

RAFAEL ANTÔNIO VELÔSO CAIXETA

**Excreção oral de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados
por complicações da COVID-19**

São Paulo

2023

RAFAEL ANTÔNIO VELÔSO CAIXETA

Excreção oral de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados por complicações da COVID-19

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz da Silva

São Paulo

2023

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Caixeta, Rafael Antônio Velôso.

Excreção oral de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados por complicações da COVID-19 / Rafael Antônio Velôso Caixeta; orientador Paulo Henrique Braz da Silva. -- São Paulo, 2023.

62 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. -- Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Biomarcadores. 2. Saliva. 3. TorqueTeno Vírus. 4. SARS-CoV-2. 5. COVID-19. I. Silva, Paulo Henrique Braz da. II. Título.

Caixeta RAV. Excreção oral de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados por complicações da COVID-19. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: 20/04/2023

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Karen Renata Nakamura Hiraki
Instituição: ICBIM/UFU Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Juliana Lucena Schussel
Instituição: FOUFPR Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Débora Pallos
Instituição: FO/UNISA Julgamento: Aprovado

Dedico às memórias de Ortiz, Sônia, José Eustáquio e o Billy, os quais não conseguiram me acompanhar em toda a jornada;

A minha amada família e amigos por jamais me abandonarem ao longo de todo este trajeto!

Nós conseguimos!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que me acompanharam e incentivaram a não desistir e a me empenhar para sempre correr atrás dos meus sonhos e objetivos.

À minha família, papai, mamãe, tias e avós, que sempre estiveram ao meu lado nessa jornada.

Aos meus amigos e amigas e parceiro que sempre me incentivam a continuar minhas batalhas.

À minha terapeuta que tem sido meu suporte até aqui.

Ao meu orientador que sempre me incentivou e me apoiou nesse trajeto!

Ao Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, por ter aberto suas portas para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) (*Código de Financiamento 001*) pelo apoio recebido na forma de bolsa de estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro que custeou parte deste trabalho (2021/07490-0).

À Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade de São Paulo pelo suporte financeiro que custeou parte deste trabalho (2021.1.10424.1.9).

RESUMO

Caixeta RAV. Excreção oral de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados por complicações da COVID-19 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

O TorqueTeno virus (TTV) é um pequeno vírus de DNA constituinte do viroma humano e considerado não patogênico. Altos níveis de TTV tem apresentado uma correlação clara, consistente e direta com a intensidade de imunossupressão individual induzida ou não e com distúrbios crônicos de natureza inflamatória. Devido a natureza inflamatória da COVID-19, acredita-se que a replicação do TTV esteja acontecendo nestes casos, aumentando os seus níveis detectáveis e refletindo o status imunológico do paciente, podendo atuar como biomarcador de severidade. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a carga viral salivar de TTV em pacientes diagnosticados com COVID-19 e hospitalizados por suas complicações visando buscar a associação com o grau de severidade da doença (casos moderados e graves) e desfecho (alta ou óbito). Amostras de saliva foram coletadas de 176 pacientes hospitalizados por complicações da COVID-19, todos diagnosticados por RT-PCR em amostras de swab nasofaríngeo (88 casos graves e 88 moderados), nas quais investigou-se a presença de SARS-CoV-2 e TTV por meio de qPCR. Parâmetros clínicos de gravidade da COVID-19, dados demográficos, assim como desfecho, foram coletados dos prontuários médicos. Para as análises estatísticas foi utilizado o software SPSS version 20.0. Foi aplicado teste normalidade Shapiro-Wilk, encontrando distribuição normal para idade e anormal para o quantitativo de TTV, assim foi utilizado teste T de student para avaliar idade e gravidade da COVID-19 e Mann-Whitney para quantitativo do TTV com desfecho e gravidade. Para avaliar as variáveis categóricas com positividade do TTV e gravidade foi utilizado Teste Qui-Quadrado de Pearson ou Exato de Fisher. Todos os testes foram realizados com nível de significância de 5%. A maioria dos pacientes era do sexo masculino, sendo que estes apresentavam majoritariamente quadros graves. Pacientes com quadro grave apresentaram associação estatisticamente significativa com as variáveis que denotam maior gravidade da doença ($p < 0.001$) e maior número de óbitos ($p = 0.003$) comparados aos com quadro moderado. Foi observada a presença de SARS-CoV-2

na saliva de 64.77% pacientes e TTV em 55.68%. Pacientes com piores cenários clínicos ($p < 0.001$) e que evoluíram para óbito ($p = 0.003$) apresentaram maior prevalência na detecção de TTV. A média de carga viral em cópias/mL dos pacientes com quadro grave foi de 7.32 log 10, com quadro moderado de 7.66 log 10, pacientes que receberam alta de 6.85 log 10 e que evoluíram para óbito de 9.35 log 10. Foi encontrada associação estatisticamente significativa da distribuição da carga salivar de TTV com a classificação da gravidade da COVID-19 ($p = 0.004$) e desfecho ($p < 0.001$). A detecção salivar de TTV pode ser útil como biomarcador de severidade e prognóstico da COVID-19.

Palavras-chave: Biomarcadores. Saliva. TorqueTeno Vírus. SARS-CoV-2. COVID-19.

ABSTRACT

Caixeta RAV. Oral shedding of torque-teno vírus (TTV) in patients hospitalised due to COVID-19 complications [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

Torque-teno virus (TTV) is a small DNA virus constituting the human virome and is considered to be non-pathogenic. High levels of TTV has been shown to have a clear, direct, consistent correlation with the intensity of individual immunosuppression, either induced or non-induced, as well as with inflammatory chronic disorders. Due to the inflammatory nature of COVID-19, it is believed that TTV replication occurs in such cases as its detectable levels are increased, which reflects the patient's immunological status and thus can be used as a biomarker of severity. The objective of the present study was to assess the salivary viral load in patients diagnosed with COVID-19 who were hospitalised due to complications and then find an association with disease severity (i.e. moderate to severe cases) and outcome (i.e. discharge or death). Saliva samples were collected from 176 patients hospitalised due to COVID-19 complications, all diagnosed by using RT-PCR on nasopharyngeal swabs (88 severe cases and 88 moderate cases), in which the presence of SARS-CoV-2 and TTV was investigated by means of qPCR. Clinical parameters of COVID-19 severity, demographic data and outcome were obtained from the patients' medical records. SPSS software version 20.0 was used for statistical analyses. Shapiro-Wilk normality test was applied to the data, showing a normal distribution for age and a non-normal one for TTV quantification. For this reason, Student's t-test was used to assess age and COVID-19 severity, whereas Mann-Whitney's test was used to assess TTV quantification in relation to outcome and COVID-19 severity. Pearson's chi-square test or Fisher's exact test was used to assess categorical variables in relation to TTV positivity and COVID-19 severity. All statistical tests were performed at a significance level of 5%. The majority of the patients were male and mostly with a severe condition. A statistically significant association with variables indicating greater severity ($P < 0.001$) and higher number of deaths ($P = 0.003$) was found in patients with severe condition compared to those with moderate condition. Presence of SARS-CoV-2 in the saliva of 64.77% of the

patients and of TTV in 55.68% of them was also observed. Patients with impaired clinical conditions ($P < 0.001$), which evolved to death ($P = 0.003$), showed higher prevalence of TTV detection. The mean viral load (copies/mL) in patients with severe condition was $7.32 \log_{10}$, in which those being discharged and those evolving to death had values of $6.85 \log_{10}$ and $9.35 \log_{10}$, respectively. A statistically significant association was found in the distribution of TTV viral load in saliva with severity of COVID-19 ($P = 0.004$) and outcome ($P < 0.001$). Detection of TTV in saliva can be useful as a biomarker of severity and prognosis of COVID-19.

Keywords: Biomarkers, Saliva, Torque-teno virus, SARS-CoV-2, COVID-19.

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Relação das características demográficas e clínicas dos participantes do estudo com a classificação da gravidade da doença.	36
Tabela 5.2 - Relação da positividade do TTV com as variáveis do estudo	39
Tabela 5.3 - Distribuição do quantitativo do TTV (log 10 cópias/mL) com classificação da doença quanto a gravidade.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
CD4	Grupamento de diferenciação 4
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
g	Força centrífuga
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IIER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
mRNA	RNA mensageiro
N	Nucleocapsídeo
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia polimerase em tempo real
RT-qPCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SARS-CoV-2	Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave 2
TTV	TorqueTeno Virus
TTV-DNA	DNA de TorqueTeno Virus
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
UTR	<i>Untranslated region</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

%	porcentagem
<	menor que
>	maior que
°C	graus Celsius
±	mais ou menos
μL	microlitros
log ₁₀	logaritmo na base 10
mL	mililitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
3	PROPOSIÇÃO	29
4	MATERIAL E MÉTODOS	31
5	RESULTADOS	35
6	DISCUSSÃO	41
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	51
	ANEXOS	57

1 INTRODUÇÃO

A COVID-19, do inglês *coronavirus disease 2019*, doença causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2) (1), consiste em uma síndrome multisistêmica grave, a qual sua etiopatogenia envolve diferentes cascatas imunológicas e inflamatórias (2, 3). Algumas características imunopatogênicas observadas nos casos mais graves da COVID-19 inclui a linfopenia e um quadro denominado tempestade de citocinas, em que há aumento na produção de citocinas mediada pela resposta inflamatória individual. Este conjunto de acontecimentos pode levar a um agravamento do quadro da síndrome do desconforto respiratório agudo e a danos teciduais, levando a falência múltipla de diversos órgãos e, conseqüentemente, morte (4-6).

O uso da saliva com finalidade diagnóstica e/ou de pesquisa abre a possibilidade para outras técnicas que não apenas a detecção direta do patógeno, como o uso da proteômica, metabolômica, detecção de anticorpos, citocinas e quimiocinas, na busca por biomarcadores que auxiliem no desenvolvimento de dispositivos diagnósticos *point of care*, além de auxiliar na compreensão da fisiopatogênese da doença (7, 8). Acredita-se que a identificação de componentes inflamatórios (citocinas e quimiocinas) e imunológicos (anticorpos) na saliva possa auxiliar no monitoramento da COVID-19, atuando como biomarcadores prognósticos e de severidade (9, 10). Além destes, existem outras alternativas que têm sido utilizadas para monitoramento de diferentes doenças ou condições, como é o caso do TorqueTeno Virus (TTV), cujo papel como biomarcador de severidade e prognóstico na COVID-19 tem sido investigado (11, 12).

O TTV tem sido alvo de estudos devido a sua presença e dinâmica na população geral saudável e em outras condições, como doenças crônicas e pacientes pós-transplante (13). Este vírus consiste em um pequeno vírus pertencente à família Anelloviridae, de fita simples, senso negativo, molécula única de DNA com cerca de 3.8kb e não envelopado, descoberto pela primeira vez em seres humanos em 1997 em um paciente portador de hepatite pós-transfusional (14, 15). Até o momento a sua presença não foi relacionada a nenhum quadro patogênico com manifestação clínica e a sua prevalência em indivíduos saudáveis é estimada entre 30-95%, sendo considerado um vírus onipresente, assim como Citomegalovírus e Epstein-Barr vírus (16-18).

A replicação do TTV nos indivíduos imunocompetentes parece estar sob um rígido controle imunológico (13). *In vivo* o TTV parece ter como sítio de replicação diferentes órgãos e tecidos, como medula óssea, vias aéreas e fígado. No entanto estudos indicam que o seu principal alvo de replicação sejam os linfócitos T, ainda que os receptores específicos para o TTV permaneçam desconhecidos, sugerindo que esse processo possa ser afetado por desordens imunológicas e medicações anti-inflamatórias ou imunossupressoras (18, 19). Estudos mostram que terapias com drogas imunossupressoras permitem que o TTV se replique em altos níveis e se torne detectáveis na forma de carga viral de TTV em diferentes espécimes, como plasma, saliva e soro (13, 18).

Existe uma íntima relação entre a replicação do TTV e a alteração do estado imunológico (15). Acredita-se que as respostas imunes adaptativas tenham um importante papel no controle da replicação do TTV, reduzindo seus níveis detectáveis (13, 20). Oscilações em sua carga viral tem sido observada em diferentes quadros de imunossupressão, sugerindo-se que sua presença possa estar relacionada com os níveis de imunossupressão e da resposta imune individual (17). Em diferentes quadros patológicos observou-se uma correlação entre o aumento da carga viral do TTV e a presença de quadros inflamatórios ou de imunossupressão (21-23).

Em pacientes transplantados, nos extremos níveis de imunossupressão, existem os riscos de infecções oportunistas e rejeição, incluindo rejeição aguda celular e rejeição mediada por anticorpos (24). Observou-se no caso de pacientes receptores de transplante pulmonar que a carga total de TTV plasmático aumentou substancialmente em resposta a terapia imunossupressora utilizada, confirmando que o vírus utiliza da redução da imunocompetência para replicação. Altos níveis de TTV pós-transplante têm sido associados a maior imunossupressão e ao desenvolvimento de infecções oportunistas pós-transplante (25). Além de casos de imunossupressão, altas cargas plasmáticas de TTV são observadas em pacientes com distúrbios de natureza inflamatória, como a asma, bronquiectasia crônica e COVID-19 (12, 26, 27).

Ao considerar a influência de ambientes pró-inflamatórios e desordens imunológicas na replicação viral do TTV (18, 19), acredita-se que as características imunopatogênicas observadas no curso da COVID-19 possa influenciar a replicação e, conseqüentemente, os níveis de DNA-TTV encontrado nos casos de COVID-19,

especialmente os casos mais graves (5, 6, 11, 12). Foi observado em alguns estudos, onde foram notadas altas cargas virais de TTV em pacientes com quadros mais severos da doença e com pior prognóstico, enfatizando o seu potencial papel como biomarcador de severidade e prognóstico nestes casos (11, 12).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a excreção salivar de TTV em pacientes diagnosticados com COVID-19 e hospitalizados por suas complicações, assim como investigar a existência de uma associação com dados demográficos e clínicos, com o grau de severidade da doença e o desfecho destes pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O TorqueTeno virus (TTV) é um pequeno vírus de DNA de fita simples e não-envelopado pertencente à família *Anelloviridae*. Esta espécie de vírus foi descoberta inicialmente em 1997 como possível causador de um caso de hepatite pós-transfusional em humanos. Atualmente, sabe-se que esses vírus infectam humanos em altas taxas, chegando a aproximadamente 90% da população e, até o presente momento, não foram associados a nenhuma doença humana específica, sendo considerado não patogênico (15, 28). Diferentes tecidos e células podem ser alvo de replicação do TTV, como a medula óssea, vias aéreas e fígado, contudo um dos principais locais de replicação desse vírus são os linfócitos T (19, 29). Por isso acredita-se que o processo de replicação seja influenciado por distúrbios imunológicos e medicações imunossupressoras, sendo observado em pacientes pós-transplante que passaram por tratamento com drogas imunossupressoras que o TTV constitui mais de 65% do viroma, enquanto indivíduos sem terapia imunossupressora o TTV constitui apenas 10% (28, 30).

Diversos estudos tem se esforçado em mostrar a relação entre a carga viral e cinética do TTV no organismo humano e o desequilíbrio imunológico, como nos casos de infecções, doenças inflamatórias e rejeição de órgãos após transplante (12, 15, 28, 31-33). Estudos evidenciaram uma íntima relação entre a replicação do TTV e a alteração do estado imunológico, sendo já conhecida uma correlação entre o aumento da carga viral do TTV e a presença de quadros inflamatórios ou de imunossupressão (21-23, 34-36). Sabe-se, até o momento, que as respostas imunes adaptativas desempenham um papel essencial no controle da replicação do TTV, de forma a reduzir seus níveis detectáveis (13, 15, 20).

A cinética do TTV pode estar relacionada a diferentes quadros, como por exemplo, enquanto altas cargas de TTV estão relacionados a complicações infecciosas após transplantes de órgãos sólidos, baixas cargas virais precedem rejeição aguda (37). Considerando indivíduos não imunossuprimidos, altas cargas de TTV foram observadas em doenças pulmonares crônicas e de caráter inflamatório, como asma, bronquiectasia crônica ou doença pulmonar obstrutiva crônica (12). Em conjunto, esses dados sugerem a possibilidade de que ambientes pró-inflamatórios possam estimular a replicação deste vírus (12). Nesse contexto, o TTV tem sido descrito como potencial biomarcador de imunossupressão,

especialmente em casos de terapias com drogas imunossupressoras, as quais geram um quadro de imunossupressão, como no pós-transplante de órgãos sólidos e células tronco hematopoiéticas, além de outras condições como doenças crônicas inflamatórias, auto-imunes e câncer, condições as quais permitem que o TTV se replique em altos níveis e se tornem detectáveis em diferentes fluídos, como plasma, saliva e soro (13, 18, 33, 38).

A identificação de cargas virais de TTV tem sido alvo de investigação especialmente nos casos de COVID-19 (11, 12), isto devido ao cenário em que se desenvolveu e a sua natureza inflamatória (4-6). A COVID-19 é uma doença causada pelo Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), descoberto em 2019 em Wuhan, província de Hubei, na China (1). Desde então, o vírus se espalhou rapidamente por todo o mundo, tornando-se uma pandemia de grandes proporções (1, 39, 40). Apesar do nome dado ao vírus, a COVID-19 consiste em uma síndrome multisistêmica grave, que envolve diferentes cascatas imunológicas e inflamatórias no seu desenvolvimento (2, 3), tendo a resposta imune desbalanceada ou ausente e a produção de citocinas correlação com a gravidade e pior prognóstico da doença (2, 4).

O interesse na investigação do uso do TTV como biomarcador imunológico tem aumentado, especialmente nos casos de imunossupressão induzidas pós-transplante, condições de caráter inflamatório e infeccioso (12, 17, 32, 33), sendo possível ser identificado em diferentes fluidos biológicos com níveis variados (13, 33, 38). No caso de doenças de caráter infeccioso, os biomarcadores são fontes de informações adicionais sobre as ações dos vírus no organismo e como esse reage à infecção (3). A saliva tornou-se alvo de interesse para realização de diagnóstico, prognóstico e estudo de várias condições patológicas, e isso se deve a diversas vantagens apresentadas, como: método não invasivo, fácil coleta, baixo custo, entre outros (7, 41). Além disso, na saliva é possível encontrar hormônios, fatores de crescimento, enzimas, anticorpos e microorganismos, que podem ser úteis na identificação precoce de várias doenças. Por essa razão, a saliva é considerada uma das principais fontes de biomarcadores do organismo humano (8, 41).

Elucidando a relação entre a replicação do TTV e a alteração do estado imunológico, observa-se que, quando comparado a indivíduos imunocompetentes, casos de infecção por HIV com baixos níveis de células T CD4+ e imunossupressão induzida por drogas apresentam níveis mais altos de viremia de TTV (42). No caso

de pacientes diagnosticados com COVID-19, especialmente em quadros moderados e graves, até o momento, tem-se que altas cargas virais de TTV são observadas em pacientes com quadros mais severos da doença e com pior prognóstico (11, 12), e os níveis reduzem uma vez que os sintomas respiratórios se resolvem (43). Além disso, o aumento dos níveis de TTV no plasma de pacientes com COVID-19 em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) pode estar relacionado ao aumento do risco de bacteremia, pneumonia e maior mortalidade (12). Apesar da aplicabilidade do TTV para monitorar pacientes com COVID-19 ainda ser controversa na literatura devido aos diferentes níveis detectados nestes pacientes (44, 45), acredita-se que a cinética do TTV nestes pacientes seja influenciada pela deficiência ou resposta imune desbalanceada contra o SARS-CoV-2, em que é detectado um quadro de linfopenia e produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, especialmente nos quadros mais severos (3, 12). Esta resposta pode desencadear um aumento na replicação do TTV, e, conseqüentemente, seus níveis detectáveis passam a refletir o estado de imunossupressão nestes pacientes (12).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a excreção salivar de TorqueTeno vírus (TTV) em pacientes internados por complicações da COVID-19, associando sua presença e carga viral com dados clínicos e demográficos, gravidade da doença (casos moderados e graves) e desfechos (alta e óbito).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Infectologia Emílio Ribas – IIER, CAAE: 35589320.6.0000.0061 e número de parecer: 4.205.770 (Anexo A). O estudo foi conduzido sob as normas éticas dos comitês institucionais e nacionais e pela declaração de Helsinki de 1964 e subsequentes emendas.

4.2 PACIENTES E AMOSTRAS

A população foi composta de 176 pacientes com manifestações clínicas sugestivas de COVID-19, de ambos os sexos, maiores de 18 anos, atendidos no Instituto de Infectologia Emílio Ribas internados na enfermaria (quadros moderados) ou na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) desta instituição (quadros graves) no período de outubro a dezembro de 2021, e cujo diagnóstico tenha sido confirmado por análise molecular das amostras de swab nasofaríngeo coletadas no primeiro atendimento. Os pacientes incluídos no estudo assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram distribuídos de acordo com a forma clínica: moderada (caracterizada pela presença de sintomas gripais associados a comprometimento pulmonar <50%, medidos por tomografia computadorizada e saturação de O₂ >93% em ar ambiente, na qual há necessidade de internação no serviço de enfermaria) e grave (definida por frequência respiratória superior a 30 respirações por minuto, saturação de O₂ <93% em ar ambiente e comprometimento pulmonar >50% medido por tomografia computadorizada, no caso destes pacientes houve necessidade de internação na UTI). Os dados clínicos e demográficos foram coletados dos prontuários médicos dos pacientes. Os principais critérios de exclusão adotados foram pacientes classificados com a forma leve, gestantes e menores de 18 anos.

4.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SALIVA

As amostras de saliva foram coletadas na data de internação dos pacientes hospitalizados por complicações da COVID-19. A coleta da saliva foi realizada com

o auxílio do dispositivo de coleta Salivette® (Sarstedt AD & Co., Germany) e devidamente identificado. Os pacientes foram orientados a não ingerir alimentos ou bebidas e escovar os dentes até 2 horas antes da coleta, e toda a coleta foi realizada pela manhã (entre 7:00 e 11:00). As instruções quanto a realização da coleta foram: após remoção do rolete de algodão do tubo de coleta, o indivíduo deve mastigar levemente o rolete de algodão por aproximadamente 90 segundos até que o algodão fique embebido de saliva, em seguida o mesmo deve ser devolvido ao tubo Salivette®. O tubo, com o algodão, foi centrifugado a 1000 x g, por 2 minutos à temperatura ambiente, desta forma a saliva se deposita no fundo do tubo. Por fim, o algodão foi removido, o tubo fechado e a amostra armazenada em freezer - 80°C. (Figura 4.1). No caso dos pacientes sob ventilação mecânica, o cirurgião-dentista, com o uso de uma pinça clínica, manteve o rolete de algodão na cavidade oral do paciente por também 90 segundos, em seguida seguindo os mesmos passos.

Figura 4.1 – Coleta de saliva com o uso do dispositivo Salivette®.



Fonte: O autor.

4.4 ANÁLISES MOLECULARES

4.4.1 Detecção do SARS-CoV-2

O ácido nucléico total foi extraído e purificado com o uso do Extracta Kit – RNA e DNA Viral (Loccus, Brasil) no equipamento Extrator e Purificador de DNA e RNA –

EXTRACTA 32 (Loccus, Brasil) a partir de 200 µL de saliva de cada amostra de saliva, e eluição final em 100 µL, seguindo instruções do fabricante. A detecção do RNA viral de SARS-CoV-2 foi realizada com o uso do SARS-CoV-2 RT-qPCR Reagent kit (PerkinElmer, Finlândia), seguindo as instruções do fabricante. O protocolo adotado teve como principais alvos os genes ORF1ab e proteína do nucleocapsídeo (N), além de ter sido utilizado um controle interno. Em suma, 14 µL de RNA extraído foi adicionado a mistura de reagentes, previamente preparados, contendo 1 µL do CoV2 Reagent A e 5 µL do CoV2 Enzyme Mix, totalizando um volume final de 20 µL de reação. O protocolo seguiu com a ciclagem sugerida pelo fabricante de 2 minutos a 25°C, 15 minutos a 50°C para a transcrição reversa, seguida da etapa inicial de desnaturação de 2 minutos a 95°C e 45 ciclos de amplificação de 95°C por 3 segundos e 60° por 30 segundos.

4.4.2 Detecção e quantificação do TTV

A detecção do material genético do TTV na saliva foi realizada através de reação em cadeia da polimerase em tempo-real (RT-PCR) utilizando sondas e primers específicos para a região denominada *untranslated region* (UTR), a qual é uma região altamente conservada do genoma, sendo o primer forward (5'-GTGCCGIAGGTGAGTTTA-3'), primer reverso (5'-AGCCCGGCCAGTCC-3') e sonda (FAM5'-TCAAGGGGCAATTCGGGCT-3'MGBNFQ), conforme descrito anteriormente por Maggi et al. (2001) (47). Foi utilizada uma curva padrão com quantias conhecidas de oligonucleotídeos sintéticos para quantificação absoluta do DNA-TTV através de RT-qPCR, utilizando kit TaqMan™ RT-qPCR, conforme descrito por Tozetto-Mendoza et al. (2020). A amplificação do DNA-TTV foi executada seguindo os protocolos do kit TaqMan™ Universal PCR master mix (Thermo Fisher Scientific, Warrington, UK). A análise dos dados foi feita utilizando o software QuantStudio Design & Analysis v.1.4.1. Para os controles positivos e negativos para TTV na saliva foram usadas amostras de saliva armazenadas no repositório do Laboratório de Virologia do Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brasil. O range de detecção de TTV na saliva foi de 1.6 a 7.4 log₁₀ cópias/ml, sendo então o limite mais baixo de detecção do ensaio RT-qPCR para o TTV de 40 cópias/ml (1.6 log₁₀ cópias/ml) (46).

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram tabulados em planilhas do Microsoft Excel e transferidos para análise no SPSS version 20.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA). O teste de normalidade mostrou distribuição normal para idade (Shapiro-Wilk, $p=0.065$) e anormal para o quantitativo do TTV (Shapiro-Wilk, $p<0.001$), portanto para avaliação da idade com a gravidade da doença COVID-19 foi utilizado o Teste T *student*, e para o quantitativo do TTV utilizou-se os testes de Mann-Whitney para comparação com desfecho e gravidade. Para comparação das variáveis categóricas do estudo com a positividade do TTV e gravidade da doença, foi utilizado o Teste Qui-Quadrado de Pearson ou Exato de Fisher. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

Para análise dos dados e avaliação dos objetivos, foram utilizados todos os casos comprovadamente positivos para o SARS-CoV-2, pelo teste de swab nasofaríngeo. A amostra final compreendeu 176 pacientes que foram divididos conforme local de internação e gravidade da doença COVID-19, sendo 88 pacientes classificados como casos moderados e internados em enfermaria e 88 pacientes como casos graves e internados em unidade de terapia intensiva (UTI).

A descrição dos resultados, de acordo com a gravidade da doença, está apresentada na Tabela 5.1. A idade média da amostra foi de $53,89 \pm 13,80$ anos, sendo semelhantes entre os casos moderados ($53,82 \pm 14,43$) e graves ($53,97 \pm 13,23$), (*t* student, $p=0,944$). A maioria dos pacientes era do sexo masculino, sendo mais homens apresentando quadro grave quando comparado às mulheres (Qui-Quadrado de Pearson, $p=0,014$). Em relação aos parâmetros “necessidade de suporte de oxigênio”, “intubação orotraqueal”, “responsividade”, “mobilidade”, “alimentação por via oral” e “uso de sonda nasogástrica”, os piores cenários foram observados em pacientes graves quando comparados aos pacientes em enfermaria, todos com resultados estatisticamente significativos (Qui-Quadrado de Pearson, $p<0.001$). A maioria dos pacientes internados (88,1%) não haviam recebido nenhuma dose da vacina contra COVID-19. Proporcionalmente, os pacientes graves tinham uma maior prevalência de óbitos (Qui-Quadrado de Pearson, $p=0.003$). Em relação aos sinais e sintomas dos pacientes avaliados no presente estudo, observou-se semelhança entre as distribuições quando comparados os pacientes classificados como moderados ou graves (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Relação das características demográficas e clínicas dos participantes do estudo com a classificação da gravidade da doença.

Variável	Moderado n (%)	Grave n (%)	TOTAL n (%)	p
Sexo				
Masculino	45 (51,1)	61 (69,3)	106 (60,2)	0.014* (1)
Feminino	43 (48,9)	27 (30,7)	70 (39,8)	
Saliva – COVID				
Negativo	38 (43,2)	24 (27,3)	62 (35,2)	0.027* (1)
Positivo	50 (56,8)	64 (72,7)	114 (64,8)	
Respiração em Ar ambiente				
Não	68 (77,3)	69 (78,4)	137 (77,8)	0.856(1)
Sim	20 (22,7)	19 (21,6)	39 (22,2)	
Suporte de oxigênio				
Não	26 (29,5)	45 (51,1)	71 (40,3)	<0.004* (1)
Sim	62 (70,5)	43 (48,9)	105 (59,7)	
Intubação orotraqueal (IOT)				
Não	82 (93,2)	63 (71,6)	145 (82,4)	<0.001* (1)
Sim	6 (6,8)	25 (28,4)	31 (17,6)	
Responsividade				
Não	9 (10,2)	26 (29,5)	35 (19,9)	0.001* (1)
Sim	79 (89,8)	62 (70,5)	141 (80,1)	
Mobilidade				
Não	23 (26,1)	61 (69,3)	84 (47,7)	<0.001* (1)
Sim	65 (73,9)	27 (30,7)	92 (52,3)	
Alimentação por via oral				
Não	7 (8,0)	27 (30,7)	34 (19,3)	<0.001* (1)
Sim	81 (92,0)	61 (69,3)	142 (80,7)	
Uso de sonda nasogástrica				
Não	81 (92,0)	63 (71,6)	144 (81,8)	<0.001* (1)
Sim	7 (8,0)	25 (28,4)	32 (18,2)	
Histórico de vacina contra COVID-19				
Não	77 (87,5)	78 (88,6)	155 (88,1)	0.816(1)
Sim	11 (12,5)	10 (11,4)	21 (11,9)	
Desfecho				
Alta	84 (95,5)	71 (80,7)	155 (88,1)	0.003 (1)
Óbito	4 (4,5)	17 (19,3)	21 (11,9)	
Sinais e Sintomas				
Febre				
Não	33 (37,5)	30 (34,1)	63 (35,8)	0.637(1)
Sim	55 (62,5)	58 (65,9)	113 (64,2)	
Tosse				
Não	27 (30,7)	29 (33,0)	56 (31,8)	0.746(1)
Sim	61 (69,3)	59 (67,0)	120 (68,2)	
Cefaleia				
Não	58 (65,9)	55 (62,5)	113 (64,2)	0.637(1)
Sim	30 (34,1)	33 (37,5)	63 (35,8)	
Dor de garganta				
Não	70 (79,5)	74 (84,1)	144 (81,8)	0.434(1)
Sim	18 (20,5)	14 (15,9)	32 (18,2)	
Mialgia				
Não	55 (62,5)	54 (61,4)	109 (61,9)	0.877(1)

Sim	33 (37,5)	34 (38,6)	67 (38,1)	
Fadiga				
Não	46 (52,3)	50 (56,8)	96 (54,5)	0.545 ⁽¹⁾
Sim	42 (47,7)	38 (43,2)	80 (45,5)	
Coriza				
Não	78 (88,6)	71 (80,7)	149 (84,7)	0.143 ⁽¹⁾
Sim	10 (11,4)	17 (19,3)	27 (15,3)	
Dispneia				
Não	33 (37,5)	35 (39,8)	68 (38,6)	0.757
Sim	55 (62,5)	53 (60,2)	108 (61,4)	
Anosmia/Ageusia				
Não	69 (78,4)	59 (67,0)	128 (72,7)	0.091 ⁽¹⁾
Sim	19 (21,6)	29 (33,0)	48 (27,3)	
Náusea/Vômito				
Não	79 (89,8)	77 (87,5)	156 (88,6)	0.635 ⁽¹⁾
Sim	9 (10,2)	11 (12,5)	20 (11,4)	
Diarreia				
Não	72 (81,8)	76 (86,4)	148 (84,1)	0.410 ⁽¹⁾
Sim	16 (18,2)	12 (13,6)	28 (15,9)	
Inapetência				
Não	78 (88,6)	81 (92,0)	159 (90,3)	0.444 ⁽¹⁾
Sim	10 (11,4)	7 (8,0)	17 (9,7)	
Dor facial				
Não	86 (97,7)	83 (94,3)	169 (96,0)	0.444 ⁽²⁾
Sim	2 (2,3)	5 (5,7)	7 (4,0)	
Tontura				
Não	82 (93,2)	86 (97,7)	168 (95,5)	0.278 ⁽²⁾
Sim	6 (6,8)	2 (2,3)	8 (4,5)	
Dor abdominal				
Não	87 (98,9)	87 (98,9)	174 (98,9)	0.999 ⁽²⁾
Sim	1 (1,1)	1 (1,1)	2 (1,1)	
TOTAL	88 (100)	88 (100)	176 (100)	

⁽¹⁾ Qui-Quadrado de Pearson; ⁽²⁾ Teste Exato de Fisher; *Significância estatística ($p < 0.05$).

Observação: Teste realizado no momento do primeiro contato com o paciente durante a coleta, alguns pacientes já tinham tempo de internação vigente.

Fonte: O autor.

A Tabela 5.2 refere-se à relação da presença do TTV com parâmetros clínicos e demográficos. Observou-se que o TTV foi, proporcionalmente, mais prevalente no sexo masculino e em pacientes graves, porém sem significância estatística para estes parâmetros. Não houve nenhuma associação entre a presença do SARS-CoV-2 em saliva e a variável “respiração em ar ambiente”, indicativa de menor gravidade da doença, com a carga de TTV. Pacientes intubados, irresponsivos, sem mobilidade, em uso de sonda nasogástrica ou que estavam impossibilitados de alimentação via oral apresentaram uma prevalência maior do TTV, todos estes resultados com significância estatística (Qui-Quadrado de Pearson, $p < 0.001$), exceto a variável “mobilidade”. Pacientes que evoluíram para óbito apresentaram maior prevalência do TTV quando comparado aos pacientes com alta hospitalar (Qui-Quadrado de Pearson, $p = 0.003$). De maneira geral, variáveis que denotam gravidade apresentaram associação com a positividade para o TTV.

Tabela 5.2 – Relação da positividade do TTV com as variáveis do estudo.

Variável	TTV			p
	Negativo n (%)	Positivo n (%)	Total n (%)	
Sexo				
Masculino	42 (39,6)	64 (60,4)	106 (100)	0,123 ⁽¹⁾
Feminino	36 (51,4)	34 (48,6)	70 (100)	
Gravidade da doença				
Moderado	44 (50,0)	44 (50,0)	88 (100)	0.129 ⁽¹⁾
Grave	34 (38,6)	54 (61,4)	88 (100)	
Saliva – COVID				
Negativo	24 (38,7)	38 (61,3)	62 (100)	0.269 ⁽¹⁾
Positivo	54 (47,4)	60 (52,6)	114 (100)	
Respiração em Ar ambiente				
Não	61 (44,5)	76 (55,5)	137 (100)	0.917 ⁽¹⁾
Sim	17 (43,6)	22 (56,4)	39 (100)	
Suporte de oxigênio				
Não	24 (33,8)	47 (66,2)	71 (100)	0.021* ⁽¹⁾
Sim	54 (51,4)	51 (48,6)	105 (100)	
Intubação orotraqueal (IOT)				
Não	71 (49,0)	74 (51,0)	145 (100)	0.007* ⁽¹⁾
Sim	7 (22,6)	24 (77,4)	31 (100)	
Responsividade				
Não	10 (28,6)	25 (71,4)	35 (100)	0.036* ⁽¹⁾
Sim	68 (48,2)	73 (51,8)	141 (100)	
Mobilidade				
Não	32 (38,1)	52 (61,9)	84 (100)	0.112 ⁽¹⁾
Sim	46 (50,0)	46 (50,0)	92 (100)	
Alimentação por via oral				
Não	8 (23,5)	26 (76,5)	34 (100)	0.007* ⁽¹⁾
Sim	70 (49,3)	72 (50,7)	142 (100)	
Uso de sonda nasogástrica				
Não	71 (49,3)	73 (50,7)	144 (100)	0.005* ⁽¹⁾
Sim	7 (21,9)	25 (78,1)	32 (100)	
Histórico de vacina contra COVID-19				
Não	68 (43,9)	87 (56,1)	155 (100)	0.746 ⁽¹⁾
Sim	10 (47,6)	11 (52,4)	21 (100)	
Desfecho				
Alta	75 (48,4)	80 (51,6)	155 (100)	0.003* ⁽¹⁾
Óbito	3 (14,3)	18 (85,7)	21 (100)	

⁽¹⁾ Qui-Quadrado de Pearson; *Significância estatística (p<0.05).

Fonte: O autor.

A Tabela 5.3 resume a distribuição da carga salivar de TTV com a classificação da gravidade da COVID-19 e desfecho, ambas as associações foram estatisticamente significantes. Os maiores valores dos *Ranks* foram encontrados nos pacientes graves e naqueles que evoluíram ao óbito (Mann-Whitney, $p < 0.005$).

Tabela 5.3 – Distribuição do quantitativo do TTV (\log_{10} cópias/mL) com classificação da doença quanto a gravidade e desfecho

Variável	N	Média	Desvio-padrão	Rank	p ⁽¹⁾
Gravidade da doença					
Moderada	88	7.66	8.63	77,89	0.004*
Grave	88	7.32	8.06	99,11	
Desfecho					
Alta	221	6.85	7.82	82,95	<0.001*
Óbito	24	9.35	8.69	129,45	

⁽¹⁾ Teste de Mann-Whitney *Significância estatística ($p < 0.05$).

Fonte: O autor.

6 DISCUSSÃO

O TorqueTeno vírus (TTV) tem estabelecido uma infecção crônica e persistente em diversos locais do organismo sem associação a nenhuma doença humana, representando um importante componente do viroma humano (48). A DNAemia do TTV é documentada em indivíduos saudáveis e mostra relativa estabilidade no que diz respeito a sua magnitude ao longo dos anos (49). Contudo os seus níveis tem mostrado oscilações em pacientes que apresentam quadros de imunossupressão, assim altas cargas de DNA-TTV apresentam uma correlação clara, consistente e direta com a intensidade de imunossupressão individual (12, 31, 50). Além dos quadros de imunossupressão, altas cargas plasmáticas de TTV são observadas em pacientes com distúrbios crônicos de natureza inflamatória em comparação com indivíduos saudáveis, como nos casos de asma, bronquiectasia crônica e doença pulmonar obstrutiva crônica (26, 27).

Algumas desordens imunológicas e medicações anti-inflamatórias ou imunossupressoras podem afetar o equilíbrio imune favorecendo a replicação viral (18, 19, 35) o que permite a identificação de altos níveis de carga viral do TTV, que podem ser detectados em diferentes espécimes, como plasma, saliva e soro (13, 18). Assim, a possibilidade da replicação do TTV ser estimulada por ambientes pró-inflamatórios, as características imunopatogênicas observadas nos casos moderados a severos de COVID-19, como linfopenia e tempestade de citocina pró-inflamatórias, que levam a um agravamento do quadro da síndrome do desconforto respiratório agudo e a danos teciduais, e, conseqüentemente, levando a falência múltipla de diversos órgãos acometidos e morte (5, 6) somados as diversas vantagens e aplicabilidades da saliva como potencial biomarcador de diagnóstico e monitoramento do SARS-CoV-2 (51), leva a hipótese de que a detecção de DNA-TTV na saliva possa atuar como um biomarcador de severidade para o monitoramento de casos moderados a severo da COVID-19.

Todos os casos incluídos no estudo possuíam diagnóstico de COVID-19 por detecção molecular do SARS-CoV-2 em amostras de swab nasofaríngeo, e, na saliva, foi detectada a presença viral em 64.8% dos pacientes, evidenciando assim a persistência da presença do SARS-CoV-2 em saliva, uma vez que a primeira coleta de saliva foi realizada no início da internação, algumas vezes já distante do diagnóstico inicial da COVID-19. A saliva constitui assim não só um fluido com

potencial diagnóstico, mas também de acompanhamento de pacientes internados por complicações da COVID-19 (43, 51, 52).

A maioria dos casos, moderados ou severos, de COVID-19 observados no estudo ocorreram em indivíduos do sexo masculino ($p=0,014$), é possível observar uma clara tendência nesse caso. Estudos mostram esta mesma predominância no sexo masculino, assim algumas hipóteses foram levantadas na tentativa de elucidar esta prevalência, como, por exemplo, devido a mecanismos de proteção celular mediados pela presença dos hormônios femininos, possíveis diferenças nas respostas imunológicas baseada no sexo e até mesmo diferenças comportamentais entre ambos os sexos, como tabagismo, o qual é mais prevalente em indivíduos do sexo masculino (53-55). Quanto ao TTV, de maneira geral, é observado com maior prevalência em indivíduos saudáveis do sexo masculino (49, 56) e com maior faixa etária (56-58). Não divergindo do observado em indivíduos saudáveis, neste estudo, nos pacientes diagnosticados com COVID-19, observou-se uma maior prevalência de TTV em indivíduos do sexo masculino (60.4%), assim como visto quanto a maior severidade dos casos, o que está de acordo com o observado em outros estudos com indivíduos em estado de imunossupressão por diferentes causas (59-61).

Mudanças nas cargas virais de TTV podem estar relacionadas ao estado de imunossupressão ou imunocompetência de um indivíduo, sendo o aumento dessa um indicador do desenvolvimento de eventos infecciosos devido a maior imunossupressão (12). Considerando a imunopatogenia e natureza inflamatória da COVID-19 e o possível desenvolvimento de infecções secundárias em pacientes com quadros mais graves, é plausível assumir que a viremia de TTV esteja aumentada nesses casos, atuando como possível biomarcador de severidade (12). Ao avaliar a correlação da viremia do TTV e a severidade da COVID-19, observa-se que pacientes em piores condições clínicas e que evoluíram a óbito apresentaram maior prevalência do TTV em suas amostras de saliva ($p<0.001$), sugerindo uma correlação entre a presença do TTV e um pior prognóstico da doença. Atualmente, alguns estudos encontraram resultados similares que sugerem o potencial do TTV como biomarcador para severidade e prognóstico da COVID-19, embora com metodologias distintas desse estudo (12, 43, 45). Uma possível explicação para esse resultado é a natureza do TTV, alguns modelos *in vitro* já demonstraram a capacidade do TTV de estimular respostas inflamatórias, podendo levar a quadros pró-inflamatórios (62), como observado na infecção por SARS-CoV-2, ao passo que,

por outro lado, ambientes pró-inflamatórios podem acionar e estimular a replicação do TTV (12). Estes achados corroboram com a cinética observada no estudo de Mendes-Correa et al. (2021), em que foi avaliado o TTV na saliva e swab nasofaríngeo de pacientes SARS-CoV-2 positivos, e os níveis de TTV nestes pacientes apresentaram uma redução significativa à medida que os sintomas respiratórios foram sendo resolvidos e os níveis de SARS-CoV-2 reduziram (43), bem como o processo inflamatório envolvido no desenvolvimento da doença, elucidando o uso de ambientes pró-inflamatórios como estímulo para replicação.

Quanto aos parâmetros clínicos avaliados na COVID-19 que indicam maior severidade da doença, neste estudo foram avaliados o ambiente de internação (enfermaria ou UTI), necessidade de suporte de oxigênio, intubação orotraqueal, responsividade, mobilidade, alimentação via oral e uso de sonda nasogástrica, e, semelhante ao observado em outros estudos que também avaliaram algumas condições clínicas indicativas de severidade (12, 61). Pacientes graves apresentaram estatisticamente piores cenários, como necessidade de suporte de oxigênio, intubação orotraqueal, responsividade, mobilidade, alimentação por via oral e uso de sonda nasogástrica quando comparados aos pacientes com quadros moderados, assim como também apresentaram maior número de óbitos. Estes achados vão de encontro ao observado na literatura, em que as principais causas do óbito dos pacientes internados em UTI são por síndrome de disfunção de múltiplos órgãos relacionados a COVID-19 e infecções secundárias (63).

Quantitativamente, observou-se que uma maior carga do TTV foi detectada em pacientes com quadros graves, internados na UTI e que evoluíram a óbito, comparada aos pacientes com quadro moderado e internados na enfermaria. Concomitantemente, pacientes TTV-positivos apresentaram maior detecção de SARS-CoV-2 na saliva (52.6%), quando comparados aos TTV negativos (47.4%). Sabe-se que apresentações mais severas da doença devem apresentar uma resposta imune exacerbada (64) o que justificaria uma maior replicação e, conseqüentemente, detecção de maiores níveis de TTV. Contudo, diferente do observado neste estudo, Solis et al. (2022) constatou que a taxa de casos severos era maior em pacientes com baixas cargas de TTV, e, além disso, nestes mesmos casos, positivos para o SARS-CoV-2, a viremia observada era maior do que nos casos moderados, desta forma a carga de TTV e a viremia de SARS-CoV-2, concomitantes, permitiram prever o desfecho da COVID-19, sendo maior risco de

internação na UTI em pacientes com menor carga viral de TTV e positivos para SARS-CoV-2 (61). Por outro lado, assim como observado neste estudo, Forqué et al. (2022), ao avaliar se o TTV plasmático de pacientes com quadro severo de COVID-19 poderia prever a ocorrência de pneumonia associada à ventilação mecânica e infecções na corrente sanguínea e mortalidade, observaram que os pacientes que possuíam níveis detectáveis e maiores TTV no momento da internação apresentaram maior taxa de eventos infecciosos do que aqueles TTV negativos, ou comparativamente com níveis menores. Quanto a mortalidade, foi observado que pacientes que vieram a óbito apresentaram maior carga de TTV do que aqueles que sobreviveram (12).

Neste estudo foi possível detectar cargas de TTV em saliva de pacientes com quadro moderado e severo de COVID-19, sendo a prevalência de 50% entre os pacientes com quadro moderado e de 61.4% nos pacientes com quadro severo. Estes achados enfatizam o observado na literatura de que altas cargas virais de TTV podem ser detectadas em saliva (33, 44, 59). De maneira geral, a detecção do TTV pode ser feita em diferentes espécimes além do sangue (65), e a prevalência observada pode variar de acordo com as condições individuais, por exemplo, em indivíduos saudáveis no plasma é de aproximadamente 65% (49), em swab de 71.8% (11) e em saliva de 85% (57). Assim, o que poderia justificar as diferenças observadas nos trabalhos encontrados na literatura é a diferença de comportamento do TTV nos diferentes compartimentos biológicos.

Um dado importante é o grande número de pacientes não vacinados incluídos no estudo (88,1%). É essencial ressaltar que quando o estudo foi desenvolvido a maioria das vacinas ainda estavam em desenvolvimento e apenas grupos prioritários, considerados de risco, haviam sido vacinados, o que deve ser levado em consideração quando se avalia a questão de gravidade da doença (66). Estudos têm avaliado o papel preditivo do TTV em relação às respostas vacinais (64). Em um estudo realizado em receptores de transplante de pulmão foi investigado a resposta imune à vacina mRNA1273 e associação com a carga de TTV, e foi observado uma taxa de resposta de 40% após 2 aplicações e uma associação significativa entre melhores respostas à vacinação e cargas mais baixas de TTV (67). Sabe-se que em indivíduos saudáveis com níveis basais de TTV detectáveis apresentaram maior eficiência para determinadas vacinas, como, por exemplo, pacientes com níveis basais de TTV de 3.8 log₁₀ cópias/mL apresentaram uma resposta imune mais

eficiente para a vacina contra a influenza (68). Estes estudos elucidam a ampla e possível aplicabilidade do TTV além de biomarcador tanto de severidade da COVID-19, mas também como marcador de eficiência das vacinas, especialmente contra o SARS-CoV-2.

As cargas virais de TTV detectadas são variadas na literatura, dependendo da condição e níveis de imunossupressão e da população estudada. Por exemplo, pacientes submetidos a transplante renal apresentaram um aumento da carga viral plasmática de TTV pré-transplante e 6 meses pós-transplante, considerado pico, de $2.9 \pm 1.6 \log_{10}$ e $5.7 \pm 2.4 \log_{10}$, respectivamente (50). Já pacientes receptores de transplante pulmonar apresentaram uma carga viral média pré-transplante de $3.6 \pm 1.9 \log_{10}$ cópias/mL, chegando a um pico de $9.5 \pm 0.56 \log_{10}$ em aproximadamente 134 ± 87 dias (15). Além de pacientes receptores de transplante de órgãos sólidos, pacientes submetidos a transplante de células hematopoiéticas apresentaram uma carga viral média de TTV pré-transplante de $3.77 \log_{10}$ cópias/mL chegando a $3.81 \log_{10}$ cópias/mL pós-transplante (69). No caso de pacientes SARS-CoV-2 positivos com quadro moderado, observa-se uma redução na carga viral de TTV à medida que ocorre a resolução dos sintomas respiratórios, variando de $3.3 \log_{10}$ cópias/mL no 3-5 dia e chegando a $0.0 \log_{10}$ cópias/mL após 16 dias (43). Em um estudo conduzido por Spezia et al., (2022) observa-se uma prevalência de 71% de TTV em pacientes SARS-CoV-2 positivos com uma média de carga viral de TTV de $4.7 \log_{10}$ cópias/mL, enquanto pacientes SARS-CoV-2 negativos foi observada uma prevalência de 73% e carga viral de $4.6 \log_{10}$ cópias/mL (44). Em outro estudo realizado apenas em pacientes em estado crítico internados por COVID-19, observa-se uma média de $2.8 \log_{10}$ cópias/mL no momento da internação e chegando a um pico de $4.75 \log_{10}$ cópias/mL na quarta semana (12). Pelo fato de os valores de carga viral dos pacientes neste estudo possuírem distribuições não-paramétricas, há uma limitação em determinar os valores médios de carga viral para cada grupo, isto devido à grande divergência encontrada entre os valores médios individuais, causando alteração na média geral por grupo. Desta forma foi realizada a avaliação por forma de *ranks*, em que foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a gravidade da doença, desfecho e a carga viral de TTV na saliva, sendo os pacientes com quadro grave e que vieram a óbito obtendo maiores *ranks*, 99.11 e 129.45, respectivamente,

quando comparados aos pacientes com quadro moderado (77.89) e que receberam alta (82.95).

Além dos valores quantitativos de carga viral, estudos tem se esforçado para estabelecer limites mínimos e máximos de detecção de TTV com o intuito de prever os riscos e consequências de um estado de maior ou menor imunossupressão de um indivíduo. No caso de pacientes submetidos a transplantes, os valores limites de carga viral que sugerem risco de infecções oportunistas ou risco de rejeição pós-transplante ainda são controversos. Jaksch et al. (2018) mostram que níveis acima de 9,2 log₁₀ cópias/ml são capazes de prever o desenvolvimento de infecções secundárias, enquanto que níveis abaixo de 8.1 log₁₀ cópias/mL predizem o risco de rejeições/disfunção do enxerto (15). Não muito diferente, outros estudos mostram que cargas virais acima de 9,5 log₁₀ cópias/ml reflete um estado crítico de elevada imunossupressão estando associados a maiores riscos de infecções (31, 70), enquanto níveis abaixo de 7 log₁₀ cópias/ml estão associados a um risco de rejeição pós -transplante devido a um estado muito baixo de imunossupressão (71). No caso de pacientes com COVID-19, ainda não tem estabelecido um limite, contudo a presença de cargas virais plasmáticas de TTV detectáveis de ≥ 3.3 log₁₀ cópias/mL em pacientes com quadros severos tem sido associada a maiores riscos de desenvolvimento de infecções secundárias, e cargas crescentes de, em média, 25.8 cópias/dia de internação/mL associa-se a maior risco de óbito (12). Neste estudo, pacientes com pior prognóstico, que evoluíram para óbito, apresentaram uma carga viral média de TTV de 9.35 log₁₀ cópias/mL, enquanto os pacientes que receberam alta apresentaram uma carga de 6.85 log₁₀ cópias/mL, apresentando uma associação estatisticamente significativa entre o desfecho (prognóstico) e a carga viral. Apesar do resultado encontrado ser um indicativo do potencial uso do TTV como biomarcador de prognóstico, é importante ressaltar que estudos longitudinais são necessários para acompanhar a cinética do TTV ao longo de todo o curso da doença e investigar o seu papel como biomarcador de severidade e prognóstico na COVID-19.

As principais limitação deste estudo são: não foram incluídos pacientes com sintomas leves da COVID-19 pela dificuldade de acompanhamento destes para posteriores coletas de saliva. A distribuição não-paramétrica dos valores de carga viral impossibilita determinar valores médios quantitativos para os grupos classificados quanto a severidade, sendo assim foi utilizada a estratégia de ranks, a

qual tem a dificuldade de encontrar estudos semelhantes na literatura. Não foi realizada avaliação de outro parâmetro, além dos parâmetros clínicos, que avalie comparativamente o grau de imunossupressão nestes pacientes, como por exemplo contagem de linfócitos e presença de infecções oportunistas, como observado em outros estudos (11, 12). Não foi avaliado o TTV em outros espécimes além da saliva, não sendo possível elucidar as possíveis diferenças de comportamento nos diferentes compartimentos biológicos.

7 CONCLUSÃO

É possível concluir com os resultados apresentados neste estudo a existência de uma relação direta entre a presença de diferentes níveis de TTV na saliva e a severidade e o desfecho de casos de COVID-19, podendo ser útil como biomarcador de severidade e prognóstico da doença.

REFERÊNCIAS

1. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb;382(8):727-33. doi:10.1056/NEJMoa2001017.
2. Rothan HA, Byrareddy SN. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. *J Autoimmun*. 2020 Feb;109:102433. doi:10.1016/j.jaut.2020.102433.
3. Samprathi M, Jayashree M. Biomarkers in COVID-19: An Up-To-Date Review. *Front Pediatr*. 2020 Mar;8:607647. doi:10.3389/fped.2020.607647.
4. Huang C, Wang Y, Li X, Ren L, Zhao J, Hu Y, et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020 Jan;395(10223):497-506. doi:10.1016/S0140-6736(20)30183-5.
5. Leisman DE, Ronner L, Pinotti R, Taylor MD, Sinha P, Calfee CS, et al. Cytokine elevation in severe and critical COVID-19: a rapid systematic review, meta-analysis, and comparison with other inflammatory syndromes. *Lancet Respir Med*. 2020 Oct;8(12):1233-44. doi:10.1016/S2213-2600(20)30404-5.
6. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*. 2020 Jun;11:1446. doi:10.3389/fimmu.2020.01446.
7. Sapkota D, Soland TM, Galtung HK, Sand LP, Gianecchini S, To KKW, et al. COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J Clin Pathol [internet]*. 2020 Aug [citado 19 dez. 2022];jclinpath-2020-206834. Disponível em: <https://jcp.bmj.com/content/74/6/344.long>.
8. Henrique Braz-Silva P, Pallos D, Gianecchini S, To KK. SARS-CoV-2: What can saliva tell us? *Oral Dis*. 2021 May;27 Suppl 3(Suppl 3):746-7. doi:10.1111/odi.13365.
9. Fernandes LL, Pacheco VB, Borges L, Athwal HK, de Paula Eduardo F, Bezinelli L, et al. Saliva in the Diagnosis of COVID-19: A Review and New Research Directions. *J Dent Res*. 2020 Dec;99(13):1435-43. doi:10.1177/0022034520960070.
10. Napodano C, Calla C, Fiorita A, Marino M, Taddei E, Di Cesare T, et al. Salivary Biomarkers in COVID-19 Patients: Towards a Wide-Scale Test for Monitoring Disease Activity. *J Pers Med*. 2021 May;11(5):385. doi: 10.3390/jpm11050385.
11. Emmel V, Gama B, de Paula A, Ferreira G, Binato R, Abdelhay E. Can torque teno virus be a predictor of SARS-CoV-2 disease progression in cancer patients? *J Infect Chemother*. 2022 Dec;28(12):1623-7. doi: 10.1016/j.jiac.2022.08.015.
12. Forque L, Albert E, Gimenez E, Torres I, Carbonell N, Ferreres J, et al. Monitoring of Torque Teno virus DNAemia in critically ill COVID-19 patients: May it help to predict clinical outcomes? *J Clin Virol*. 2022 Mar;148:105082. doi:10.1016/j.jcv.2022.105082.
13. Mitchell AB, Glanville AR. Kinetics of TTV-DNA Plasma Load: A Global Measure of Immune Suppression? *Transplantation*. 2019 Apr;103(4):660-1. doi: 10.1097/TP.0000000000002437.
14. Hino S. TTV, a new human virus with single stranded circular DNA genome. *Rev Med Virol*. 2002 May-Jun;12(3):151-8. doi: 10.1002/rmv.351.
15. Jaksch P, Kundi M, Gorzer I, Murakozy G, Lambers C, Benazzo A, et al. Torque Teno Virus as a Novel Biomarker Targeting the Efficacy of Immunosuppression After Lung Transplantation. *J Infect Dis*. 2018 Nov;218(12):1922-8. doi: 10.1093/infdis/jiy452.

16. Larsson S, Soderberg-Naucler C, Wang FZ, Moller E. Cytomegalovirus DNA can be detected in peripheral blood mononuclear cells from all seropositive and most seronegative healthy blood donors over time. *Transfusion*. 1998 Mar;38(3):271-8. doi: 10.1046/j.1537-2995.1998.38398222871.x.
17. Madsen CD, Eugen-Olsen J, Kirk O, Parner J, Kaae Christensen J, Brasholt MS, et al. TTV viral load as a marker for immune reconstitution after initiation of HAART in HIV-infected patients. *HIV Clin Trials*. 2002 Jul-Aug;3(4):287-95. doi: 10.1310/8c94-vypq-ng1h-4cnw.
18. Focosi D, Antonelli G, Pistello M, Maggi F. Torquetenovirus: the human virome from bench to bedside. *Clin Microbiol Infect*. 2016 Jul;22(7):589-93. doi: 10.1016/j.cmi.2016.04.007.
19. Focosi D, Macera L, Boggi U, Nelli LC, Maggi F. Short-term kinetics of torque teno virus viraemia after induction immunosuppression confirm T lymphocytes as the main replication-competent cells. *J Gen Virol*. 2015 Jan;96(Pt 1):115-7. doi: 10.1099/vir.0.070094-0.
20. Chen T, Vaisanen E, Mattila PS, Hedman K, Soderlund-Venermo M. Antigenic diversity and seroprevalences of Torque teno viruses in children and adults by ORF2-based immunoassays. *J Gen Virol*. 2013 Feb;94(Pt 2):409-17. doi: 10.1099/vir.0.046862-0.
21. Maggi F, Pifferi M, Fornai C, Andreoli E, Tempestini E, Vatteroni M, et al. TT virus in the nasal secretions of children with acute respiratory diseases: relations to viremia and disease severity. *J Virol*. 2003 Feb;77(4):2418-25. doi: 10.1128/jvi.77.4.2418-2425.2003.
22. Pifferi M, Maggi F, Di Cristofano C, Cangioti AM, Nelli LC, Bevilacqua G, et al. Torquetenovirus infection and ciliary dysmotility in children with recurrent pneumonia. *Pediatr Infect Dis J*. 2008 May;27(5):413-8. doi: 10.1097/INF.0b013e318162a14f.
23. Lolomadze EA, Rebrikov DV. Constant companion: clinical and developmental aspects of torque teno virus infections. *Arch Virol*. 2020 Dec;165(12):2749-57. doi: 10.1007/s00705-020-04841-x.
24. Levine DJ, Glanville AR, Aboyoum C, Belperio J, Benden C, Berry GJ, et al. Antibody-mediated rejection of the lung: A consensus report of the International Society for Heart and Lung Transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2016 Apr;35(4):397-406. doi: 10.1016/j.healun.2016.01.1223.
25. Gorzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Mar;33(3):320-3. doi: 10.1016/j.healun.2013.12.007.
26. Pifferi M, Maggi F, Andreoli E, Lanini L, Marco ED, Fornai C, et al. Associations between nasal torquetenovirus load and spirometric indices in children with asthma. *J Infect Dis*. 2005 Oct;192(7):1141-8. doi: 10.1086/444389.
27. Xie Y, Xue Q, Jiao W, Wu J, Yu Y, Zhao L, et al. Associations Between Sputum Torque Teno Virus Load and Lung Function and Disease Severity in Patients With Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Apr;8:618757. doi: 10.3389/fmed.2021.618757.
28. Webb B, Rakibuzzaman A, Ramamoorthy S. Torque teno viruses in health and disease. *Virus Res*. 2020 Aug;285:198013. doi: 10.1016/j.virusres.2020.198013.
29. Frye BC, Bierbaum S, Falcone V, Kohler TC, Gasplmayr M, Hettich I, et al. Kinetics of Torque Teno Virus-DNA Plasma Load Predict Rejection in Lung Transplant Recipients. *Transplantation*. 2019 Apr;103(4):815-22. doi: 10.1097/TP.0000000000002436.
30. De Vlaminc I, Khush KK, Strehl C, Kohli B, Luikart H, Neff NF, et al. Temporal response of the human virome to immunosuppression and antiviral therapy. *Cell*. 2013 Nov;155(5):1178-87. doi: 10.1016/j.cell.2013.10.034.

31. Görzer I, Haloschan M, Jaksch P, Klepetko W, Puchhammer-Stöckl E. Plasma DNA levels of Torque teno virus and immunosuppression after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2014 Mar;33(3):320-3. doi: 10.1016/j.healun.2013.12.007.
32. Strassl R, Schiemann M, Doberer K, Gorzer I, Puchhammer-Stockl E, Eskandary F, et al. Quantification of Torque Teno Virus Viremia as a Prospective Biomarker for Infectious Disease in Kidney Allograft Recipients. *J Infect Dis*. 2018 Sep;218(8):1191-9. doi: 10.1093/infdis/jiy306.
33. Batista AM, Caetano MW, Stincarelli MA, Mamana AC, Zerbinati RM, Sarmento DJS, et al. Quantification of torque teno virus (TTV) DNA in saliva and plasma samples in patients at short time before and after kidney transplantation. *J Oral Microbiol*. 2022 Dec;14(1):2008140. doi: 10.1080/20002297.2021.2008140.
34. Abbas AA, Diamond JM, Chehoud C, Chang B, Kotzin JJ, Young JC, et al. The Perioperative Lung Transplant Virome: Torque Teno Viruses Are Elevated in Donor Lungs and Show Divergent Dynamics in Primary Graft Dysfunction. *Am J Transplant*. 2017 May;17(5):1313-24. doi: 10.1111/ajt.14076.
35. Albert E, Solano C, Pascual T, Torres I, Macera L, Focosi D, et al. Dynamics of Torque Teno virus plasma DNAemia in allogeneic stem cell transplant recipients. *J Clin Virol*. 2017 Sep;94:22-8. doi: 10.1016/j.jcv.2017.07.001.
36. Davila S, Halstead ES, Hall MW, Doctor A, Telford R, Holubkov R, et al. Viral DNAemia and Immune Suppression in Pediatric Sepsis. *Pediatr Crit Care Med*. 2018 Jan;19(1):e14-e22. doi: 10.1097/PCC.0000000000001376.
37. Redondo N, Navarro D, Aguado JM, Fernandez-Ruiz M. Viruses, friends, and foes: The case of Torque Teno Virus and the net state of immunosuppression. *Transpl Infect Dis*. 2022 Apr;24(2):e13778. doi: 10.1111/tid.13778.
38. Reza Hosseini O, Nielsen SD. Torque-Teno virus to optimize timing of vaccination against severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in solid organ transplant recipients. *J Clin Virol*. 2021 Oct;143:104967. doi: 10.1016/j.jcv.2021.104967.
39. Ren LL, Wang YM, Wu ZQ, Xiang ZC, Guo L, Xu T, et al. Identification of a novel coronavirus causing severe pneumonia in human: a descriptive study. *Chin Med J (Engl)*. 2020 May;133(9):1015-24. doi: 10.1097/CM9.0000000000000722.
40. Pereira G, Leao A, Erustes AG, Morais IBM, Vrechi TAM, Zamarioli LDS, et al. Pharmacological Modulators of Autophagy as a Potential Strategy for the Treatment of COVID-19. *Int J Mol Sci*. 2021 Apr;22(8). doi: 10.3390/ijms22084067.
41. Santos CN, Rezende KM, Oliveira Neto NF, Okay TS, Braz-Silva PH, Bonecker M. Saliva: an important alternative for screening and monitoring of COVID-19 in children. *Braz Oral Res*. 2020 Nov;34:e0125. doi: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0125.
42. Maggi F, Bendinelli M. Immunobiology of the Torque teno viruses and other anelloviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2009;331:65-90. doi: 10.1007/978-3-540-70972-5_5.
43. Mendes-Correa MC, Tozetto-Mendoza TR, Freire WS, Paiao HGO, Ferraz ABC, Mamana AC, et al. Torquetenovirus in saliva: A potential biomarker for SARS-CoV-2 infection? *PLoS One*. 2021 Aug;16(8):e0256357. doi: 10.1371/journal.pone.0256357.
44. Spezia PG, Baj A, Drago Ferrante F, Boutahar S, Azzi L, Genoni A, et al. Detection of Torquetenovirus and Redondovirus DNA in Saliva Samples from SARS-CoV-2-Positive and -Negative Subjects. *Viruses*. 2022 Nov;14(11). doi: 10.3390/v14112482.
45. Stincarelli MA, Baj A, Guidotti B, Spezia PG, Novazzi F, Lucenteforte E, et al. Plasma Torquetenovirus (TTV) microRNAs and severity of COVID-19. *Virol J*. 2022 May;19(1):79. doi: 10.1186/s12985-022-01812-3.

46. Tozetto-Mendoza TR, Bongiovanni AM, Minis E, Linhares IM, Boester A, Freire WS, et al. Torquetenovirus Titer in Vaginal Secretions from Pregnant and Postpartum Women: Association with Absence of *Lactobacillus crispatus* and Levels of Lactic Acid and Matrix Metalloproteinase-8. *Reprod Sci*. 2020 Nov;27(11):2075-81. doi: 10.1007/s43032-020-00227-1.
47. Maggi F, Fornai C, Vatteroni ML, Siciliano G, Menichetti F, Tascini C, et al. Low prevalence of TT virus in the cerebrospinal fluid of viremic patients with central nervous system disorders. *J Med Virol*. 2001 Oct;65(2):418-22. doi: 10.1002/jmv.2051.
48. Liang G, Bushman FD. The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nat Rev Microbiol*. 2021 Aug;19(8):514-27. doi: 10.1038/s41579-021-00536-5.
49. Focosi D, Spezia PG, Macera L, Salvadori S, Navarro D, Lanza M, et al. Assessment of prevalence and load of torquetenovirus viraemia in a large cohort of healthy blood donors. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Oct;26(10):1406-10. doi: 10.1016/j.cmi.2020.01.011.
50. Fernández-Ruiz M, Albert E, Giménez E, Ruiz-Merlo T, Parra P, López-Medrano F, et al. Monitoring of alphatorquevirus DNA levels for the prediction of immunosuppression-related complications after kidney transplantation. *Am J Transplant*. 2019 Apr;19(4):1139-49. doi: 10.1111/ajt.15145.
51. Ceron JJ, Lamy E, Martinez-Subiela S, Lopez-Jornet P, Capela ESF, Eckersall PD, et al. Use of Saliva for Diagnosis and Monitoring the SARS-CoV-2: A General Perspective. *J Clin Med*. 2020 May;9(5). doi: 10.3390/jcm9051491.
52. Azzi L, Carcano G, Gianfagna F, Grossi P, Gasperina DD, Genoni A, et al. Saliva is a reliable tool to detect SARS-CoV-2. *J Infect*. 2020 Jul;81(1):e45-e50. doi: 10.1016/j.jinf.2020.04.005
53. Pirhadi R, Sinai Talaulikar V, Onwude J, Manyonda I. Could Estrogen Protect Women From COVID-19? *J Clin Med Res*. 2020 Oct;12(10):634-9. doi: 10.14740/jocmr4303.
54. Lipsa A, Prabhu JS. Gender disparity in COVID-19: Role of sex steroid hormones. *Asian Pac J Trop Med*. 2021 Jan;14(1):5-9. doi: 10.4103/1995-7645.304293.
55. Mukherjee S, Pahan K. Is COVID-19 Gender-sensitive? *J Neuroimmune Pharmacol*. 2021 Mar;16(1):38-47. doi: 10.1007/s11481-020-09974-z.
56. Haloschan M, Bettesch R, Gorzer I, Weseslindtner L, Kundi M, Puchhammer-Stockl E. TTV DNA plasma load and its association with age, gender, and HCMV IgG serostatus in healthy adults. *Age (Dordr)*. 2014 Oct;36(5):9716. doi: 10.1007/s11357-014-9716-2.
57. Naganuma M, Tominaga N, Miyamura T, Soda A, Moriuchi M, Moriuchi H. TT virus prevalence, viral loads and genotypic variability in saliva from healthy Japanese children. *Acta Paediatr*. 2008 Dec;97(12):1686-90. doi: 10.1111/j.1651-2227.2008.00962.x.
58. Giacconi R, Maggi F, Macera L, Pistello M, Provinciali M, Giannechini S, et al. Torquetenovirus (TTV) load is associated with mortality in Italian elderly subjects. *Exp Gerontol*. 2018 Oct;112:103-11. doi: 10.1016/j.exger.2018.09.003.
59. Honorato L, Witkin SS, Mendes-Correa MC, Conde Toscano ALC, Linhares IM, de Paula AV, et al. The Torque Teno Virus Titer in Saliva Reflects the Level of Circulating CD4(+) T Lymphocytes and HIV in Individuals Undergoing Antiretroviral Maintenance Therapy. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Jan;8:809312. doi: 10.3389/fmed.2021.809312.
60. Mallet F, Diouf L, Meunier B, Perret M, Reynier F, Leissner P, et al. Herpes DNAemia and TTV Viraemia in Intensive Care Unit Critically Ill Patients: A Single-Centre Prospective Longitudinal Study. *Front Immunol*. 2021 Nov;12:698808. doi: 10.3389/fimmu.2021.698808.

61. Solis M, Gallais F, Garnier-Kepka S, Lefebvre N, Benotmane I, Ludes PO, et al. Combining predictive markers for severe COVID-19: Torquetenovirus DNA load and SARS-CoV-2 RNAemia. *J Clin Virol*. 2022 Mar;148:105120. doi: 10.1016/j.jcv.2022.105120.
62. Rocchi J, Ricci V, Albani M, Lanini L, Andreoli E, Macera L, et al. Torquetenovirus DNA drives proinflammatory cytokines production and secretion by immune cells via toll-like receptor 9. *Virology*. 2009 Nov;394(2):235-42. doi: 10.1016/j.virol.2009.08.036.
63. de Roquetaillade C, Bredin S, Lascarrou JB, Soumagne T, Cojocar M, Chousterman BG, et al. Timing and causes of death in severe COVID-19 patients. *Crit Care*. 2021 Jun;25(1):224. doi: 10.1186/s13054-021-03639-w.
64. Focosi D, Baj A, Azzi L, Novazzi F, Maggi F. TTV viral load as a predictor of antibody response to SARS COV-2 vaccination. *J Heart Lung Transplant*. 2022 Nov;42(2):143-4. doi: 10.1016/j.healun.2022.10.025.
65. Ross RS, Viazov S, Runde V, Schaefer UW, Roggendorf M. Detection of TT virus DNA in specimens other than blood. *J Clin Virol*. 1999 Aug;13(3):181-4. doi: 10.1016/s1386-6532(99)00015-3.
66. Mills MC, Salisbury D. The challenges of distributing COVID-19 vaccinations. *EClinicalMedicine*. 2021 Jan;31:100674. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100674.
67. Hoek RA, Verschuuren EA, de Vries RD, Vonk JM, van Baarle D, van der Heiden M, et al. High torque tenovirus (TTV) load before first vaccine dose is associated with poor serological response to COVID-19 vaccination in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant*. 2022 Jun;41(6):765-72. doi: 10.1016/j.healun.2022.03.006.
68. Maggi F, Tempestini E, Lanini L, Andreoli E, Fornai C, Gianecchini S, et al. Blood levels of TT virus following immune stimulation with influenza or hepatitis B vaccine. *J Med Virol*. 2005 Feb;75(2):358-65. doi: 10.1002/jmv.20278.
69. Giménez E, Monzó C, Albert E, Fuentes-Trillo A, Seda E, Piñana JL, et al. Diversity and dynamic changes of anelloviruses in plasma following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *J Med Virol*. 2021 Aug;93(8):5167-72. doi: 10.1002/jmv.26661.
70. Gorzer I, Jaksch P, Kundi M, Seitz T, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Pre-transplant plasma Torque Teno virus load and increase dynamics after lung transplantation. *PLoS One*. 2015 Apr;10(3):e0122975. doi: 10.1371/journal.pone.0122975.
71. Gorzer I, Jaksch P, Strassl R, Klepetko W, Puchhammer-Stockl E. Association between plasma Torque teno virus level and chronic lung allograft dysfunction after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2017 Mar;36(3):366-8. doi: 10.1016/j.healun.2016.10.011.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER

Plataforma
Brasil

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Co-infecção de vírus respiratórios e o novo SARS-CoV-2 em amostras de fluido oral (saliva) e Biomarcadores inflamatórios para prognóstico

Pesquisador: José Angelo Lauletta Lindoso

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35589320.6.0000.0061

Instituição Proponente: Instituto de Infectologia Emílio Ribas

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.205.770

Apresentação do Projeto:

COVID-19 é uma doença emergente causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, que foi identificado inicialmente na China e posteriormente espalhou-se para outros países, sendo considerada uma pandemia pela OMS. A doença se caracteriza principalmente por febre, tosse seca, mialgia, artralgia, podendo haver forma leve, moderada e grave em decorrência do comprometimento clínico. O diagnóstico se baseia principalmente na

deteção de RNA viral em amostras de secreção oral e nasal, colhidas por swab. A coleta por swab é um potencial gerador de aerossol, com risco elevado de contaminação do profissional de saúde, sendo assim a busca por alternativas se faz necessário.

Apesar da atual situação de pandemia do novo coronavírus - SARS-CoV-2, os vírus respiratórios comuns e mais conhecidos continuam circular. E a taxa de co-infecções encontrada pode variar devido a fatores como o período, duração e local do estudo proposto. O diagnóstico atual de COVID-19 se baseia na deteção de RNA viral por reação em cadeia da polimerase em tempo real, com sensibilidade de 95 % e utilizando amostra colhidas por swab nasal e oral combinado. Sabidamente, a coleta de amostras por swab nasal produz aerossol e aumenta o risco de contaminação de profissionais de saúde, responsáveis pela coleta. É fundamental que tenhamos outros fluidos para diagnóstico de COVID-19 que durante a sua coleta sejam menos geradores de aerossol. O diagnóstico e deteção de agentes infecciosos através da saliva tem sido utilizado de forma cada vez mais frequente, sobretudo em infecções virais de diversos tipos (Castro et al.,

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

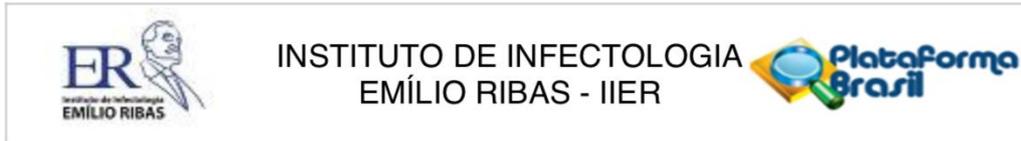
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



Continuação do Parecer: 4.205.770

2018; De Santana Sarmiento et al., 2018), incluindo vírus respiratórios (To et al., 2019; To et al., 2017). Trata-se de método não invasivo, de baixo custo e alta sensibilidade (Pallos et al., 2020; To et al., 2020; To et al., 2019; To et al., 2017). Outra vantagem desse tipo de fluido é a possibilidade de auto coleta, o que dispensa a presença de um profissional da saúde, minimizando dessa forma a carga de trabalho e a eventual exposição deste profissional ao agente infeccioso em questão (To et al., 2019; Braz-Silva et al., 2018). Estudo recentemente publicado mostrou a detecção de SARS-CoV-2 em amostras seriadas de saliva, mostrando positividade em 20 dos 23 participantes diagnosticados por swab de nasofaringe e escarro, mostrando que a saliva apresenta um excelente potencial diagnóstico para COVID19, além da possibilidade de acompanhamento molecular de pacientes internados. (To et al., 2020). Apesar da necessidade de estudos com maior

casuística para determinar o poder preditivo das amostras de saliva, no presente estudo verificou-se uma sensibilidade de 87% (95% intervalo de confiança, 65-97%).

O uso da saliva com finalidade diagnóstica e/ou de pesquisa abre a possibilidade para outras técnicas que não apenas a detecção direta do patógeno, como o uso da proteômica, metabolômica, detecção de anticorpos, sobretudo IgA, citocinas e quimiocinas, buscando biomarcadores que possam levar ao desenvolvimento de dispositivos diagnósticos point of care, além de auxiliar na compreensão da fisiopatogênese da doença (BrazSilva et al., 2020). Os coronavírus, como o SARS-CoV e o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), desenvolveram estratégias para diminuir ou retardar a produção de IFN, desencadeando respostas inflamatórias exuberantes, levando a quadros pulmonares graves (Fehr et al.,

2017; Kindler et al., 2016; Channappanavar et al., 2016; Chen et al., 2020). Acredita-se que a resposta imune desregulada do hospedeiro e a produção de citocinas inflamatórias, conhecidas como "tempestade de citocinas", se correlacionem com a gravidade da doença e com mau prognóstico durante a infecção por SARS-CoV e MERS-CoV (Fehr et al., 2017; Newton et al., 2016; de Wit et al., 2016). Várias citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL-2, CCL-3, RANTES, IL-2 e IL-8, foram altamente expressas durante a infecção por MERS-CoV (Fehr et al., 2017; Zhou et al., 2014). Estudos recentes relataram que casos graves de COVID-19 exibem níveis plasmáticos aumentados de IL-2, IL-6, IL-7, IL10, GSCF, IP-10, MCP1, MIP-1A e TNF em comparação com casos leves, indicando que a resposta inflamatória mediada por liberação de citocinas é crítica na progressão da COVID-19 (Huang et al., 2020; Chen et al., 2020). Análise do transcriptoma de amostras de lavado broncoalveolar

mostrou um perfil distinto de citocinas inflamatórias para infecção por SARS-CoV-2, mostrando

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 **Fax:** (11)3896-1406 **E-mail:** comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 4.205.770

associação entre a patogênese por COVID-19 e a liberação excessiva de citocinas como CCL2 / MCP-1, CXCL10 / IP-10, CCL3 / MIP-1A e CCL4 / MIP1B (Xiong et al., 2020). Infecções respiratórias causadas por vírus induzem a produção de uma variedade de citocinas. E podem estar associadas tanto a recuperação quanto a complicação da infecção (Kimura et al, 2013). O vírus da influenza e o rinovírus humano, por exemplo, estão associados com uma maior produção de IL-1, IL-6, IL-8, principalmente, além de IFN-1, IFN- γ e TNF- α (Kimura et al, 2013; Antalis et al, 2018). Essas citocinas, principalmente a IL-6, por exemplo, está associada, quando produzida em excesso na resposta inflamatória, na contribuição da severidade da doença respiratória viral.

Recentes estudos, também mostram envolvimento de citocinas, como IL-17, no envolvimento do processo de agravamento da doença em infecções por Influenza A. Essas também aparentam envolvimento na infecção do SARS-CoV-2 (Antalis et al, 2018; Chi et al, 2020; Liu et al, 2019). Uma análise combinatória das citocinas e quimiocinas em amostras clínicas pode ser relevante na avaliação infecção ocasionada por um ou mais

vírus respiratórios nesse contexto (Chi et al, 2020). Marcadores do processo inflamatório, tais como citocinas e quimiocinas, podem ser medidos na saliva, apresentando potencial diagnóstico e prognóstico tanto de doenças da cavidade oral (Marques Filho et al., 2018; Pallos et al., 2015) como sistêmicas (Galhardo et al, 2020; Arenius et al.,2020; Äyräväinen et al., 2018; Abe et al., 2018; Janem et al., 2017; Pallos et al, 2015;), abrindo assim a possibilidade do uso deste fluido no

estabelecimento do perfil inflamatório da COVID-19, diferenciando possivelmente casos leves, moderados e avançados.

Hipótese:

Em pacientes com diagnóstico de COVID-19 espera-se que haja resposta imune inflamatória diferenciada nos três grupos de pacientes com manifestações clínicas distintas da doença e nessa população haverá cinética viral diferenciada. Espera-se que a saliva possa ser usada como espécime para diagnóstico de COVID-19, e que possa ser aplicada na prática clínica por ser de coleta mais fácil. As co-infecções com outros vírus respiratórios circulantes podem alterar o perfil da COVID-19 nos aspectos analisados pelo projeto.

Critério de Inclusão:

Pacientes com manifestação clínica sugestiva de COVID-19, de ambos os sexos, maiores de 18 anos de idade, que procurarem o pronto socorro do

Instituto de Infectologia Emílio Ribas, ou que forem internados neste serviço, serão convidados a participar do estudo. Os pacientes que

concordarem participar do estudo e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido serão

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

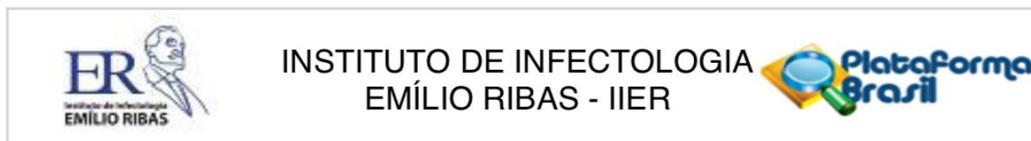
UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



Continuação do Parecer: 4.205.770

distribuídos de acordo com a forma clínica: leve, moderada e grave.

Critério de Exclusão:

Gestantes, menores de 18 anos e populações específicas (indígenas)

Neste projeto avaliaremos o uso da saliva para diagnóstico de COVID-19, assim como possíveis co-infecções com outros vírus respiratórios, comparando com a secreção colhida por swab combinado nasal-oral. Adicionalmente, amostras de saliva serão usadas para avaliação da resposta imune inflamatória de pacientes com COVID-19, nas formas leve, moderada e grave, bem como avaliaremos a cinética de excreção viral em diferentes tempos (0, 3, 9, 14 e 21 dias de doença). Também analisaremos a resposta imune humoral, pela detecção de anticorpos IgM, IgG e IgA nos tempos 0, 9, 14 e 21 dias, comparando com a cinética viral em saliva e secreção nasal e oral. O perfil metabólico e proteômico geral também será avaliado por técnicas de espectroscopia vibracional (Raman, SERS e FTIR).

Objetivo da Pesquisa:

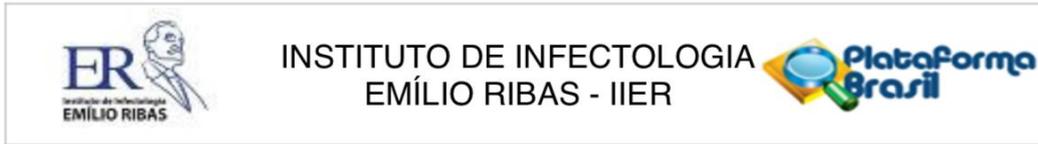
Objetivo Primário:

Avaliar a taxa de co-infecção de vírus respiratórios e SARS-CoV-2 - em período outono/inverno - durante a pandemia de COVID-19 utilizando-se de amostras de fluido oral (saliva) e diagnóstico molecular.

Objetivo Secundário:

- 1) Avaliar infecções e co-infecção por demais vírus causadores de infecções respiratórias.
- 2) Avaliar se amostras de fluido oral (saliva) podem ser uma opção para diagnóstico molecular de COVID-19 e outras infecções respiratórias virais.
- 3) Avaliar se a carga viral é diferente em saliva e swab nasal e de orofaringe;
- 4) Avaliar se há diferença na carga viral em saliva e swab combinado nasal e de orofaringe, nos diferentes grupos de pacientes;
- 5) Descrever a dinâmica de excreção de SARS-Co V-2 nos diferentes grupos de pacientes, avaliado em saliva e swab combinado e nasal e de orofaringe;
- 6) Avaliar se há diferença no perfil inflamatório, baseado na detecção de citocinas em plasma e saliva, dos diferentes grupos de pacientes
- 7) Avaliar o perfil de IgG, IgA e IgM em soro e saliva dos grupos analisados nos diferentes tempos propostos.

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 **Fax:** (11)3896-1406 **E-mail:** comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



Continuação do Parecer: 4.205.770

- 8) Avaliar se as técnicas de espectroscopia vibracional (Raman, SERS e FTIR) possuem sensibilidade e especificidade adequadas para poderem ser empregadas como via de diagnóstico "point-of-care" para COVID-19
- 9) Avaliar se o metabólito hepcidina ou outros presentes na saliva podem ser mensurados por técnicas de espectroscopia vibracional e assim ser empregados como marcadores para diagnóstico em tempo real

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Riscos mínimos relacionados ao desconforto das coletas de material biológico (sangue, swab nasal oral combinado e saliva).

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os participantes da pesquisa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante com interessante alternativa de diagnóstico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O CEP toma ciência e aprova o TCLE e projeto em epígrafe

Considerações Finais a critério do CEP:

O pesquisador deverá entregar uma cópia do Parecer de Aprovação do CEP à Seção de Pesquisa e Trabalhos Científicos da Divisão Científica e aguardar o documento denominado "Autorização Para o Início do Estudo". O pesquisador principal deverá enviar a este CEP os relatórios parciais e do final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1557995.pdf	24/07/2020 15:41:57		Aceito
Declaração de Pesquisadores	confidencialidade.doc	24/07/2020 15:41:31	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_confidencialidade.pdf	24/07/2020 15:36:02	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165

Bairro: Cerqueira César

CEP: 01.246-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3896-1406

Fax: (11)3896-1406

E-mail: comiteetica@emilioribas.sp.gov.br



INSTITUTO DE INFECTOLOGIA
EMÍLIO RIBAS - IIER



Continuação do Parecer: 4.205.770

Projeto Detalhado / Brochura Investigador	COVIDvirusresp.pdf	19/07/2020 22:33:38	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Outros	termo_FOUSP.pdf	19/07/2020 22:24:07	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderostoassinada.pdf	16/07/2020 17:08:58	José Angelo Lauletta Lindoso	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	15/07/2020 15:30:53	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Agosto de 2020

Assinado por:
TÂMARA NEWMAN LOBATO SOUZA
(Coordenador(a))

Endereço: Avenida Dr. Arnaldo 165
Bairro: Cerqueira César **CEP:** 01.246-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3896-1406 **Fax:** (11)3896-1406 **E-mail:** comiteetica@emilioribas.sp.gov.br