic cellular tropism of SARS-CoV-2 in autopsies of COVID-19 patients. *Cells*. 2021;10(8):1900.

Worldometer. COVID - Coronavirus statistics. 2023. Disponível em: <https://www.worldometers.info/coronavirus>. Acesso em 30 jul. 2023.

Wu JT, Leung K, Leung GM. Nowcasting and forecasting the potential domestic and international spread of the 2019-nCoV outbreak originating in Wuhan, China: a modelling study. *Lancet*. 2020;395(10225):689-97.

Wu Z, McGoogan JM. 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*. 2020;323(13):1239-1242.

Xu Q, et al. Adaptive immune responses to SARS-CoV-2 persist in the pharyngeal lymphoid tissue of children. *Nat Immunol*. 2023;24(1):186-99.

Yang N, Shen HM. Targeting the Endocytic Pathway and Autophagy Process as a Novel Therapeutic Strategy in COVID-19. *Int J Biol Sci*. 2020;16(10):1724-31.

Ye M, et al. Increased ACE 2 and decreased ACE protein in renal tubules from diabetic mice: a renoprotective combination? *Hypertension*. 2004;43(5):1120-5.

Yeshuroon-Koffler K, et al. Detection of common respiratory viruses in tonsillar tissue of children with obstructive sleep apnea. *Pediatr Pulmonol*. 2015;50(2):187-95.

Yüce M, Filiztekin E, Özkaya KG. COVID-19 diagnosis -A review of current methods. *Biosens Bioelectron*. 2021;172:112752.

Zhou P, Yet al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.

Ziegler CGK, et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. *Cell*. 2020;181(5):1016-35.e19.

Zimmermann P, Curtis N. Coronavirus infections in children including COVID-19: An overview of the epidemiology, clinical features, diagnosis, treatment and prevention options in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2020a;39(5):355-68.

Zimmermann P, Curtis N. COVID-19 in children, pregnancy and neonates: A review

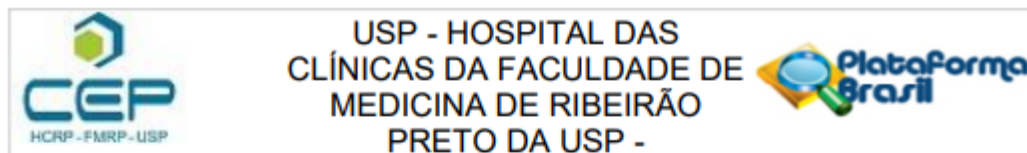
of epidemiologic and clinical features. *Pediatr Infect Dis J.* 2020b;39(6):469-77.

Zimmermann P, Pittet LF, Curtis N. How Common is Long COVID in Children and Adolescents? *Pediatr Infect Dis J.* 2021;40(12):e482-e487.

Zoppi LBA, Henderson EBS. The naming system behind SARS-CoV-2. *News-Medical.net* 2020. Disponível em: <https://www.news-medical.net/health/The-Naming-System-Behind-SARS-CoV-2.aspx>. Acesso em 30 jul. 2023.

8. Anexos

ANEXO A - COMPROVANTE DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da persistência do SARS-CoV2 e de outros vírus respiratórios em vias aéreas superiores após a fase crítica da pandemia do COVID-19

Pesquisador: ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 31490720.1.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.465.408

Apresentação do Projeto:

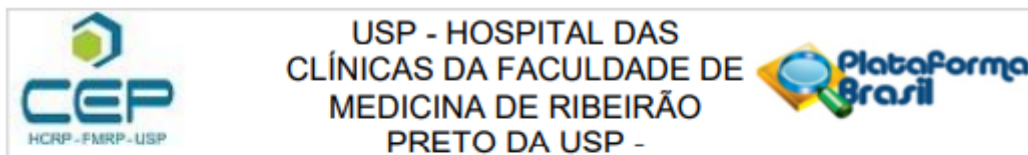
O mundo vive atualmente uma pandemia causada pelo SARS-CoV2, cuja patogênese e a história natural a médio e longo prazo é totalmente desconhecida nos indivíduos que tiveram COVID-19. Uma das lacunas existentes é se indivíduos previamente acometidos pela SARS-CoV2 assintomáticos são capazes de albergar o SARS-CoV2 de forma latente ou replicante, o que poderia torná-los fontes de novos surtos e epidemias. Além disso, será importante verificar se há co-infecções assintomáticas de SARS-CoV2 com outros

coronavírus, como 229E, NL63, HKU1 e OC43, e com outros vírus respiratórios. Neste estudo avaliaremos a presença do SARS-CoV2 (genoma e proteína viral) em tonsilas e mucosa nasal de pacientes submetidos a cirurgias otorrinolaringológicas (tonsilectomia, rinosseptoplastia e cirurgia endoscópica nasossinusal), correlacionando-a com a presença de IgM e IgG contra o SARS-CoV2. Além disso, avaliaremos se os indivíduos acometidos pelo SARS-CoV2 apresentam diferentes padrões inflamatórios teciduais em relação aos indivíduos não acometidos.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a prevalência do SARS-CoV-2 (através de RT-PCR e sequenciamento genético) e de outros vírus respiratórios em dois grupos de pacientes (os submetidos a cirurgias nasossinuais e os submetidos à adenotonsilectomia), imediatamente após a fase mais crítica da pandemia, quando as cirurgias eletivas serão reiniciadas. Correlacionar a positividade por RT-PCR para SARS-COV-2

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.465.408

nos tecidos das vias aéreas superiores (nasal ou adenotonsilar) com a sorologia para SARS-CoV-2 (IgM/IgG) no mesmo paciente. Avaliar a infecção produtiva pela presença de proteínas estruturais de SARS-CoV2 nos tecidos de vias aéreas superiores, assim como o sequenciamento genético do mesmo vírus. Avaliar o efeito do vírus em células olfatórias, obtidas através escovado dessas células durante o procedimento cirúrgico. Relacionar a presença de SARS-CoV-2 ao padrão inflamatório e à sua intensidade, comparando com pacientes sem SARS-CoV-2 após a pandemia e com os dados da nossa coorte anterior.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não haverá risco adicional aos dos procedimentos que você fará, uma vez que aproveitaremos a punção da veia para coleta de sangue e a cirurgia para colher as amostras.

Benefícios: Os benefícios serão indiretos, pois este estudo ajudará a promover uma melhor compreensão dessa doença (COVID-19). Não haverá benefícios diretos neste estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de encaminhamento de emenda para adequação das seguintes demandas:

1- Acrescentar coleta de amostras durante o procedimento cirúrgico:

- Grupo de crianças submetidas a adenotonsilectomia: coleta de lavado nasal com 20ml de soro fisiológico prévio a cirurgia e armazenado em tubo falcon vazio.

- Grupo de pacientes submetidos a cirurgia de septoplastia ou cirurgia endoscópica nasal: coleta de lavado nasal com 20ml de soro fisiológico prévio a cirurgia e armazenado em tubo falcon vazio e biópsia de seio maxilar que serão armazenadas em RNA-later.

2- Acrescentar o n previsto para cada coorte (100 em cada com total de 200 pacientes) que havíamos colocado no Plataforma Brasil, mas não no projeto.

3- Acrescentar a avaliação de questionário SNOT-22 e avaliação de score de Lundmackay por Tomografia de seios da face realizado de rotina em pacientes com rinosinusite crônica com pólipos nasais

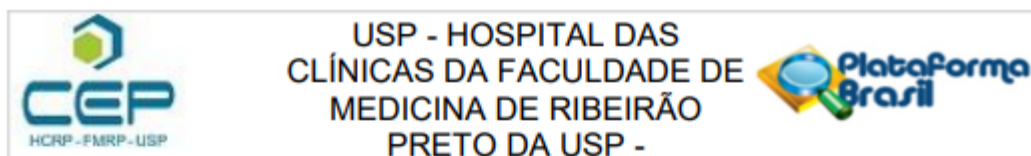
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentos devidamente apresentados

Recomendações:

não se aplica

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.465.408

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP analisou e aprovou a solicitação de emenda assim como o projeto COVID19

versão _4_ data _30/11/2020, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLEs covid19

versão _5_ data _02/12/2020

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1649387_E2.pdf	02/12/2020 12:29:05		Aceito
Outros	Snot22ApenasRSCcPN.pdf	02/12/2020 12:24:52	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEscovid195.docx	02/12/2020 12:22:47	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Outros	JustificativasolicitaodeEmenda2.docx	30/11/2020 08:08:27	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCOVID1920201129versao4.docx	30/11/2020 08:04:56	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Outros	JustificativasolicitaodeEmenda.docx	14/10/2020 11:06:04	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Outros	cartaherpdwilson.pdf	14/10/2020 11:02:40	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Parecer Anterior	cartacep5.docx	25/06/2020 10:20:42	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEscovid194.docx	25/06/2020 10:20:17	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TCLEscovid193.docx	22/06/2020 09:01:20	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

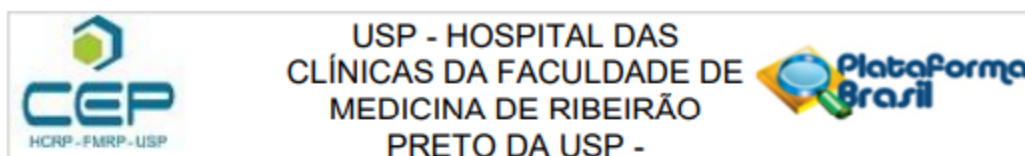
UF: SP

Município: RIBEIRAO PRETO

Telefone: (16)3602-2228

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.465.408

Ausência	TCLCovid193.docx	22/06/2020 09:01:20	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Parecer Anterior	cartacep4.docx	21/06/2020 23:36:21	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCOVID1920200422final3.docx	21/06/2020 23:35:45	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Parecer Anterior	cartacep3.docx	21/05/2020 07:04:42	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetoCOVID1920200422final2.docx	21/05/2020 07:04:30	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCovid192.docx	13/05/2020 15:39:33	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLCovid19.docx	06/05/2020 12:57:10	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	CARTA_PARA_CRIACAO_BIORREPO SITORIO_ASSINADA.pdf	05/05/2020 15:50:13	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	upcassinada.pdf	05/05/2020 15:49:04	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Folha de Rosto	folhaderostoassinada.pdf	05/05/2020 15:47:35	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Orçamento	orcamento.docx	29/04/2020 20:51:47	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito
Cronograma	cronograma.docx	29/04/2020 20:48:16	ANDREA ARANTES BRAGA BIAGIOTTI	Aceito

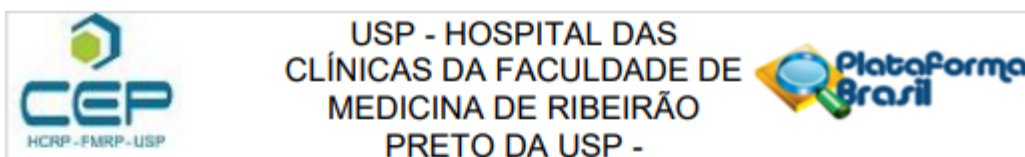
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
 Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
 UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
 Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br



Continuação do Parecer: 4.465.408

RIBEIRAO PRETO, 15 de Dezembro de 2020

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE **CEP:** 14.048-900
UF: SP **Município:** RIBEIRAO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 **Fax:** (16)3633-1144 **E-mail:** cep@hcrp.usp.br

ANEXO B - QUESTIONÁRIO COM INFORMAÇÕES DEMOGRÁFICAS, DADOS CLÍNICOS E HISTÓRIA DE EXPOSIÇÃO PRÉVIA À COVID-19

Avaliação da persistência do SARS-CoV2 e de outros vírus respiratórios em vias aéreas superiores após a fase crítica da pandemia do COVID-19

Page 1

Dados

Record ID	_____
Registro	_____
Data de nascimento	_____
Data da cirurgia	_____
Idade	_____
Procedência (cidade/estado)	_____
Sexo	<input type="radio"/> feminino <input type="radio"/> masculino
Etnia	<input type="radio"/> branco <input type="radio"/> pardo <input type="radio"/> negro <input type="radio"/> amarelo
Motivo da cirurgia	<input type="checkbox"/> infecções de repetição <input type="checkbox"/> roncos / apneia do sono
Número aproximado de amigdalites nos últimos 12 meses	<input type="radio"/> 0 <input type="radio"/> 1 a 3 <input type="radio"/> 4 ou 5 <input type="radio"/> 6 ou +
Última amigdalite foi há quanto tempo (em meses)?	_____
Apneia confirmada por PSG?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
Doenças associadas	<input type="checkbox"/> rinite alérgica <input type="checkbox"/> asma <input type="checkbox"/> refluxo gastroesofágico <input type="checkbox"/> OMA's de repetição / OMS <input type="checkbox"/> outras infecções de repetição <input type="checkbox"/> nenhuma das anteriores
Seu filho teve COVID?	<input type="radio"/> Yes <input type="radio"/> No
Se sim, como foi feito o diagnóstico?	<input type="radio"/> quadro clínico <input type="radio"/> swab <input type="radio"/> sorologia

Se sim, quando (data aproximada)?

Se não, quando ficou gripado pela última vez (data aproximada)?

Quantas pessoas moram na casa?

Alguém que mora na casa teve COVID?

- Yes
 No

Se sim, como foi feito o diagnóstico?

- quadro clínico
 swab
 sorologia

Se sim, quando (data aproximada)?

Alteração do olfato

- Sim
 Não
 Não sabe responder

Grau da tonsila faríngea D (Brodsky)

- 0 (na fossa)
 1 (menos de 25%)
 2 (25 a 50%)
 3 (50 a 75%)
 4 (mais de 75%)

Grau da tonsila faríngea E (Brodsky)

- 0 (na fossa)
 1 (menos de 25%)
 2 (25 a 50%)
 3 (50 a 75%)
 4 (mais de 75%)

Tamanho da adenoide

- 0
 menos de 25%
 25 a 49%
 50 a 74%
 75% ou mais

Tamanho das conchas nasais

- 0
 menos de 25%
 25 a 49%
 50 a 74%
 75% ou mais

9. Apêndices

APÊNDICE A - TERMO DE ASSENTIMENTO PARA A CRIANÇA

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera

Carolina Sponchiado Miura

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2863 / 16 997524065

Você está sendo convidado para participar do estudo:

Avaliação da persistência do SARS-CoV2 e de outros vírus respiratórios em vias aéreas superiores após a fase crítica da pandemia do COVID-19

Após entender as informações você é livre para decidir se quer participar ou não do estudo.

Esta pesquisa é sobre a investigação de vírus (inclusive do novo coronavírus) no nariz e na garganta de crianças.

Para isso ser estudado, avaliaremos um pedaço da adenoide e das amígdalas retiradas na cirurgia, um pouco de sangue (parecido com a quantidade de uma colher de chá), líquido utilizado para lavar a cavidade nasal e um cotonete que será passado no nariz durante a cirurgia. Como tudo será realizado durante a cirurgia e depois de você estar anestesiado, a coleta dos materiais não irá trazer qualquer incômodo a mais ao que normalmente ocorre na cirurgia. Poderá ocorrer uma mancha roxa (hematoma) no braço em que pegaremos a veia e poderá ter um pouco de sangramento no lugar das adenoides e amígdalas retiradas, porém, este risco é baixo já que a equipe responsável é muito preparada.

Após coletado, todo material será guardado em um laboratório até o final deste estudo. Os pesquisadores responsáveis prometem manter em segredo suas informações e pediremos sua permissão para jogar fora o material armazenado no fim da pesquisa ou para usá-lo em outra pesquisa.

Você não terá benefícios diretos com este estudo. Também não haverá risco adicional aos dos procedimentos que você fará, porque aproveitaremos a punção da veia para coleta de sangue e a cirurgia para colher as amostras.

Não haverá gastos para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas.

É importante dizer que suas informações serão usadas somente para esta pesquisa, e que em nenhum momento você será exposto.

A sua participação será totalmente voluntária, você não é obrigado(a) a fazer parte do estudo. Seu tratamento não será diferente se você decidir não fazer parte deste estudo.

Você também estará livre para desistir de participar em qualquer fase da pesquisa, sem piora do seu cuidado nesta instituição.

Se você decidir fazer parte da pesquisa, você precisará assinar duas cópias deste documento para comprovar que você aceitou participar, sendo que você fica com um dos papéis.

Caso ainda tenha dúvidas, pode ligar para os responsáveis para esclarecê-las, antes e durante sua realização, pelos telefones (3602-2863, 3202-2321 ou 98114-4352, sendo, este último, disponível 24 horas). Da mesma forma, caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é formado por um grupo de pessoas que tomam conta das pesquisas em seres humanos e tem a tarefa de proteger todos os participantes da pesquisa. O telefone de contato do CEP é o (16) 3602-2228.

Após ter lido o documento e esclarecido as dúvidas, caso concorde em participar do estudo, por favor, escreva seu nome por extenso, assine e date este documento em duas cópias, uma das quais ficará com você, enquanto a outra será guardada pelo pesquisador.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: CAROLINA SPONCHIADO MIURA

Assinatura: _____ **data:** _____

Dados do responsável legal ou testemunha:

Nome legível: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DIRIGIDO AOS PAIS/RESPONSÁVEIS LEGAIS ADENOAMIGDALECTOMIA

Pesquisadoras responsáveis: Fabiana Cardoso Pereira Valera

Carolina Sponchiado Miura

Telefones: 16 3602-2321 / 16 3602-2863 / 16 997524065

O seu filho(a) está sendo convidado para participar do estudo, como voluntário:

Avaliação da persistência do SARS-CoV-2 e de outros vírus respiratórios em vias aéreas superiores após a fase crítica da pandemia do COVID-19

Após ser esclarecido sobre as informações, você é livre para decidir se quer permitir que seu filho(a) participe ou não do estudo.

A pandemia causada pelo novo coronavírus (SARS-CoV-2), causador da doença denominada COVID-19, tem criado grande impacto sobre a saúde pública e sobre a economia mundial. Ainda não sabemos como os pacientes infectados por este vírus evoluirão a médio e longo prazo. Uma das dúvidas é se indivíduos que tiveram COVID-19, mas não tiveram sintomas, serão capazes de carregar o vírus por um tempo mais longo, o que poderia torná-los fontes de novos surtos e epidemias. Outra dúvida é em relação à perda de sensação do cheiro (anosmia), sintoma muito comum nessa doença. Gostaríamos de estudar como o novo coronavírus afeta as células envolvidas com este sintoma.

Neste estudo avaliaremos a presença do SARS-CoV-2 em adenoide, amígdalas de pacientes submetidos à cirurgia de ADENOAMIGDALECTOMIA correlacionando-a com o diagnóstico sorológico da COVID-19.

Seu filho(a) passará por avaliação pré-operatória muito semelhante à realizada em todos os pacientes com indicação de cirurgia, independente da participação ou não no estudo.

Para a pesquisa, no dia da cirurgia, e após você ter aceitado que seu filho(a) participe da pesquisa e após assinatura deste termo, você preencherá um questionário, em que perguntamos se tem conhecimento de seu filho(a) ter tido COVID-19, os motivos pelo qual seu filho(a) está fazendo a cirurgia, e se ele(a) tem doenças associadas. Serão ainda anotados os dados de exame físico do seu filho(a) no dia da consulta médica.

Durante a cirurgia, quando for pegar a veia do seu filho(a) para anestesia, colheremos 4 mL de sangue (equivalente a uma colher de chá) para ver se seu filho(a) teve COVID-19. A coleta será feita quando formos pegar a veia (acesso venoso) para anestesia. Existe o risco de ocorrerem hematomas ("manchas roxas") no local da picada de agulha,

porém este risco é baixo já que o procedimento será realizado por profissional treinado. Logo no início do procedimento cirúrgico, com seu filho(a) já anestesiado, será colocado um cotonete no nariz, para colher células olfatórias nasais. Após, será coletado líquido utilizado para lavagem da cavidade nasal com soro fisiológico. Por fim, será coletada uma amostra da amígdala e da adenoide que foram retiradas durante a cirurgia. A retirada desta amostra pode causar pouco sangramento, porém como ela consiste em um dos passos da própria cirurgia não terá risco adicional ao esperado. Além disso, será realizado por profissionais treinados o que minimiza ainda mais este risco.

Após coletado, todo material será guardado em um biorrepositório no laboratório Multiusuário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Av. Bandeirantes, 3900, telefone 16 3315-0579), onde as amostras serão armazenadas até o final deste estudo. Os pesquisadores responsáveis pela equipe se comprometem a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta sigilo do seu filho(a) e a sua confidencialidade, para isso a amostra de sangue, citologia de fossa olfatória e amostras cirúrgicas de seu filho(a) serão identificadas por meio de número de Registro do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto e data de coleta. Também solicitaremos sua autorização, se necessário, para o descarte do material armazenado de seu filho(a) ao término da pesquisa. Da mesma forma, a cada a nova pesquisa você será contatado para a utilização do material biológico do seu filho (a) armazenado neste biorrepositório e também a nova pesquisa será submetida à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) institucional e, quando for o caso, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Os benefícios para seu filho(a) serão indiretos, pois este estudo ajudará a promover uma melhor compreensão dessa doença (COVID-19). Não haverá benefícios diretos neste estudo. Também não haverá risco adicional aos dos procedimentos que seu filho(a) fará, uma vez que aproveitaremos a punção da veia para coleta de sangue e a cirurgia para colher as amostras.

Não haverá despesas pessoais para você em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas, uma vez que todas as etapas da pesquisa serão realizadas durante a cirurgia do seu filho(a). Também não haverá compensação financeira relacionada à sua participação, nem ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, tais como alimentação e transporte.

Reforçamos que os dados colhidos serão usados somente para esta pesquisa, e que em nenhum momento seu filho(a) será exposto. Os dados do estudo poderão ser usados para divulgação em eventos médicos ou publicações em revistas científicas, garantindo

sempre o anonimato dos participantes envolvidos. E estarão disponíveis quando solicitados pelos participantes e/ou responsáveis.

A participação neste estudo será totalmente voluntária, seu filho(a) não é obrigado(a) a fazer parte. O tratamento do seu filho(a) e a atitude do médico não serão afetados se você decidir que seu filho(a) não fará parte deste estudo. A recusa em participar não afetará qualquer benefício que seu filho(a) tenha direito, inclusive sem que isso implique no atendimento atual e futuro nesta Instituição. Você também estará livre para retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma, nem prejuízo ao cuidado do seu filho(a) nesta instituição.

Se você decidir que seu filho(a) possa fazer parte da pesquisa, você precisará assinar duas vias deste documento para comprovar que você deu seu consentimento em participar, sendo que você fica com uma via.

Caso ainda tenha dúvidas, os pesquisadores estarão a sua disposição para esclarecimentos de qualquer dúvida relacionada à pesquisa, antes e durante sua realização, pelos telefones (3602-2863, 3202-2321 ou 98114-4352, sendo, este último, disponível 24 horas). Da mesma forma, caso tenha dúvidas sobre aspectos éticos desta pesquisa você também poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP. Um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é composto por um grupo de pessoas que são responsáveis por supervisionarem pesquisas em seres humanos que estão sendo feitas na instituição e tem a função de proteger e garantir os direitos, a segurança e o bem-estar de todos os participantes de pesquisa que se voluntariam a participar da mesma. O CEP do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto está localizado no Subsolo do Hospital e funciona das 8:00 às 17:00. O telefone de contato é o (16) 3602-2228.

Após ter lido o documento e esclarecido as dúvidas, caso concorde em permitir que seu filho(a) participe do estudo, por favor, escreva seu nome por extenso, assine e date este documento em duas vias, uma das quais ficará com você, enquanto a outra será guardada no centro de estudo.

Nome do responsável: _____

Assinatura: _____ **data:** _____

Nome do pesquisador: CAROLINA SPONCHIADO MIURA

Assinatura: _____ **data:** _____