

AMANDA CAROLINE ZARPELLON

**Presença dos vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e
suas manifestações orais: uma avaliação biomolecular e
imuno-histoquímica de casos fatais de COVID-19**

São Paulo

2023

AMANDA CAROLINE ZARPELLON

**Presença dos vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e
suas manifestações orais: uma avaliação biomolecular e
imuno-histoquímica de casos fatais de COVID-19**

Versão Corrigida

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

Área de concentração: Área de concentração em Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva

São Paulo

2023

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

Zarpellon, Amanda Caroline.

Presença dos vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e suas manifestações orais: uma avaliação biomolecular e imuno-histoquímica de casos fatais de COVID-19 / Amanda Caroline Zarpellon; orientador Paulo Henrique Braz-Silva. -- São Paulo, 2023.

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

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

Versão original.

1. COVID-19. 2. SARS-CoV-2. 3. Papila lingual. 4. Tecido Periodontal. 5. Autópsia de superfície. I. Braz-Silva, Paulo Henrique. II. Título.

Zarpellon AC. Presença dos vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e suas manifestações orais: uma avaliação biomolecular e imuno-histoquímica de casos fatais de COVID-19. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Aprovado em: 06/07/2023

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a). Cassius Carvalho Torres-Pereira

Instituição: Universidade Federal do Paraná

Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Amaro Nunes Duarte-Neto

Instituição: Instituto Aldofo Lutz

Julgamento: APROVADA

Prof(a). Dr(a). Suzana Orsini Cantanhede Machado de Souza

Instituição: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo Julgamento: APROVADA

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais **Vera e Julio Zarpellon**, por sempre me incentivarem a fazer o meu melhor e não medirem esforços para me apoiarem em toda minha jornada profissional, mas principalmente em todos os passos de minha vida. Espero um dia poder retribuir com muita maestria tudo que vocês fizeram por mim.

As minhas irmãs **Ana Paula Zarpellon e Alessandra Novatski**, que assim como meus pais são minhas maiores torcedoras.

A meu companheiro e amor, **Zé (José Antunes)**, que a cada parágrafo que eu escrevia aqui me abraçava e expressava o quanto se orgulhava de mim. Seu amor, seu carinho e seu incentivo foram meu combustível e estão nessas páginas.

A minha amada cachorra **Lupita**, minha companheira e parceira diária, que me dá amor infinito e faz meus dias mais alegres.

Aos meus amigos de São Paulo **Maria Fernanda Ussier, Andréia Ortega, Daniel Mortatti, Fernanda Barella, Rafael Pinnotti, Graziela Gonzaga, Jorge D. Braga, Vitor do Vale Pereira, Fernanda Yumi**, que compreenderam a minha ausência quando ela se fez necessária, que compreenderam meu humor quando ele se tornou instável nesses anos e mesmo nas maiores adversidades nunca em nenhum momento largaram da minha mão.

Aos meus amigos de especialidade e equipe, **Andre Luis Bim, Sandro Bornelli, Angelo Llantada, Beatriz Motta, Camila e Alessandra Pimenta, Daiana Silva** que são meu braço direito e estão diariamente comigo nessa jornada.

Aos meus amigos de Curitiba, **Camila Rechia, Caroline Calliari, Priscila Cipriano, Letícia Moritz, Marina Britto, Juliana Kenski, Lenisa Raboni, Daniel Przybysz, João Francisco Zeni, Marcelo Wilinski, Alecsandro Zili**, que cresceram comigo, formaram meu caráter e apesar de longe torcem e vibram por cada conquista minha.

As minhas amigas da UFPR, **Amanda Corelhano, Débora Fachinelli, Aline Montovani e Angelina Camargo**. Juntas comemoramos cada conquista celebrada pelo grupo. Chegamos longe, meninas!

Aos meus colegas de pós-graduação, **Bruno Matuck, Sara Gomes, Cristina Novaes, Catharina Siminioni, Mariana Bergamini e Michele Palmieri** que me

apresentaram um mundo novo, me apoiaram, me incentivaram e me ajudaram muito nessa jornada. Sozinha isso jamais seria possível.

Àqueles que cuidam da minha saúde, **Dr. Anderson Martiniano** e **Dr Bruno Mendonça Coêlho**, que me ajudaram ao longo desses anos a construir ferramentas para que o hoje fosse possível.

Aos familiares das vítimas da COVID-19 que se dispuseram, mesmo num momento de dor, participar das pesquisas aqui relatadas. Sou imensamente grata a todos vocês.

Aos funcionários e técnico de autópsia do Instituto PISA (SVO – Hospital das Clínicas de São Paulo), **Jair Theodoro Filho** e colegas que foram fundamentais nas realizações das autópsias.

Aos funcionários dos laboratórios de Anatomia Patológica e Imunohistoquímica da Faculdade de Medicina de São Paulo, **Kely Cristina Bispo**, **Angela** e **Sandra** que possibilitaram todo o processamento das amostras e tornaram esse trabalho possível.

Aos colegas do laboratório de análises moleculares do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, **Michele Gomes Gouvea** e **Rodrigo Zerbinatti**, que aceitaram participar dessa pesquisa e fazerem com que esse trabalho fosse possível.

Dedico aos meus professores da graduação da UFPR, que dividiram comigo seus conhecimentos, sendo parte essencial da minha formação. A todos vocês meu muito obrigada.

Ao meu mentor e chefe da residência em Cirurgia de Traumatologia Bucomaxilofacial do Hospital Santa Casa de São Paulo, **Prof. Dr. Ronaldo de Freitas**, que sempre me estimulou a buscar conhecimento.

A toda equipe de assistentes do Hospital Santa Casa de São Paulo, **Dr. Alan do Canto**, **Dr. Fernando Maciel**, **Dra Manuela Pinotti**, **Dr. Jorge Gdikian**, que fizeram parte da minha formação como residente e formaram meu caráter profissional. A Santa Casa representa uma das bases da minha formação e tudo o que hoje conquisto profissionalmente esta apoiado e segue princípios dessa tão importante base.

Aos professores e equipe da pós graduação do departamento de Estomatologia da FOU SP que me estenderam a mão e me apresentaram com maestria o mundo da Patologia Oral.

Ao **Prof. Dr. Amaro Duarte-Neto** pela amizade, orientação e apoio, sendo um exemplo de dedicação em sua carreira. Sou extremamente honrada em ter tido o privilégio de trabalhar com você.

Ao **Prof. Dr. Luiz Fernando Ferraz da Silva e a Prof^a. Dr^a. Marisa Dolhnikoff**, por me acolherem no grupo de pesquisa em COVID-19. Sou muito grata por todo conhecimento passado, por todo apoio as pesquisas propostas e disponibilidade de auxílio sempre. Muito obrigada pela oportunidade e confiança me oferecida.

Ao **Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva** grande orientador e amigo, que não mediu esforços para que esse projeto se concretizasse. Serei eternamente grata pelas portas que se abriram a partir de ti. Obrigada pela confiança em mim.

A **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pela oportunidade de pesquisa. Obrigada pelo apoio com a bolsa em nível nacional para a realização do presente trabalho.

A todos, o meu muito obrigada.

“Isso de ser exatamente o que se é ainda vai nos levar além”

Paulo Leminski

RESUMO

Zarpellon AC. Presença dos vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e suas manifestações orais: uma avaliação biomolecular e imuno-histoquímica de casos fatais de COVID-19 [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

A COVID-19 é uma doença altamente contagiosa causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, responsável pela síndrome respiratória aguda grave, e que se propagou mundialmente como uma pandemia. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o SARS-CoV-2 é transmitido pelo ar através do contato com gotículas e aerossóis infectados, e pode ser transmitido por pessoas assintomáticas, pré-sintomáticas e sintomáticas. Os sintomas variam de leves a graves e podem incluir pneumonia, síndrome do desconforto respiratório agudo e complicações em órgãos extrapulmonares, podendo levar à morte. Comprometimento do paladar e disfunção salivar podem servir como indicadores preditivos. Este estudo tem como objetivo aprofundar a compreensão da relação entre o SARS-CoV-2 e os nichos epiteliais orais, através da análise de autópsias de pacientes falecidos por complicações da COVID-19. Para isso, foram realizadas 11 autópsias minimamente invasivas, recolhendo amostras de vários locais da cavidade oral, com o objetivo de identificar e caracterizar a presença do vírus em tecidos periodontais e papilas linguais. Foi constatado que 5 das 7 amostras de tecido periodontal e 7 das 11 amostras de papilas da língua apresentaram resultados positivos para SARS-CoV-2. A análise imuno-histoquímica revelou positividade para o anticorpo SARS em 63,63% dos casos de papila. Todos os casos envolvendo tecido periodontal e papilar mostraram franca positividade para ACE2 e TMPRSS2. A análise das lesões orais indicou a presença de coinfeções na maioria dos casos, o que destaca a condição de saúde frágil dos pacientes. O uso de autópsias para avaliar amostras bucais parece ser um método seguro que fornece uma visão geral da saúde bucal e sistêmica. No entanto, o uso de novas técnicas biomoleculares deve ser empregado para posterior validação em novas doenças com base em amostras de pacientes falecidos.

Palavras-chave: COVID-19, SARS-CoV-2, Papila lingual, Tecido Periodontal, Autópsia, Patologia Oral.

ABSTRACT

Zarpellon AC. Presence of SARS-CoV-2 in the oral cavity and its oral manifestations: a biomolecular and immunohistochemical evaluation from COVID-19 fatal cases [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2023. Versão Corrigida.

The highly contagious COVID-19 is a pandemic illness caused by SARS-CoV-2, a severe acute respiratory syndrome coronavirus. The World Health Organization designates SARS-CoV-2 as an airborne pathogen that spreads through contact with infected droplets and aerosols, transmitted by asymptomatic, pre-symptomatic, and symptomatic individuals. The disease's symptoms range from mild to severe, including pneumonia, acute respiratory distress syndrome, and complications in extrapulmonary organs, potentially leading to death. Early signs of COVID-19 include taste impairment and salivary dysfunction, which may serve as predictive indicators. The virus enters host cells through angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) and transmembrane protease serine 2 (TMPRSS2) expression, showing intense epithelial tropism. The objective of this research is to gain a better understanding and generate new insights regarding the connection between SARS-CoV-2 and oral epithelial niches through autopsies of deceased COVID-19 patients. This will involve developing novel sample methodologies and exploring the role of autopsies in dentistry. We conducted 11 minimally invasive autopsies, collecting samples from various sites in the oral cavity, with the goal of identifying and characterizing the presence of SARS-CoV-2 in periodontal tissues and tongue papillae. Additionally, we aimed to evaluate any clinically apparent oral lesions. Using biomolecular assays, we analyzed tissues from the tongue and gingiva and found that 5 out of 7 periodontal tissue samples and 7 out of 11 tongue papillae samples tested positive for SARS-CoV-2. The immunohistochemical analysis revealed positivity for SARS antibody in 63.63% of papilla cases. All cases involving periodontal and papillae tissue showed frank positivity for ACE2 and TMPRSS2. Our evaluation of oral lesions revealed that co-infections were present in most cases, highlighting the poor health status of the patients. The use of autopsies to evaluate oral samples appears to be a safe method

that provides an overview of oral and systemic health. However, the use of new biomolecular techniques should be employed for further validation in new diseases using samples from deceased patients.

Key-words: COVID-19, SARS-CoV-2, Tongue papillae, Periodontal Tissue, Autopsy, Oral Pathology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 3.1 - Autópsia minimamente invasiva – Guiada por videoscópio	46
Figura 3.2 - Avaliação histopatológica do tecido periodontal	46
Figura 4.1 - Aspectos clínicos de regiões orais em pacientes falecidos por COVID-19	55
Figura 4.2 - Fotomicrografia de um bloco de células de pacientes retratados na figura 4.1	56
Figura 5.1 - Achados histológicos de biópsia post-mortem: Papilas linguais de pacientes falecidos por COVID-19	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Características dos pacientes incluídos neste estudo e resultados da detecção de SARS-CoV-2 em tecidos periodontais	47
Tabela 5.1- Descrição das amostras de papilas gustativas	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
C	Celsius
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior
CCL	Chemokine (C-C motif) ligand
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COVID-19	Coronavirus Disease 2019
Ct	Cycle Threshold
CXCL	Ligante de quimiocina CXC
DM	Diabetes Melitus
DOI	Identificador de Objeto digital
EBV	Epstein Barr Vírus
EPI	Equipamento de Proteção Individual
GSCF	Fator de Estimulação de Colônia de Granulócitos
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HCMV	Citomegalovírus humano
HSV1	Vírus Herpes Simples do tipo I
H&E	Hematoxilina e eosina
H1N1	Vírus Influenza A
IL	Interleucina
IP	Imunoprecipitação
MCP	Proteína quimioatraente de Monócitos
MIP	Proteína inflamatória de Macrófagos
MERS	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
mRNA	RNA mensageiro
mm	milímetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS - BSA	Solução tampão fosfato/albumina de soro bovino
PISA	Plataforma de Imagens na Sala de Autópsia

qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa quantitativa
RANTES	Regulado na ativação, células T normais expressas e secretadas. Ligante 5 de quimiocina
RdRp	Polimerase de RNA dependente de RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Enzima que degrada RNA
rRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real
SAH	Hipertensão arterial sistêmica
SARS	Síndrome Respiratória Aguda Grave
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
S2	Subunidade 2 da Proteína S (Spike) do vírus SARS-Cov-2
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TMPRSS2	Serino Protease Transmembrana Tipo II
TNFa	Fator de Necrose Tumoral Alpha
TRCs	Células receptoras de paladar

PREFÁCIO

Esta tese contém 3 capítulos. Cada capítulo refere-se a um dos temas desenvolvidos durante a pesquisa de doutorado direto e está apresentado na forma de artigos científicos. Eles versam sobre o tema “vírus SARS-CoV-2 na cavidade oral e suas manifestações orais em casos fatais de COVID-19” e traduzem a evolução de um raciocínio histológico construído ao longo de anos de estudos sobre o tema. Cada Capítulo é uma tradução livre para o português do conteúdo de 3 artigos científicos construídos ao longo do Curso de Doutorado Direto, 2 artigos publicados em periódicos internacionais indexados e um a ser submetido.

- I. FERNANDES MATUCK B, DOLHNIKOFF M, DUARTE-NETO NA, MAIA G, GOMES SC, SENDYK DI, ZARPELLON A, ANDRADE NP, MONTEIRO RA, PINHO JRR, GOMES-GOUVÊA MS, SOUZA SCOM, KANAMURA C, MAUAD T, SALDIVA PHN, BRAZ-SILVA PH, CALDINI EG, DA SILVA LFF. **Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: a post-mortem study.** J Oral Microbiol, v. 13, n. 1, p. 1848135, Nov 2020. ISSN 2000-2297. Disponível em :< <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33391625> >
- II. ZARPELLON A, MATUCK BF, DOLHNIKOFF M, DUARTE-NETO AN, MAIA G, GOMES SC, SENDYK DI, SOUZA SCOM, MAUAD T, SALDIVA PHN, BRAZ-SILVA PH, DA SILVA LFF. **Oral lesions and SARS-CoV-2: A postmortem study.** Oral Dis, Oct 11 2021. ISSN 1601-0825. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34634156> >
- III. A submeter. **Análise histológica das papilas gustativas em amostras obtidas de pacientes que faleceram de COVID-19.**

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	25
1.1	COVID-19	25
1.2	CORONAVÍRUS	26
1.3	RECEPTORES	28
1.4	PERIODONTO	29
1.5	PAPILA	30
1.6	COVID-19 E MANIFESTAÇÕES ORAIS	31
2	PROPOSIÇÃO	33
3	CAPÍTULO I: TECIDOS PERIODONTAIS SÃO ALVOS DOS SARS-COV-2: UM ESTUDO POST-MORTEM	35
3.1	INTRODUÇÃO	35
3.2	PACIENTES E MÉTODOS.....	36
3.2.1	Protocolo de Segurança	37
3.2.2	Protocolo de Amostras	37
3.2.3	Diagnóstico histológico e molecular de SARS-CoV-2	38
3.3	RESULTADOS	39
3.4	DISCUSSÃO	39
3.5	AGRADECIMENTOS.....	42
3.6	DECLARAÇÃO DE TRANSPARÊNCIA.....	43
3.7	FINANCIAMENTO	43
3.8	REFERÊNCIAS.....	43
4	CAPÍTULO II: MANIFESTAÇÕES ORAIS E SARS-COV-2: UM ESTUDO POST-MORTEM	49
4.1	AGRADECIMENTOS.....	52
4.2	CONFLITO DE INTERESSES.....	53
4.3	REFERÊNCIAS.....	53
5	CAPÍTULO III: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS PAPILAS GUSTATIVAS EM AMOSTRAS OBTIDAS DE PACIENTES QUE FALECERAM DE COVID-19	59
5.1	INTRODUÇÃO	59

5.2	MATERIAL E MÉTODOS	60
5.3	RESULTADOS.....	62
5.4	DISCUSSÃO.....	63
5.5	REFERÊNCIAS	66
6	CONCLUSÃO.....	71
	REFERÊNCIAS	73
	ANEXOS	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 COVID-19

No final de 2019, surgiram inúmeros casos de pacientes infectados por um novo patógeno viral que causava insuficiência respiratória aguda e alta taxa de mortalidade. Esses eventos levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar estado de alerta diante de uma nova doença, denominada COVID-19 (Coronavirus Disease 2019). O agente causador da infecção respiratória é um vírus da família Coronaviridae conhecido como SARS-CoV-2. Desde a identificação da doença até Março de 2023, o número de pessoas infectadas em todo o mundo ultrapassou 670 milhões, resultando em mais de 6.800.000 mortes [1].

Os primeiros pacientes infectados com a doença manifestaram uma síndrome respiratória aguda semelhante a dois outros quadros pandêmicos ocorridos no século XXI: a Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) em 2002 e a Síndrome Respiratória do Oriente Médio (MERS) em 2011 [2]. A COVID-19 pode apresentar uma variedade de sintomas além dos respiratórios, como febre, mialgia, queixas gastrointestinais e cefaleia, entre outros. Em casos graves, a doença pode levar ao óbito. Além disso, muitos outros sinais e sintomas têm sido relatados, incluindo manifestações orais como dor de garganta, perda de paladar, boca seca, ulceração e vermelhidão da mucosa oral [3, 4].

Os coronavírus, incluindo o SARS-CoV (síndrome respiratória aguda grave) e o MERS-CoV (síndrome respiratória do Oriente Médio), têm a capacidade de reduzir ou atrasar a produção de mediadores inflamatórios, o que pode levar a respostas inflamatórias excessivas e a um agravamento dos quadros pulmonares [5,6,7]. Acredita-se que a resposta imune desregulada do hospedeiro e a produção de citocinas inflamatórias, conhecida como "tempestade de citocinas", estejam correlacionadas com a gravidade da doença e com um mau prognóstico durante a infecção por SARS-CoV e MERS-CoV [5, 8]. Durante a infecção por MERS-CoV, citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, como CCL-2, CCL-3, IL-2 e IL-8, foram expressas em níveis elevados. Estudos recentes mostraram que casos graves de COVID-19 apresentam níveis plasmáticos aumentados de IL-2, IL-6, IL-7, IL-10,

GSCF, IP-10, MCP1, MIP-1^a e TNF α em comparação com casos leves, indicando que a resposta inflamatória mediada pela liberação de citocinas é um fator crítico na progressão da COVID-19 [9]. A análise do transcriptoma de amostras de lavado bronco alveolar revelou um perfil distinto de citocinas inflamatórias para infecção por SARS-CoV-2, mostrando uma associação entre a patogênese por COVID-19 e a liberação excessiva de citocinas como CCL2/MCP-1, CXCL10/IP-10, CCL3/MIP-1 α e CCL4/MIP1B [10].

Citocinas e quimiocinas são marcadores importantes do processo inflamatório e podem ser medidos tanto na excreção salivar quanto nos tecidos glandulares, o que sugere seu potencial diagnóstico e prognóstico em doenças tanto da cavidade oral quanto sistêmicas [11,12,13,14]. Além disso, o uso deste fluido pode fornecer informações valiosas sobre o perfil inflamatório da COVID-19, possibilitando a diferenciação de casos leves, moderados e avançados [15,16].

1.2 CORONAVÍRUS

A família de vírus Coronaviridae é composta por aproximadamente 30 mil bases em uma única fita de RNA envelopado, não segmentado, o que a torna a maior família de vírus em termos de código genético conhecido no mundo. Esses vírus devem seu nome à presença de espinhos ou projeções em sua superfície, chamados de proteínas Spike, que dão ao patógeno um aspecto de coroa. Essas projeções estão ligadas às proteínas do envelope viral e são fundamentais para o ciclo de replicação do vírus [2]. As glicoproteínas ligadas ao envelope viral possuem a capacidade de se ligar à proteína conversora de angiotensina 2 (ACE2), uma proteína presente na membrana celular humana [17]. Para que ocorra a ligação e invasão celular, é necessária a clivagem da subunidade spike por uma enzima chamada furina, comumente encontrada nos tecidos pulmonares e do trato respiratório. Após o remodelamento da proteína spike e exposição da subunidade S2, o vírus pode ser endocitado pela célula, tornando-se uma via de entrada para o agente no corpo humano. Uma vez dentro da célula, o vírus utiliza sua enzima transcriptase reversa, bem como a maquinaria celular, para a replicação, montagem e eliminação de novas partículas virais

O potencial reservatório e a porta de entrada do SARS-CoV-2 na cavidade bucal têm sido amplamente estudados, com foco na expressão da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). Alguns estudos já mostraram a presença do receptor ACE2 nos ductos de glândulas salivares menores e na língua [18, 19].

Ainda há controvérsias sobre as possíveis consequências da presença do vírus nos tecidos bucais. A detecção do vírus em tecidos da cavidade bucal pode representar não apenas uma ameaça às células locais, mas também um reservatório com alto potencial de contaminação, uma vez que o vírus é transmitido entre seres humanos por meio de gotículas liberadas durante conversação, espirros e outras formas de disseminação de aerossóis e secreções orotraqueais [18, 20, 21, 22].

Dois fatores principais contribuem para o notável sucesso na disseminação da doença. O primeiro fator é o longo período de incubação em seres humanos, permitindo que portadores assintomáticos ou pré-sintomáticos atuem como vetores de transmissão por um período prolongado, sem tomar medidas preventivas [23]. O segundo fator se relaciona à capacidade do vírus de se propagar através de gotículas, uma habilidade eficaz de transmissão já utilizada por outros vírus respiratórios. Isso permite a disseminação rápida da doença em áreas densamente povoadas [24].

A transmissibilidade da doença está diretamente relacionada com a carga viral do fluido transmissor, que tem seu pico de um a dois dias antes do início da sintomatologia. No entanto encontramos na literatura relatos de casos em que a carga viral pode ser encontrada no paciente em até 40 dias após a manifestação do primeiro sintoma [25].

A infecção pelo SARS-CoV-2 geralmente ocorre por meio de gotículas que contêm fluidos pulmonares e de vias aéreas superiores, como coriza e restos epiteliais do trato respiratório, que se misturam com saliva. Como os pulmões são o principal órgão afetado pelo vírus, a transmissão por meio da inalação dessas gotículas é uma das principais formas de infecção. A transmissão assintomática do vírus ocorre quando uma pessoa infectada, sem apresentar sintomas, expõe gotículas contendo o vírus, permitindo a transmissão para outras pessoas. É possível que as glândulas salivares sejam também uma fonte significativa de transmissão viral [26].

1.3 RECEPTORES

Para o entendimento da fisiopatologia da infecção pelo SARS-CoV-2 é essencial o esclarecimento do mecanismo de entrada do vírus na célula eucariote. Existem duas vias pelas quais o SARS-CoV-2 pode entrar nas células do hospedeiro: a primeira ocorre através da membrana celular, utilizando peptidases receptores de membrana, enquanto a segunda é por meio de endocitose.

A principal forma de entrada do SARS-CoV-2 na célula é por meio da interação da sua proteína Spike (proteína S) com o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), que é uma metalopeptidase presente na membrana celular das células-alvo. Em seguida através de outro fator de entrada, a serina protease transmembrana 2 (TMPRSS2), é ativada a proteína S, tornando possível a clivagem do sítio S1/S2. Esse processo possibilita a fusão das membranas do vírus e da célula, mediado pela subunidade S2 da proteína S, permitindo que o vírus se funda com o epitélio respiratório através da ligação ao ACE2 [27].

A capacidade dos tecidos em expressar receptores de angiotensina está diretamente relacionada com o tropismo celular do patógeno. Estudos que utilizaram imuno-histoquímica mostraram a expressão desses receptores em 15 diferentes órgãos humanos obtidos de 93 pacientes submetidos a biópsias. Observou-se uma expressão intensa nos pneumócitos e enterócitos [28]. Análises de RNA de célula única realizadas em células pulmonares indicaram uma expressão acentuada do receptor em pneumócitos tipo 2, representando mais de 80% da expressão total do pulmão [29]. Outra análise da expressão de mRNA em múltiplos órgãos mostrou uma expressão mais acentuada do receptor ACE2 nos pulmões, sistema renal, cardiovascular e trato gastrointestinal [30]. A intensa afinidade do SARS-CoV-2 com os tecidos pulmonares pode explicar em parte por que o pulmão é considerado o órgão-alvo do vírus, bem como o dano alveolar difuso e atipia celular que ele causa.

A proteína TMPRSS2 é um facilitador crucial e co-receptor para a entrada do SARS-CoV-2 nas células hospedeiras. É uma serina protease com atividade proteolítica intrínseca que desempenha um papel fundamental na entrada de diversos vírus. Não apenas o SARS-CoV-2, mas também outros vírus como Influenza, MERS e SARS-CoV utilizam TMPRSS2 para iniciar sua ligação com a membrana celular [31]. A TMPRSS2 cliva o subdomínio S da proteína Spike do envelope viral, expondo

os resíduos ligáveis ao receptor ACE2. O TMPRSS2 é um receptor essencial para que a entrada do vírus seja patológica e potencialmente contagiosa [32].

Ainda não há tantos estudos realizados que investigam a presença do receptor ACE2 na cavidade oral. Embora a distribuição do receptor em outras áreas do trato gastrointestinal sugira uma alta presença, como mencionado anteriormente, a disponibilidade de dados é limitada [33]. Análises de mRNA em tecidos normais de uma pequena amostra de pesquisa demonstraram a presença do receptor na cavidade oral, mas em menor número do que em outros órgãos alvo, como pulmões, rins, coração e esôfago [34].

1.4 PERIODONTO

O periodonto é constituído pelo osso alveolar, gengiva inserida, espaço biológico e ligamento periodontal, e é responsável por sustentar o dente. Estudos indicam que o receptor ACE2 está presente em fibroblastos da gengiva e do ligamento periodontal [35]. Pacientes com periodontite crônica podem ter um aumento de proteases, o que pode aumentar o risco de invasão viral nas células do periodonto. Esse aumento das proteases pode levar a uma maior angiogênese local e, portanto, uma maior expressão de receptores de angiotensina, aumentando ainda mais o risco de invasão viral [36].

Outros vírus, como o Herpes simplex tipo 1 (HSV-1), Epstein-Barr (EBV) e o Citomegalovírus humano (HCMV), foram identificados em tecidos periodontais gengivais, placa subgengival e no fluido crevicular - um importante local que contribui para a composição final da saliva [14, 37, 38, 39]. O mecanismo de infecção viral nesses tecidos é pouco conhecido, mas acredita-se que possa ocorrer invasão direta a partir dos queratinócitos do epitélio de revestimento da cavidade oral ou migração a partir da corrente sanguínea e do líquido intersticial, levando o patógeno aos tecidos periodontais [40].

A literatura suscita a possibilidade de que os tecidos periodontais de pacientes com doenças periodontais possam atuar como nichos de replicação e armazenamento do SARS-CoV-2, especialmente devido aos altos níveis de citocinas

geralmente observados nesses indivíduos [41].

1.5 PAPILA

Papilas gustativas são estruturas encontradas principalmente na superfície da língua e capazes de captar estímulos de sabores. Encontram-se em 3 diferentes formas: filiformes, fungiformes, foliáceas e circunvaladas [42].

O Nervo Vago (X par craniano) e o Nervo Glossofaríngeo (IX) são os responsáveis pela sensação gustativa. O paladar é inicialmente discriminado pelas células receptoras do paladar (TRCs) localizadas nas papilas gustativas, que são órgãos autônomos encontrados principalmente nas papilas circunvaladas, papilas foliadas e papilas fungiformes na língua. Cada papila gustativa é suprida por fibras nervosas, uma artéria capilar e uma veia [43, 44].

As células receptoras do sabor dentro das papilas gustativas são responsáveis por discriminar os cinco gostos prototípicos, que incluem salgado, doce, amargo, umami e azedo. As papilas gustativas são compostas por três tipos de TRCs distintos que são responsáveis pela discriminação gustativa: Tipo I, que é responsável pela detecção do sabor salgado; Tipo II, que detecta o sabor doce, amargo e umami (esses três sabores são discriminados com base no envolvimento do receptor na superfície da célula, compartilhando mecanismos de transdução de sinal a jusante); e Tipo III, que detecta o sabor azedo [45].

Alterações quimiossensoriais de paladar são sintomas bem relatados na COVID-19. A infecção pelo SARS-CoV-2 pode alterar ou mesmo ausentar um ou mais desses gostos (disgeusia ou ageusia), uma vez que os TRCs contêm os mecanismos necessários para detectar esses sabores a partir de alimentos comumente consumidos [38]. No entanto não se sabe se o ACE2 é expresso no receptor gustativo ou se os TRCs são infectados diretamente.

1.6 COVID-19 E MANIFESTAÇÕES ORAIS

O coronavírus utiliza o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) para invadir as células humanas. Isso significa que as células que possuem o receptor ACE2 são suscetíveis à infecção pelo vírus e podem desencadear uma resposta inflamatória em órgãos e tecidos relacionados, incluindo a mucosa da língua e as glândulas salivares [46, 47]. Além disso, a interação do SARS-CoV-2 com os receptores ACE2 também pode afetar a sensibilidade das papilas gustativas, levando a respostas gustativas alteradas [48].

Os sinais e sintomas orais associados ao COVID-19 incluem distúrbios do paladar, ulcerações orais inespecíficas, gengivite descamativa, petéquias e coinfeções como candidíase, conforme relatado por diversos estudos [49, 50, 51]. No entanto, ainda é incerto se essas manifestações constituem um padrão clínico típico decorrente da infecção direta pelo SARS-CoV-2 ou se são uma consequência sistêmica, tendo em vista a possibilidade de coinfeções, comprometimento do sistema imunológico e reações adversas ao tratamento médico [52]. Dessa forma, a infecção aguda por COVID-19, com medidas terapêuticas associadas, pode contribuir para resultados adversos em relação à saúde bucal.

2 PROPOSIÇÃO

O SARS-CoV-2 já foi detectado em vários órgãos e tecidos, incluindo tecidos orais e saliva. A fim de compreender adequadamente os padrões de transmissão, é fundamental investigar se o RNA do SARS-CoV-2 presente nas gotículas de saliva está associado à infecção viral e replicação nas células epiteliais glandulares, ou se está ligado, em vez disso, apenas à secreção respiratória e à componente periodontal da saliva.

Compreender a contribuição de cada tecido como um reservatório para o SARS-CoV-2 pode ser um passo importante para aprimorar a compreensão do perfil do vírus e elaborar estratégias para aprimorar o diagnóstico e reduzir a disseminação.

O objetivo deste trabalho foi identificar e caracterizar a presença do SARS-CoV-2 e dos receptores ACE2 e TMPRSS2 no tecido periodontal e nas papilas gustativas da cavidade oral além de avaliar possíveis manifestações orais da infecção em casos fatais de COVID-19.

A caracterização mencionada foi realizada por meio de uma análise histopatológica que comparou os tecidos removidos de pacientes que faleceram devido as complicações da COVID-19 com os padrões normais. Metodologias adicionais foram empregadas para estabelecer uma relação entre as alterações observadas e a presença do patógeno SARS-CoV-2 nesses tecidos, a fim de obter um conjunto plural de evidências.

Foi elaborado um relatório clínico-patológico baseado em autópsias de pacientes que faleceram devido à COVID-19 com o objetivo de esclarecer a possibilidade de manifestações orais da doença. Isso se deve ao fato de que existem algumas discrepâncias na literatura sobre as manifestações orais da COVID-19.

O propósito desta compilação de artigos é evidenciar a existência do vírus SARS-CoV-2 e dos receptores que permitem sua entrada na cavidade oral, além de suas possíveis manifestações bucais.

3 CAPÍTULO I: TECIDOS PERIODONTAIS SÃO ALVOS DOS SARS-COV-2: UM ESTUDO POST-MORTEM

3.1 INTRODUÇÃO

Uma epidemia que começou em Wuhan (província de Hubei, China) com sintomas de pneumonia, rapidamente se espalhou pelo mundo e foi anunciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma pandemia, agora chamada de COVID-19. Seu agente etiológico foi identificado como o novo coronavírus responsável por uma síndrome respiratória aguda grave [1, 2]. A doença leva a um dano alveolar difuso, causando desconforto respiratório e, eventualmente, morte [3]. Até 30 de junho de 2020, o número de casos confirmados soma cerca de 8.860.000 com mais de 465.000 mortes, afetando 216 países (<https://www.who.int/emergências/diseases/novel-coronavirus-2019>).

O SARS-CoV-2 se espalha muito mais rapidamente do que outras infecções respiratórias e isso pode estar relacionado a um longo tempo de incubação e à alta capacidade da contaminação viral através da tosse ou espirro, durante o contato social [4]. Devido a baixa prevalência de rinorreia em pacientes com COVID-19, sugere-se que gotículas infectadas são, não apenas contaminadas por escarro nasal e fluidos respiratórios, mas também pela saliva [5]. Alguns estudos sugerem que as descobertas consistentes de SARS-CoV-2 na saliva podem ser usadas como tecnologias de atendimento para diagnóstico e prognóstico, mesmo sem ainda entender se o vírus é capaz de se replicar nos tecidos das glândulas salivares [6].

A saliva é um fluido biológico composto por saliva, excreções glandulares, fluido crevicular, secreção das vias respiratórias inferiores e células epiteliais esfoliadas, nas quais o SARS-CoV-2 pode ser encontrado [7]. A presença do vírus na cavidade oral pode estar relacionada a diferentes fontes. O SARS-CoV-2 infecta células usando o receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2) como entrada [3]. Esse receptor pode ser encontrado em vários locais da cavidade oral, como língua (Hao X et al. 2020), células epiteliais ductais da glândula salivar [8] e tecido periodontal [9]. O receptor ACE2 também foi expresso na gengiva e ligamento periodontal em fibroblastos humanos [10]. Além disso, foi proposto que o aumento

dos níveis da protease na periodontite crônica poderia potencialmente elevar o risco de uma infecção de coronavírus mediado pela mucosa oral [11].

Genomas virais do vírus Herpes simplex (HSV), Epstein-Barr (EBV) e citomegalovírus humano (HCMV) [12] já foram detectados em tecidos gengivais [13], placa subgengival [14] e fluído do sulco gengival [15-17]. As possíveis fontes da infecção podem ser as células epiteliais gengivais expostas a cavidade oral e a migração do vírus pela corrente sanguínea [18]. Foi levantada a hipótese de que a doença periodontal pode ser um nicho para o novo coronavírus, devido a um ambiente favorável para replicar e eventualmente migrar sistemicamente através do complexo do capilar periodontal [1]. Além disso, doenças predisponentes como, diabetes mellitus, hipertensão, doenças cardiovasculares e síndromes metabólicas, que podem contribuir a um pior prognóstico da COVID-19, são altamente associadas à doença periodontal, possibilitando associação entre doença periodontal e COVID-19 [19].

Devido ao risco de contágio, as análises de tecidos orais têm sido escassas. A presença de saliva e líquido pulmonar infectados atenuaram a possibilidade de biópsias ou autópsias nesses órgãos. Neste estudo, descrevemos um procedimento minimamente invasivo que reduz o contato direto com a cavidade oral e pode ser uma maneira de entender os mecanismos da COVID-19 na cavidade oral reduzindo o risco de contaminação.

3.2 PACIENTES E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado pelos órgãos institucionais e federais conselho de ética, protocolo número 30364720.0.0000.0068. A autópsia minimamente invasiva foi realizada após consentimento informado do parente mais próximo.

Pacientes falecidos com teste positivo para SARS-CoV-2 (swabs nasofaríngeos) foram submetidos a autópsia minimamente invasiva – guiada por endoscópio. Os procedimentos foram realizados no Centro de Pesquisas PISA, Serviço de Autópsia da Universidade de São Paulo e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2.1 Protocolo de Segurança

Realizamos autópsia minimamente invasiva com autópsias post-mortem guiadas por ultrassom para obter amostras, seguindo protocolos de segurança previamente descritos [20].

Os cadáveres foram envoltos em um saco plástico de segurança, o acesso à sala de necropsia foi restrito a três profissionais de saúde que utilizam equipamento de proteção individual adequado. Os profissionais foram testados para SARS-CoV-2 usando PCR e todos os membros da equipe foram negativos ao longo 60 dias de procedimentos.

3.2.2 Protocolo de Amostras

Uma equipe multidisciplinar, constituída por um patologista maxilofacial, um especialista em otorrinolaringologia e um técnico de autópsia, realizaram a autópsia minimamente invasiva. Usamos um vídeo endoscópio regular (MScope – Karl-Storz Optical, Tuttlingen – Alemanha), associado a um smartphone, para atingir a cavidade oral e localizar os tecidos periodontais (Figura 3.1).

Todas as autópsias foram realizadas em um procedimento semelhante: uma incisão de 15 cm foi feita no plástico de segurança que envolvia o paciente; esta abertura foi realizada na região do lábio superior, para permitir o acesso do endoscópio as regiões intraorais. A óptica do endoscópio foi usada para localizar o tecido periodontal - papila interproximal mesial do primeiro molar – em dois dos casos o paciente não tinha molares e o tecido coletado foi o da papila mesial do seguinte dente disponível.

Considerando a ausência de fluxo salivar, utilizamos uma gaze embebida em detergente enzimático (Riozyme – Rioquímica, Brasil) para limpar a contaminação superficial da área de autópsia gengival. O periósteo Molt elevador em um movimento de alavanca foi usado para elevar o tecido interproximal e pinças de Takahashi foram

aplicadas para pinçar e coletar amostras de tecido do local, através de um endoscópio como guia visual.

Uma vez que os tecidos periodontais foram removidos, dois fragmentos foram dissecados no eixo longitudinal, resultando em duas peças semelhantes. Um deles foi fixado em formol para análises histopatológicas e o outro foi congelado (-80°C) e enviado para análises moleculares.

Uma vez que os tecidos foram coletados, a abertura no saco plástico foi fechada com adesivo transparente para mitigar o risco de contágio.

3.2.3 Diagnóstico histológico e molecular de SARS-CoV-2

As amostras de tecido foram fixadas em formol a 10% tamponadas, embebidas em parafina e cortes de 3 µm foram corados com hematoxilina e eosina (H&E). Amostras medindo 0,5 cm³ foram armazenados a -80°C. Amostras de tecido foram macerados, e a extração de ácido nucleico foi realizada utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen). A detecção molecular de SARS-CoV-2 foi realizada com o uso do SuperScript™ III Platinum™ Kit qRT-PCR (Invitrogen) e primers/conjuntos de sondas para amplificação dos genes E, RdRp e N (N1) [21,22]. O gene da RNase P humana também foi amplificado como um controle de extração de ácido nucleico [22].

Examinamos espécimes de tecido periodontal – incluindo o epitélio juncional, epitélio da gengiva oral adjacente e tecido conjuntivo de casos fatais de COVID 19. Usando rRT-PCR, investigamos a presença do RNA do SARS-CoV-2 nos tecidos e correlacionamos com as condições clínicas dos pacientes, desde os primeiros sintomas, tempo de internação na UTI e achados da autópsia.

As reações de rRT-PCR foram realizadas usando o Sistema de PCR rápido em tempo real 7500 (Applied Biosystems) e consistiu em uma etapa de transcrição reversa em 55°C por 10 minutos para transcrição reversa, 95°C para 3 minutos e 45 ciclos a 95°C por 15 segundos e 58°C (E e genes RdRp)/55°C (genes N e RNase P)/por 30 segundos.

3.3 RESULTADOS

Incluimos neste estudo 7 (sete) pacientes (três homens/quatro mulheres). Todos os pacientes testaram positivo para SARS-CoV-2 por swabs nasofaríngeos. A média de idade foi 47,43 anos (8–74 anos), e o número médio de dias entre os primeiros sintomas e a morte foi 20,14 dias (10–31 dias).

Todos os pacientes apresentaram quadro de síndrome respiratória aguda grave e foram internados na UTI do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para suporte ventilatório mecânico. Os sintomas mais frequentes foram febre, tosse e dispneia.

A maioria dos pacientes apresentava pelo menos uma comorbidade como diabetes mellitus, hipertensão arterial, neoplasia maligna, doença cardiovascular, asma ou qualquer condição imunossupressora. Houve apenas um paciente livre de qualquer comorbidade. Nenhum paciente apresentava hábito tabágico (Tabela 3.1).

As análises histopatológicas mostraram alterações morfológicas nos queratinócitos do epitélio juncional, caracterizada principalmente por vacuolização do citoplasma e núcleo, e às vezes pleomorfismo nuclear (Figura 3.2). Amostras pulmonares apresentavam dano alveolar difuso (DAD) exsudativo e proliferativo, com atipia que se estendia por todo epitélio respiratório, conforme descrito por **20**.

Detectamos SARS-CoV-2 por rRT-PCR em 5/7 amostras de tecidos periodontais com um cycle threshold (Ct) (conjuntos de primer/sonda E) de 31,38 (27,28–36,55).

3.4 DISCUSSÃO

Apresentamos as características moleculares e histopatológicas observadas em sete autópsias de pacientes com COVID-19 no Brasil, cinco amostras de tecidos periodontais de pacientes falecidos foram positivas. Das duas amostras negativas, uma era de um menino de 8 anos. Os aspectos patológicos da COVID-19 em crianças ainda não estão claros, a doença parece ter um curso suave. Uma das explicações está relacionada com a diferença da expressão do receptor ACE2 em crianças [23],

que pode corroborar com a ausência de genoma viral no tecido periodontal. A presença de vacuolização pode ser relacionada a complicação durante o tempo de hospitalização. A outra paciente que teve amostra negativada, era uma paciente do sexo feminino que apresentou o maior tempo entre os primeiros sintomas e a morte. O tempo de internação prolongado pode possibilitar um esclarecimento sobre a ausência do vírus nas células do periodonto do hospedeiro.

A autópsia é uma ferramenta importante para compreender mecanismos patológicos das doenças virais. Nós tivemos uma experiência recente no Brasil de outros dois surtos de infecções virais (febre amarela e zika vírus) e dessa forma foi exigido que nosso grupo de pesquisa desenvolvesse novos procedimentos de autópsia para estudar e contribuir com médicos e tomadores de decisão [23]. A autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom é uma alternativa confiável para realizar autópsias em casos de COVID-19 pois reduz consideravelmente os custos e o produção de aerossóis [23]. Este é o primeiro estudo a associar os achados da autópsia oral com um método minimamente invasivo – guiado por videoscópio – como uma nova abordagem para estudar vírus/pandemia, doenças altamente contagiosas e suas manifestações bucais.

A saliva e o fluido crevicular gengival têm sido demonstrados ser fontes de vírus humanos na cavidade oral. Um estudo recente investigou a detecção de herpes vírus humano na saliva e no fluido do sulco gengival em pacientes com doença renal crônica e encontrou prevalências diferentes entre esses dois locais [17]. O mesmo foi evidenciado durante a emergência de saúde pública internacional, Zika vírus; peptídeos foram identificados na saliva identificando um novo caminho para a transmissão da doença [24]. Embora nossa pesquisa não tenha analisado os componentes da saliva ou fluido crevicular, observamos a presença de cópia RNA de SARS-CoV-2 no tecido periodontal mesmo muitos dias após os primeiros sintomas da doença. Este achado pode justificar a cavidade como fonte de SARS-CoV-2, como tem sido consistentemente detectado na saliva [7, 25, 26, 27], sugerindo que pode estar relacionado ao acesso via cavidade específica fluido crevicular.

Nos casos apresentados, a infecção viral parece estar em um padrão de longa data, sugerindo que, mesmo em pacientes que tiveram um longo curso da doença, a infecção no tecido periodontal persiste. A presença de uma alta carga viral de SARS-CoV-2 na saliva logo após sintomas de COVID-19 já é conhecida [28, 27]. Semelhante ao que encontramos, To et al. tem também relataram que partículas contagiosas de

RNA viral poderiam ainda ser detectadas em amostras de saliva de alguns pacientes por 20 dias ou mais após os primeiros sintomas. Nossos dados evidenciaram RNA viral de SARS-CoV-2 em tecido periodontal até 24 dias após a manifestação dos primeiros sintomas, em alguns pacientes.

Outros estudos tentando indicar alvos potenciais para SARS-CoV-2 mostraram que as células do cérebro, plexo coronóide [29] e rim podem ser uma fonte [30,31,32,33] sugerindo que o organotropismo pode indicar o curso que a doença vai tomar. Neste estudo, avaliamos um possível organotropismo que pode influenciar a transmissibilidade. A saliva é o principal componente das gotículas e responsável pelo alto padrão de contágio do COVID-19. Nesse contexto, a presença de SARS-CoV-2 no tecido periodontal pode ser um dos componentes que contribui com a carga viral da saliva.

A detecção do RNA do SARS-CoV-2 nos tecidos periodontais chama a atenção para possíveis implicações no tratamento periodontal para pacientes com COVID-19. Desbridamento supra e subgengival, mesmo sem geração de aerossóis, podem ser eventos potencialmente contaminantes. Escarificadores ultrassônicos, seringas ar-água e peças de mão para terapia de manutenção e alisamento radicular são mais propensas a facilitar a transmissão devido ao spray que pode conter partículas em gotas de saliva, fluido crevicular gengival, sangue e outros detritos. Os Centros de Controle e Prevenção de Doenças (CDC, EUA) (<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/dental-settings.html>) recomendam que devem ser priorizadas as visitas urgentes e os profissionais devem seguir os rígidos protocolos de biossegurança. Os cirurgiões dentistas e as equipes odontológicas devem estar cientes da importância de usar equipamentos de proteção individual, desinfecção e esterilização.

Os resultados desta investigação devem ser interpretados com cautela devido a algumas limitações. Primeiro, nossas observações são baseadas apenas em sete casos. Possivelmente, uma maior compreensão da presença do vírus no fluido crevicular gengival e tecidos surgirão como novas descobertas quando maiores números de casos forem relatados. Além disso, devido a fatalidade os casos descritos aqui representam pacientes gravemente enfermos com COVID-19, com períodos prolongados de hospitalização, ventilação mecânica e alimentação enteral em cuidados intensivos, exigindo tubos orais e nasais, que poderia explicar as alterações histopatológicas observadas. Finalmente, é possível que a resposta do tecido

periodontal seja diferente em indivíduos com COVID-19 que são assintomáticos ou têm apenas sintomas leves.

Concluimos que a autópsia minimamente invasiva via oral – guiada por videoscópio – é um procedimento seguro para obter amostras que possam ser realizadas análises biomoleculares e ensaios histopatológicos, incluindo autópsias realizadas durante uma situação de pandemia altamente contagiosa. Este é o primeiro estudo a realizar autópsias minimamente invasivas e nossos achados mostram que o tecido periodontal parece ser um alvo para SARS-CoV-2, podendo contribuir por muito tempo para a presença do vírus em amostras de saliva. Essas descobertas podem indicar uma nova abordagem para entender a contaminação padrão de COVID19.

3.5 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Sra. Kely Cristina Soares Bispo, Sr. Gustavo Linari Rodrigues, Sra. Ângela BG dos Santos, Sra. Sandra de Moraes Fernezlian, Sr. Reginaldo Silva do Nascimento, dona Glaucia Aparecida dos Santos Bento, Dona Thábata Larissa Luciano Ferreira Leite e Dona Catia Sales de Moura pelo suporte técnico. A todos os envolvidos em o atendimento aos pacientes com COVID-19 e a todos os hospitais trabalhadores que participam da Crise do Coronavírus do HC-FMUSP Comitê durante a estação epidêmica. A todos os parentes e representantes legais que concordaram com o exame post mortem das vítimas da COVID-19. Os autores declaram não haver potencial conflitos de interesse com relação à autoria e/ou publicação deste artigo. Fontes de financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo 2013/17159-2. Financiador DOI: 10.13039/501100001807; Bill e Melinda Gates Fundação INV-002396. Financiador DOI: 10.13039/100000865. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) 401825/2020-5.

3.6 DECLARAÇÃO DE TRANSPARÊNCIA

Nenhum potencial conflito de interesse foi relatado pelos autores.

3.7 FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pelo Bill e Melinda Gates Fundação [10.13039/100000865]; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo [2013/17159-2]; conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [401825/2020-5].

3.8 REFERÊNCIAS

1. Badran Z, Gaudin A, Struillou X, et al. Periodontal pockets: A potential reservoir for sars-cov-2? *Med Hypotheses*. 2020;143:109907.
2. Zhu N, Zhang D, Wang W, et al. China novel coronavirus investigating and research team. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020 Feb 20;382(8):727–733.
3. Zhou P, Yang XL, Wang XG, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270–273.
4. Li R, Pei S, Chen B, et al. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science*. 2020 May 1;368(6490):489–493.
5. Huang C, Xu X, Cai Y, et al. Mining the characteristics of COVID-19 patients in China: analysis of social media posts. *J Med Internet Res*. 2020;22(5):e19087. Published 2020 May 17.

6. Hamid H, Khurshid Z, Adanir N, et al. COVID-19 pandemic and role of human saliva as a testing biofluid in point-of-care technology [published online ahead of print, 2020 Jun 3]. *Eur J Dent*. 2020. DOI:10.1055/s-0040-1713020
7. To KK, Tsang OT, Chik-Yan Yip C, et al. Consistent detection of 2019 novel coronavirus in saliva. *Clin Infect Dis*. 2020a;71(15):841–843.
8. Liu L, Wei Q, Alvarez X, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol*. 2011;85(8):4025–4030.
9. Oliveira SHP, Brito VGB, Frasnelli SCT, et al. Aliskiren attenuates the inflammatory response and wound healing process in diabetic mice with periodontal disease. *Front Pharmacol*. 2019 Jul 4;10:708.
10. Santos CF, Morandini AC, Dion.sio TJ, et al. Functional Local Renin-Angiotensin system in human and rat periodontal tissue. *PLoS One*. 2015 Aug 5;10(8):e0134601.
11. Madapusi Balaji T, Varadarajan S, Rao USV, et al. Oral cancer and periodontal disease increase the risk of COVID 19? A mechanism mediated through furin and cathepsin overexpression. *Med Hypotheses*. 2020 Jun 1;144:109936.
12. Cappuyns I, Gugerli P, Mombelli A. Viruses in periodontal disease - a review. *Oral Dis*. 2005;11 (4):219–229.
13. Contreras A, Nowzari H, Slots J. Herpesviruses in periodontal pocket and gingival tissue specimens. *Oral Microbiol Immunol*. 2000 Feb;15(1):15–18.
14. Das S, Krithiga GS, Gopalakrishnan S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2012 May;16(2):203–209.
15. Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol*. 2009 Dec;24(6):506–509.

16. Khurshid Z, Mali M, Naseem M, et al. Human gingival crevicular fluids (GCF) proteomics: an overview. *Dent J (Basel)*. 2017;5(1):12. Published 2017 Feb 22.
17. Pallos D, Ruivo GF, Ferrari-Junior SH, et al. Periodontal disease and detection of human herpesviruses in saliva and gingival crevicular fluid of chronic kidney disease patients. *J Periodontol*. 2020;91(9):1139–1147.
18. Miller CS. Viruses: are they really culprits for periodontal disease? A critical review? *J Investig Clin Dent*. 2014 Aug;5(3):243.
19. Pitones-Rubio V, Ch.vez-Cortez EG, Hurtado- Camarena A, et al. Is periodontal disease a risk factor for severe COVID-19 illness? [published online ahead of print, 2020 Jun 19]. *Med Hypotheses*. 2020;144:109969.
20. Nunes Duarte-Neto A, de Almeida Monteiro RA, LFF DS, et al. Pulmonary and systemic involvement of COVID-19 assessed by ultrasound-guided minimally invasive autopsy [published online ahead of print, 2020 May 22. *Histopathology*. 2020. DOI:10.1111/his.14160.
21. Corman VM, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020 Jan;25(3). doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.3.2000045.
22. CDC. Guidance for dental settings; 2020, June 17; [cited 2020 Jun 19]. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/hcp/dental-settings.html>
23. Puelles VG, Lütgehetmann M, Lindenmeyer MT, et al. Multiorgan and renal tropism of sars-cov-2. *N Engl J Med*. 2020;383(6):590–592.
24. Lee PI, Hu YL, Chen PY, Huang YC, Hsueh PR. Are children less susceptible to COVID-19?. *J Microbiol Immunol Infect*. 2020;53(3):371–372. doi:10.1016/j.jmii.2020.02.011
25. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, Johnsson J, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(7): e0007625. .Published 2019 Jul 22.

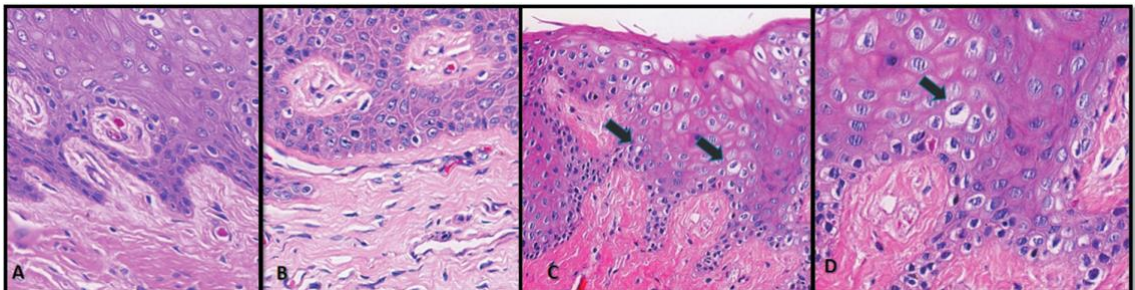
26. Zuanazzi D, Arts EJ, Jorge PK, et al. Postnatal identification of Zika Virus Peptides from Saliva. *J Dent Res*. 2017;96(10):1078–1084.
27. Khurshid Z, Asiri FYI, Al Wadaani H. Human saliva: non-invasive fluid for detecting novel coronavirus (2019-ncov). *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(7):2225.
28. Xu H, Zhong L, Deng J, et al. High expression of ace2 receptor of 2019-ncov on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*. 2020;12(1):8.
29. Zou L, Ruan F, Huang M, et al. Sars-cov-2 viral load in upper respiratory specimens of infected patients. *N Engl J Med*. 2020;382(12):1177–1179.
30. To KK, Tsang OT, Leung WS, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by sars-cov-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2020b;20(5):565–574.
31. Solomon IH, Normandin E, Bhattacharyya S, et al. Neuropathological features of covid-19. *N Engl J Med*. 2020;383(10):989–992.
32. Division of Viral Diseases. 2019-novel coronavirus (2019-nCoV) real-time rRT-PCR panel primers and probes. Atlanta, GA: Centers for Disease Control and Prevention; 2020. Available from: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/downloads/rt-pcr-panelprimer-probes.pdf>
33. WHO: Coronavirus disease (COVID-19) pandemic. 2020, Jun 21; [cited 2020 Jun 21]. Available from: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novelcoronavirus-2019>

Figura 3.1 - Autópsia minimamente invasiva – Guiada por videoscópio – A. Dois profissionais de saúde com equipamento de proteção individual (EPI) durante o procedimento de autópsia; B. Videoscópio (MScope, Karl-Storz Optical 4 mm, 30°) acoplado a um smartphone para visualização inspeção e remoção de amostras.



Fonte: O autor.

Figura 3.2 - Avaliação histopatológica – A. Epitélio juncional, sem infiltração por células inflamatórias (20 x); B. Pleomorfismo celular e nuclear (20 x); C. Vacuolização celular (20 x – seta); D. Epitélio juncional com edema intracelular e vacuolização parabasal (40 x – seta).



Fonte: O autor.

Tabela 3.1 - Características dos pacientes incluídos neste estudo e resultados da detecção de SARS-CoV-2 em tecidos periodontais usando um conjunto de primer/sonda de gene E.

Case number	Gender	Age	DM	SAH	Smoker	Period of hospitalization (days)	Time from symptoms onset to death (days)	CT PCR-RT Periodontal tissue	Nuclear pleomorphism	Vacuolization
1	F	51	No	No	No	14	31	Negative	No	No
2	F	71	Yes	Yes	No	11	16	29.41	No	Yes
3	F	15	No	No	No	9	24	33.23	No	No
4	F	74	No	Yes	No(Ex-smoker)	9	23	27.28	Yes	No
5	M	64	Yes	Yes	No	12	14	30.47	No	No
6	M	49	Yes	No	No	13	23	36.55	Yes	Yes
7	M	8	No	No	No	6	10	Negative	No	Yes

DM: Diabetes melito.

SAH: Hipertensão arterial sistêmica.

CT-PCR-RT: Limiar do ciclo – Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo real.

Fonte: O autor.

4 CAPÍTULO II: MANIFESTAÇÕES ORAIS E SARS-COV-2: UM ESTUDO POST-MORTEM

A entrada do SARS-CoV-2 na cavidade oral ocorre através do receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2), cuja expressão foi encontrada no epitélio ductal da glândula salivar (Liu et al., 2011), língua (Xu et al., 2020) e tecido periodontal (Fernandes Matuck et al., 2020). Assim, células com receptores ACE2 podem ser hospedeiras para SARS-CoV-2 e estar relacionadas a manifestações orais de COVID-19 e a respostas inflamatórias orais (Xu et al., 2020). Estudos preliminares relataram manifestações orais possivelmente relacionadas com a COVID-19 (Amorim Dos Santos et al., 2020; Ansari, Gheitani, & Heidari, 2020; Martín Carreras-Presas, Amaro Sánchez, López-Sánchez, Jané-Salas, & Somacarrera Pérez, 2020). Manifestações clínicas mostrando múltiplas lesões ulcerativas parecem ser a característica mais comum. Alguns estudos reportaram manifestações orais em casos suspeitos de COVID-19, mas sem diagnóstico confirmado da infecção por SARS-CoV-2 e acreditamos que isso pode ter influenciado os resultados (Martín Carreras-Presas et al., 2020). Os autores não excluem que os efeitos do estresse possam ser um gatilho para o desenvolvimento de lesões bucais, pois é conhecido como um possível fator causal neste tipo de afecções (Gallo, Mimura e Sugaya, 2009).

Apresentamos um estudo clínico-patológico de autópsias de pacientes que morreram de COVID-19 a fim de elucidar a possibilidade de manifestações orais da COVID-19 pois existem algumas divergências na literatura quanto ao efeito do vírus na cavidade oral.

Vinte e seis pacientes falecidos (15 mulheres e 11 homens) com SARS-CoV-2 foram submetidos a exame oral durante os procedimentos de autópsia minimamente invasiva (Duarte-Neto e outros, 2019). Todos os pacientes apresentavam síndrome respiratória aguda grave e foram internados na UTI do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para suporte ventilatório mecânico. Apenas os casos positivos de SARS-CoV-2 foram incluídos. Os testes RT-PCR de SARS-CoV-2 foram realizados durante a internação hospitalar ou internação na UTI através de swabs nasofaríngeos ou secreção broncoalveolar. A média de idade foi 50 anos (8-76 anos), a média de dias de internação foi de 15,30 dias (3-40

dias), e o número médio de dias em ventilação mecânica na UTI foi 12,36 dias (0-43 dias). O tempo médio entre o diagnóstico e o óbito foi de 10,55 dias, e o tempo médio entre a morte e a autópsia foi de 16,95 horas (5-22 horas). Vinte e quatro pacientes eram não ou ex-fumantes e apenas dois pacientes apresentavam hábitos tabágicos (narguilé e maconha). Dos 26 pacientes, dez (38,46%) estavam livres de comorbidades e os demais tinham pelo menos uma doença (ou seja, hipertensão ou diabetes).

Um dentista e um otorrinolaringologista examinaram as regiões intraorais e periorais durante a autópsia. A avaliação oral incluiu palato duro, língua, mucosa jugal e gengival, pilar tonsilar anterior e lábios internos. As biópsias foram realizadas com bisturis e pinça punch, resultando em múltiplos fragmentos : três fragmentos da língua (ápice, lateral e posterior), dois fragmentos gengivais de tecidos periodontais, um fragmento amígdala e um fragmento da mucosa interna do lábio. Em pacientes que apresentavam alguma lesão oral diagnosticada durante a avaliação clínica, foram realizadas biópsias. As amostras de tecidos foram fixadas em formol tamponado a 10% e embebidas em parafina, os cortes foram feitos e corados com hematoxilina e eosina (H&E). Para a coloração imuno-histoquímica foi utilizado o anticorpo policlonal Abcam Anti-HSV1 (Ab9533), e Anti-Glicoproteína B do citomegalovírus (Abcam17073).

Os pacientes 1 e 2 apresentavam lesões ulcerativas em lábio inferior, bem como uma lesão em língua também. Ambos os pacientes eram edêntulos e permaneceram na UTI sob ventilação mecânica por 10 e 25 dias, respectivamente. Foi realizada biópsia e a análise histopatológica revelou infiltração difusa de células mononucleares inflamatórias, o que valida nossos achados clínicos de lesões traumáticas decorrentes do uso de tubos orotraqueais para suporte ventilatório mecânico (FIGURA 4.2).

Os pacientes 3 e 4 apresentavam lesões vesículo-bolhosas e ulcerativas dispersas na mucosa oral, língua e mucosa jugal. A coloração imuno-histoquímica foi realizada e indicou a presença do herpes vírus simplex (HSV-1) em ambos os casos (FIGURA 4.2). Sabe-se que pacientes críticos têm grande potencial de desenvolver reativação de alguns herpes vírus devido à UTI e internação prolongada (Simonnet e outros, 2021). O paciente 3 ainda apresentava coinfeção por formas fúngicas compatíveis com *Candida* spp (esporos, pseudohifas e hifas).

O paciente 5 apresentava lesões ulcerativas e a análise histopatológica mostrou co-infecção por colônias típicas de *Sarcina ventriculi* (FIGURA 4.2). *S. ventriculi* é um coco gram-positivo que geralmente aparece em biópsias gástricas com esvaziamento gástrico tardio e sua presença pode indicar uma patologia gástrica (Al Rasheed & Senseng, 2016). Pacientes em estado grave ou pacientes imunocomprometidos têm maior probabilidade de sofrer infecções fúngicas invasivas e co-infecções bacterianas e esses achados são consistentes com relatórios anteriores (Salehi e outros, 2020).

A integridade da mucosa oral estava preservada em todos os outros casos (FIGURA 4.1). Nenhum outro paciente examinado apresentou manifestações bucais atípicas, como lesões vesículo-bolhosas ou ulcerações no epitélio queratinizado. As características histopatológicas dos casos sem manifestação clínica em língua, papila gengival, mucosa labial interna e pilar tonsilar anterior mostraram algumas alterações morfológicas nos queratinócitos do epitélio de revestimento, caracterizadas principalmente por vacuolização do citoplasma e núcleo, e às vezes pleomorfismo nuclear. Raramente foi observada infiltração de células inflamatórias mononucleares ou polimorfonucleares, mesmo em casos de deterioração oral grave (FIGURA 4.2).

As manifestações bucais encontradas em nossos pacientes e as relatadas em outros estudos corroboram com a hipótese de lesões orais secundárias induzidas por coinfecção e imunossupressão ocorrendo possivelmente como uma reação adversa da terapia e medidas de suporte para a COVID-19 (Amorim Dos Santos et al., 2021; Amorim Dos Santos et al., 2020; Martín Carreras-Presas et al., 2020; Putra, Adiarto, Dewayanti, & Juzar, 2020).

A ausência de lesões bucais relacionadas ao SARS-CoV-2 em nossa casuística não exclui a possibilidade da presença viral nos tecidos orais. Uma vez que o novo vírus tenha este organotropismo distinto, é lógico que médicos e dentistas tentem buscar uma ligação entre uma nova doença e achados orais (Puelles et al., 2020). Análises histopatológicas, imuno-histoquímicas e biomoleculares são o padrão-ouro para a compreensão das relações de causa e efeito e, portanto, são essenciais para uma correta ligação entre manifestações e infecção por SARS-CoV-2.

Pacientes internados em UTI são susceptíveis a lesões decorrentes da ventilação mecânica, alimentação enteral, tubos orotraqueais e deterioração da

saúde (Dziedzic & Wojtyczka, 2020). Portanto, exames clínicos e físicos são altamente recomendados e indispensáveis durante o período de internação e às vezes devem incluir biópsias quando necessário. A biópsia é uma ferramenta importante para relacionar condições clínicas a agentes etiológicos. Outros estudos, principalmente aqueles em manifestações pulmonares, estão tentando encontrar uma correlação entre características histopatológicas e condições clínicas (Duarte-Neto et al., 2020). Em manifestações cutâneas, as análises histológicas mostram infiltrado inflamatório inespecífico, o que é consistente com outros exantemas virais (Amatore et al., 2020). Em nosso estudo, realizamos biópsia post-mortem em alguns sítios orais devido à presença de algumas atividades inflamatórias, sendo que em alguns casos encontramos a presença do vírus herpes simplex. Avaliações in situ devem ser consideradas (por exemplo, hibridização ou imuno-histoquímica para SARS-CoV-2) para saber se essas lesões estão relacionadas a condições externas ou efeito citopático.

As manifestações orais de COVID-19 encontradas em nosso relato de caso post-mortem são lesões secundárias relacionadas a eventos traumáticos, coinfeções envolvendo bactérias, *Candida spp*, *Sarcinia ventriculi*, vírus herpes simplex, comprometimento imunológico devido à própria doença e reações adversas das intervenções terapêuticas. A maioria dos pacientes falecidos avaliados tiveram internação de longo prazo, receberam suporte de ventilação mecânica e alguns desenvolveram lesões bucais durante a internação. Diferente do que a literatura sugeriu no início da pandemia, as lesões orais encontradas em casos graves de pacientes infectados com COVID-19 parecem não estar relacionadas especificamente ao SARS-CoV-2 ou a um evento citopático que afeta a mucosa oral.

4.1 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a Kely Cristina Soares Bispo, Gustavo Linari Rodrigues, Angela B. G. dos Santos, Sandra de Moraes Fernezlían, Reginaldo Silva do Nascimento, Glaucia Aparecida dos Santos Bento, Thábata Larissa, Luciano Ferreira Leite, e Catia Sales de Moura pelo seu suporte técnico. Gostaríamos também de

reconhecer todos os prestadores de serviço da saúde envolvidos no cuidado dos pacientes com COVID-19 e todo Hospital (HC-FMUSP) e funcionários do Serviço de Autópsia de São Paulo que participaram da Força-Tarefa de Crise do Coronavírus durante a epidemia. Reconhecemos e somos profundamente gratos a todos os parentes e representantes legais que consentiram os exames post-mortem de seus amados parentes perdidos para a COVID 19.

4.2 CONFLITO DE INTERESSE

Todos os autores deste trabalho declaram não haver conflito de interesses.

4.3 REFERÊNCIAS

1. Al Rasheed, M. R., & Senseng, C. G. (2016). Sarcina ventriculi : Review of the Literature. *Arch Pathol Lab Med*, 140(12), 1441-1445. DOI: 10.5858/arpa.2016-0028-RS
2. Amatore, F., Macagno, N., Mailhe, M., Demarez, B., Gaudy-Marqueste, C., Grob, J. J., Richard, M. A. (2020). SARS-CoV-2 infection presenting as a febrile rash. *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 34(7), e304-e306. doi: 10.1111/jdv.16528
3. Amorim Dos Santos, J., Normando, A. G. C., Carvalho da Silva, R. L., Acevedo, A. C., De Luca Canto, G., Sugaya, N., . . . Guerra, E. N. S. (2021). Oral Manifestations in Patients with COVID-19: A Living Systematic Review. *J Dent Res*, 100(2), 141-154. doi:10.1177/0022034520957289
4. Amorim Dos Santos, J., Normando, A. G. C., Carvalho da Silva, R. L., De Paula, R. M., Cembranel, A. C., Santos-Silva, A. R., & Guerra, E. N. S. (2020). Oral mucosal lesions in a COVID-19 patient: New signs or secondary manifestations? *Int J Infect Dis*, 97, 326-328. doi:10.1016/j.ijid.2020.06.012

5. Ansari, R., Gheitani, M., & Heidari, F. (2020). Oral cavity lesions as a manifestation of the novel virus (COVID-19): a letter-to-editor. *Oral Dis.* doi:10.1111/odi.13465
6. Duarte-Neto, A. N., Monteiro, R. A. A., da Silva, L. F. F., Malheiros, D. M. A. C., de Oliveira, E. P., Theodoro-Filho, J., . . . Dolhnikoff, M. (2020). Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology*, 77(2), 186-197. doi:10.1111/his.14160
7. Duarte-Neto, A. N., Monteiro, R. A. A., Johnsson, J., Cunha, M. D. P., Pour, S. Z., Saraiva, A. C., . . . Dolhnikoff, M. (2019). Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(7), e0007625. doi:10.1371/journal.pntd.0007625
8. Dzedzic, A., & Wojtyczka, R. (2020). The impact of coronavirus infectious disease 19 (COVID-19) on oral health. *Oral Dis.* doi:10.1111/odi.13359
9. Fernandes Matuck, B., Dolhnikoff, M., Maia, G. V. A., Isaac Sendyk, D., Zarpellon, A., Costa Gomes, S., Duarte-Neto, A. N., Rebello Pinho, J. R., Gomes-Gouvêa, M. S., Sousa, S. C. O. M., Mauad, T., Saldiva, P. H. D. N., Braz-Silva, P. H., & Silva, L. F. F. D. (2020). Periodontal tissues are targets for Sars-Cov-2: A post-mortem study. *Journal of Oral Microbiology*, 13(1), 1848135. <https://doi.org/10.1080/20002297.2020.1848135>
10. Gallo, C. e. B., Mimura, M. A., & Sugaya, N. N. (2009). Psychological stress and recurrent aphthous stomatitis. *Clinics (Sao Paulo)*, 64(7), 645-648. doi:10.1590/S1807-59322009000700007
11. Liu, L., Wei, Q., Alvarez, X., Wang, H., Du, Y., Zhu, H., . . . Chen, Z. (2011). Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol*, 85(8), 4025-4030. doi:10.1128/JVI.02292-10 Martín Carreras-Presas, C., Amaro Sánchez, J., López-Sánchez, A. F., Jané-Salas, E., & Somacarrera Pérez, M. L. (2020). Oral vesiculobullous lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Oral Dis.* doi: 10.1111/odi.13382

12. Martín Carreras-Presas, C., Amaro Sánchez, J., López-Sánchez, A. F., Jané-Salas, E., & Somacarrera Pérez, M. L. (2020). Oral vesiculobullous lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Oral Dis.* doi:10.1111/odi.13382
13. Puelles, V. G., Lütgehetmann, M., Lindenmeyer, M. T., Sperhake, J. P., Wong, M. N., Allweiss, L., . . . Huber, T. B. (2020). Multiorgan and Renal Tropism of SARS-CoV-2. *N Engl J Med.* doi:10.1056/NEJMc2011400
14. Putra, B. E., Adiarto, S., Dewayanti, S. R., & Juzar, D. A. (2020). Viral exanthem with "Spins and needles sensation" on extremities of a COVID-19 patient: A selfreported case from an Indonesian medical frontliner. *Int J Infect Dis*, 96, 355-358. doi:10.1016/j.ijid.2020.05.020
15. Salehi, M., Ahmadikia, K., Mahmoudi, S., Kalantari, S., Jamalimoghadamsiahkali, S., Izadi, A., . . . Khodavaisy, S. (2020). Oropharyngeal candidiasis in hospitalised COVID-19 patients from Iran: Species identification and antifungal susceptibility pattern. *Mycoses*, 63(8), 771-778. doi:10.1111/myc.13137
16. Simonnet, A., Engelmann, I., Moreau, A. S., Garcia, B., Six, S., El Kalioubie, A., Jourdain, M. (2021). High incidence of Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and human-herpes virus-6 reactivations in critically ill patients with COVID-19. *Infect Dis Now*, 51(3), 296-299. doi: 10.1016/j.idnow.2021.01.005
17. Xu, H., Zhong, L., Deng, J., Peng, J., Dan, H., Zeng, X., . . . Chen, Q. (2020). High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci*, 12(1), 8. doi:10.1038/s41368-020-0074-x

Figura 4.1 - Aspectos clínicos de regiões orais em pacientes falecidos por COVID-19. A, B: Descamação epitelial devido ao choque, integridade da mucosa mastigatória preservada; C, D E: Pacientes sem alterações na integridade da mucosa; F, G: Presença de deterioração da saúde bucal com cárie e perda dentária; H, I, J: Lesão ulcerativa – Seta apontando lesões eritematosas na lateral de língua, palato e gengiva; K: Grandes lesões ulcerativas em lábio inferior devido a trauma causado pelo uso prolongado de tubo orotraqueal; L: Lesões ulcerativas na parte superior e lábio inferior, estendendo-se até a gengiva e língua. Barras da escala: 50 μ m. 79 x 160 mm (300 x 300 DPI)

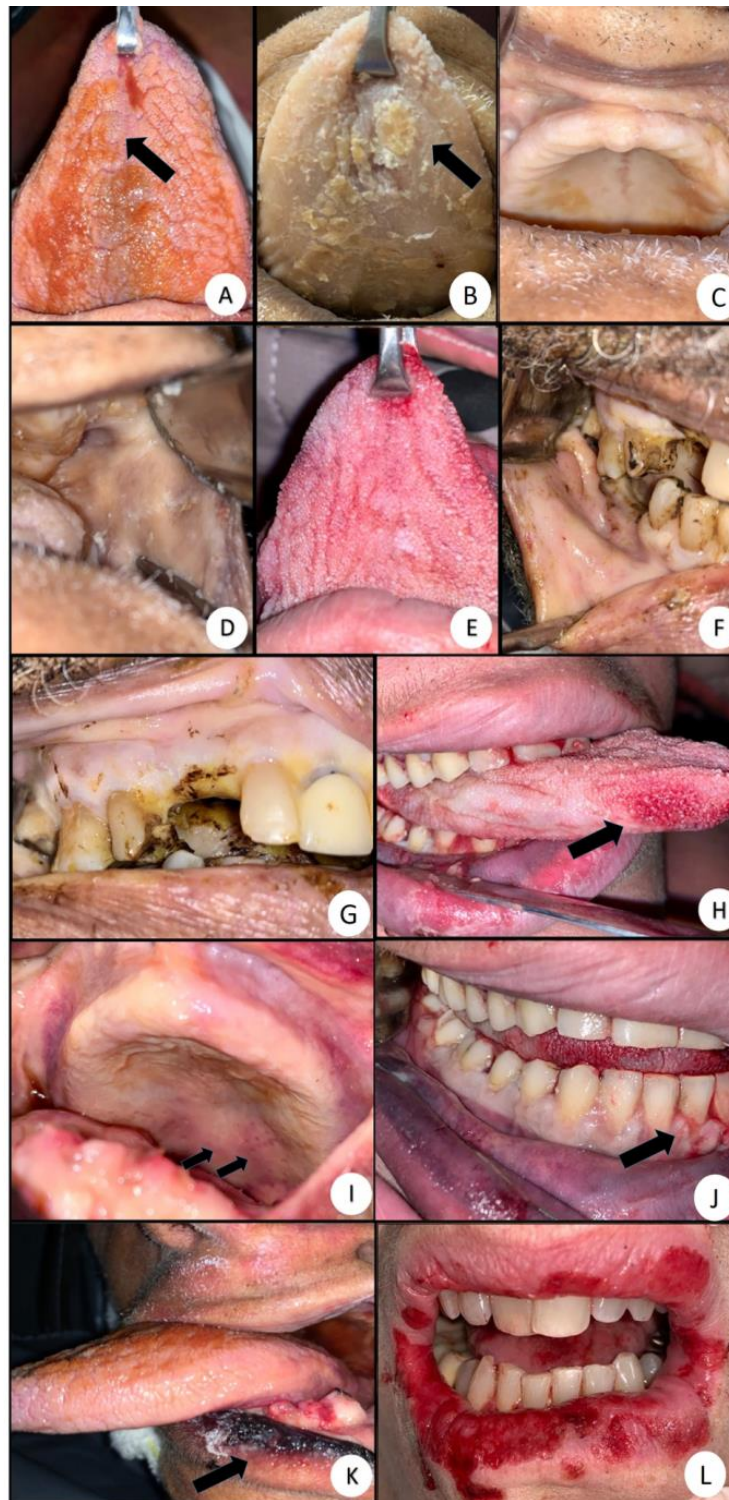
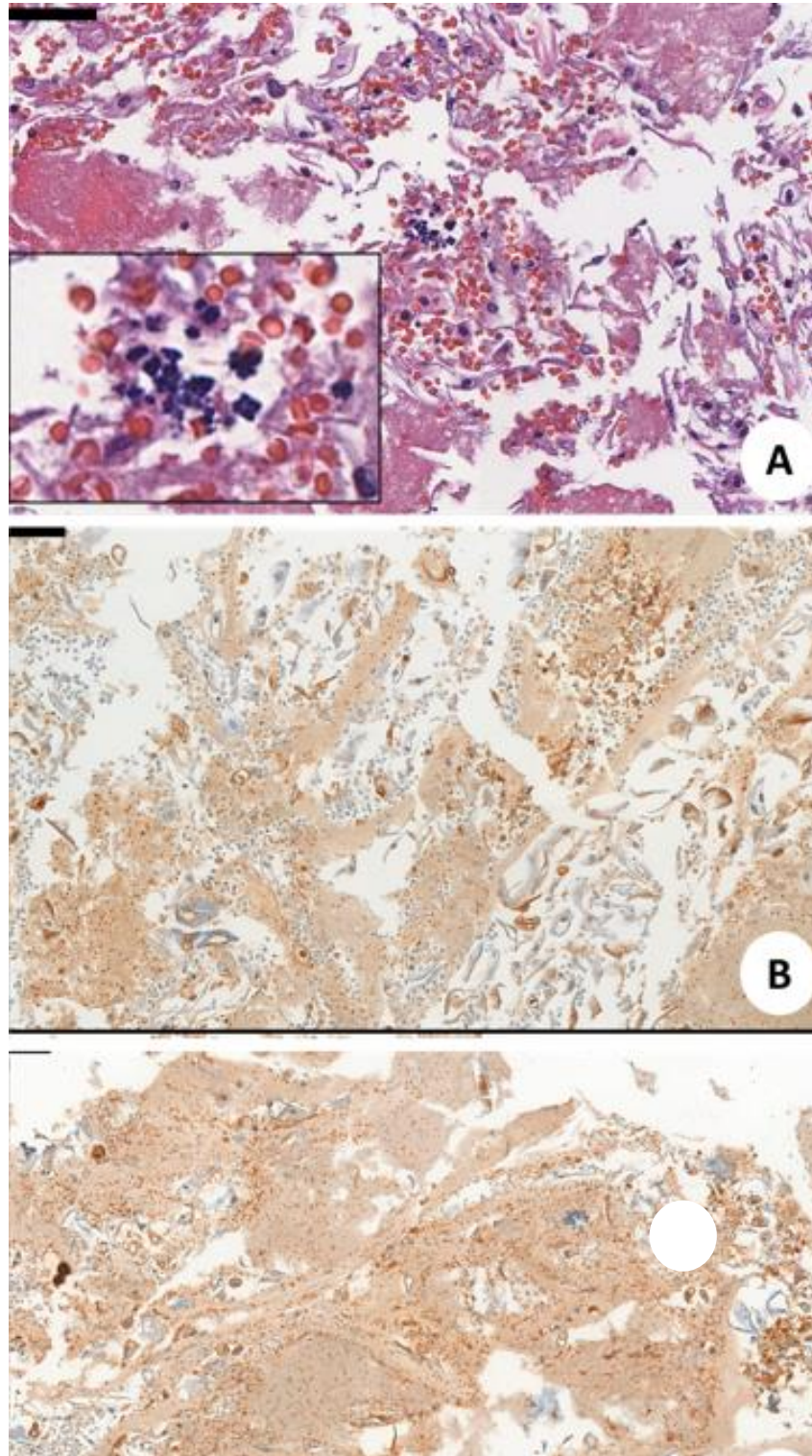


Figura 4.2 - Fotomicrografia de um bloco de células dos pacientes retratados na FIG 4.1. H – A: coloração hematoxilina e eosina de rotina (HE). Amostra de lesão ulcerativa em lábio inferior. Cocos de *Sarcina ventriculi* caracterizados por múltiplos arranjos tetraédricos, gram-positivos basofílicos, coloridos, espalhados no epitélio. B, C: Imuno-histoquímica de um bloco de células - anti-HSV1 (abcam9533), Amostra de uma lesão ulcerada no dorso da língua e mucosa bucal. Imunopositividade observada no interior da célula epitelial a partir da camada basal. 100 x 179 mm (96 x 96 DPI)



Fonte: O autor.

5 CAPÍTULO III: ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DAS PAPILAS GUSTATIVAS EM AMOSTRAS OBTIDAS DE PACIENTES QUE FALECERAM DE COVID-19.

5.1 INTRODUÇÃO

A doença coronavírus 2019 (COVID-19) se tornou a maior pandemia desde a pandemia de influenza (H1N1) de 1918. O vírus SARS-CoV-2 se espalhou rapidamente em todo o mundo e o contágio ocorre por tosse e espirro com gotículas infectadas [1]. Muitos sintomas não respiratórios de COVID-19 foram relatados. Manifestações orais de COVID-19, incluindo dor de garganta, perda de paladar, boca seca, ulceração e vermelhidão da mucosa oral foram relatadas [2, 3]. No entanto, as manifestações bucais parecem estar relacionadas ao comprometimento imunológico devido à própria doença e às reações adversas das intervenções terapêuticas [4]. Além disso, a presença de distúrbios gustativos parece ser um sintoma frequente, com frequência variando de 5,6% a 82% dos pacientes [3].

Os distúrbios gustativos encontrados em pacientes com COVID-19 são relatados como hipogeusia, uma diminuição do paladar; disgeusia que é uma alteração do paladar; e, por último, ageusia que é representada por uma perda completa do paladar. Uma revisão sistemática (analisou 33 estudos transversais, 10.220 pacientes) relatou 45% de alteração do paladar incluindo disgeusia, hipogeusia e ageusia com duração principal de 15 dias. Observou-se associação entre disgeusia e casos leves/moderados de COVID-19 [2]. Outro estudo transversal relatou que de 125 pacientes com distúrbios do paladar e do olfato, 11,5% não tiveram recuperação alguma [5].

O vírus SARS-CoV-2 infecta as células hospedeiras por uma via de membrana superficial. O domínio de ligação ao receptor da proteína viral liga-se inicialmente à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). A proteína furina permite a interação do vírus com ACE2 e cliva uma de suas subunidades spike (S1). A protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2), outra protease ligada à membrana, cliva a outra subunidade do vírus (S2) e expõe o peptídeo para a fusão da membrana da célula hospedeira. Esses eventos levam à fusão entre o envelope viral e a membrana

da célula hospedeira e, assim, o genoma viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira [6].

Estudos têm demonstrado a presença dos receptores ACE2 e TMPRESS2 na cavidade oral expressos na camada intermediária do epitélio escamoso das papilas da língua, mucosa bucal, também coexpressos no epitélio ductal e células acinares das glândulas salivares [7]. Cópias de RNA de SARS-CoV-2 foram detectadas em vários tecidos orais, incluindo o epitélio ductal da glândula salivar, língua, assoalho da boca, mucosa bucal e tecido periodontal [8-11].

O mecanismo subjacente à presença de distúrbios gustativos e manifestações orais é atualmente desconhecido. Para esclarecer a patogênese viral associada às manifestações orais de SARS-CoV-2 e ao comprometimento do paladar relacionado à infecção e para aplicar ainda mais as informações no manejo de pacientes com os distúrbios, é fundamental identificar o subconjunto de tecidos que é o alvo direto de SARS-CoV-2. Relatamos nossa pesquisa descrevendo uma técnica minimamente invasiva de autópsias para entender os mecanismos da COVID-19 na cavidade oral.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

O conselho de ética institucional e federal aprovou o estudo sob o número de protocolo 30364720.0.0000.0068, e as autópsias minimamente invasivas foram realizadas após obter o consentimento informado dos familiares mais próximos.

Os pacientes que testaram positivo para SARS-CoV-2 via swab nasofaríngeo foram submetidos a autópsias minimamente invasivas, guiadas por videoscópio. Esses procedimentos foram realizados no Serviço de Autópsia da Universidade de São Paulo e no centro de pesquisa PISA da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para obter amostras de papilas posteriores da língua, realizamos uma autópsia minimamente invasiva e usamos biópsias post-mortem guiadas por ultrassom, seguindo protocolos de segurança estabelecidos que foram descritos anteriormente

[12]. A autópsia minimamente invasiva foi realizada por uma equipe multidisciplinar composta por um patologista bucomaxilo facial, um otorrinolaringologista e um técnico de autópsia. Para visualizar e localizar os tecidos das papilas da língua na cavidade oral, utilizamos um sistema de vídeo endoscópio comum (MScope – Karl-Storz Optical, Tuttlingen -Alemanha), conectado a um smartphone.

Um procedimento padronizado foi seguido para todas as autópsias: uma incisão de 15 cm foi feita em um saco plástico de segurança que envolvia o cadáver, com a abertura criada no plástico na região do lábio superior para permitir o acesso do endoscópio aos locais intraorais. O endoscópio óptico foi utilizado para localizar o tecido da papila lingual. Como não havia fluxo salivar, utilizamos gaze embebida em detergente enzimático (Riozyme – Rioquímica, Brasil) para limpar a contaminação da superfície ao redor da área da biópsia. Pinça Takahashi foi então usada para pinçar e coletar amostras de tecido do local, com o endoscópio servindo como guia visual. Depois de coletadas as amostras, elas foram dissecadas em duas partes semelhantes ao longo do eixo longitudinal. Uma parte foi fixada em formalina para análises histopatológicas, enquanto a outra parte foi congelada a -80°C e enviada para análises moleculares. Por fim, a abertura do saco plástica foi fechada com adesivo transparente para minimizar o risco de contágio.

A extração do ácido nucléico total (DNA/RNA) das amostras foi realizada com o Kit Extracta – RNA e DNA Viral em equipamento de extração automatizada Extracta 32 (Loccus do Brasil, Ltda, Brasil) seguindo instruções do fabricante. Antes da extração, foi realizada uma etapa de maceração dos tecidos. O RNA viral foi detectado com o kit de reagente SARS-CoV-2 RT-qPCR (PerkinElmer, Finlândia). As amostras foram consideradas positivas quando um ou mais alvos (gene N e gene ORF1ab) apresentavam valor de $Ct \leq 42$, conforme informado pelo fabricante.

Para a realização dos ensaios imuno-histoquímicos, foram obtidos cortes de 3 μm de blocos de tecidos fixados em solução de formol a 10% e embebidos em parafina. Essas seções foram então montadas em lâminas StarFrost® silanizadas/polarizadas (Knittel Glaser, Brunsquive, BS, Alemanha) usando a técnica de bloqueio da atividade de ligação à avidina. Onze amostras de papilas foram submetidas à imuno-histoquímica usando um anticorpo monoclonal de camundongo (6H3) da GeneTex Inc, Irvine, CA, EUA, para detectar o antígeno do nucleocapsídeo SARS-CoV-2. O anticorpo foi diluído a 1:2.000 e a recuperação antigênica foi

realizada com tampão citrato em pH 6,0. A amplificação do sinal foi obtida usando um polímero conjugado com fosfatase alcalina (Polink-2 AP, cat. # D24-110; GBI Labs, Bothell, WA, EUA) e revelada usando o cromógeno Fast Red permanente (GBI-Permanent Red Substrate, cat. # C13-120; GBI Labs). As reações seguiram protocolos padronizados validados em nossos laboratórios, utilizando controles positivos e negativos para ACE2 (Abcam, Cambridge, UK; ab15348 na diluição de 1:2500, tempo de incubação de 30 min, em tampão citrato pH 6,0) e TMPRSS (Abcam ; ab109131, diluição 1:2500, tempo de incubação de 30 min em tampão citrato a pH 6,0). Para ambos, a amplificação do sinal foi realizada usando Reveal Biotin – Free Polyvalent HRP (Spring Bioscience Corp, Pleasanton, CA, EUA). A coloração positiva foi considerada semelhante aos controles positivos pulmonares.

O controle negativo foi estabelecido usando amostras de quatro pacientes que morreram por outras causas, selecionados aleatoriamente com resultados negativos de RT-qPCR para SARS-CoV-2 em tecido de papila lingual e swab nasofaríngeo. Esses protocolos foram validados em nosso laboratório.

5.3 RESULTADOS

A média de idade dos pacientes que morreram por complicações do COVID-19 foi de 64 anos (8-76 anos), 7 pacientes eram do sexo masculino, 4 do sexo feminino e incluímos 4 pacientes no grupo de controle negativo. O número médio de dias entre os primeiros sintomas e a morte foi de 22,81 dias (9 - 39 dias).

Todos os pacientes apresentavam síndrome respiratória aguda grave e foram internados na UTI do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para suporte ventilatório mecânico. Os sintomas mais frequentes foram febre, tosse e dispneia. A maioria desses pacientes apresentava pelo menos uma comorbidade preexistente, como diabetes mellitus, hipertensão arterial sistêmica, doença maligna, doença cardiovascular, asma ou qualquer condição imunossupressora. Houve apenas um paciente livre de comorbidades e apenas não fumantes foram incluídos.

A análise histopatológica quantitativa revelou alterações na estrutura dos queratinócitos do epitélio. Essas alterações incluíam a presença de vacúolos no citoplasma e no núcleo, bem como variações ocasionais no tamanho e na forma dos núcleos. Em seis (6) análises foi observada a presença de trombos endoteliais e degeneração neural. Em um grau de inflamação de 0 a 3 (sendo 0 a ausência de inflamação e 3 o maior grau de inflamação tecidual), a maioria dos casos avaliados apresentou inflamação grau 2. Dentre os casos explorados, 8 apresentaram edema endotelial. Nenhuma amostra revelou ulceração epitelial. Algumas amostras apresentaram co-infecção por formas fúngicas compatíveis com *Candida* spp (esporos, pseudo-hifas e hifas) (FIGURA 5.1).

Por imuno-histoquímica, a imunomarcagem do anticorpo anti-SARS-CoV-2 em células positivas foi citoplasmática, membranosa e nuclear. A expressão foi observada em camadas epiteliais como em tecidos conjuntivos, células endoteliais, células acinares e ductais, adipócitos e células musculares esqueléticas. As células nervosas também expressaram positividade para imunomarcagem de SARS-CoV-2. A imuno-histoquímica foi positiva em todos os 11 casos positivos testados, embora as amostras expressassem diferentes escores de coloração. Tanto o epitélio glandular (células acinares e ductais) quanto as células endoteliais apresentaram intensa expressão dos receptores ACE2 e TMPRSS. Células inflamatórias, como linfócitos, plasmócitos, neutrófilos e macrófagos expressaram sinais positivos de ACE2 e TMPRSS2 (FIGURA 5.1).

Detectamos SARS-CoV-2 por rRT-PCR em 7/11 amostras de tecidos de papilas de língua com um valor médio de limiar de ciclo (Ct) (conjuntos de primer/sonda E) de 36,60 (25,33-37,17) (TABELA 5.1).

5.4 DISCUSSÃO

Apresentamos as características moleculares e histopatológicas observadas em onze autópsias de pacientes com COVID-19 no Brasil. Sete amostras de tecido de papila lingual de pacientes falecidos foram positivas para rRT-PCR. Uma amostra de um menino de 8 anos foi indefinida. Os aspectos patológicos da COVID-19 em

crianças ainda não estão claros, mas esse resultado pode indicar uma carga viral menor. Nossos dados não foram capazes de determinar as cópias de RNA do vírus em pacientes que apresentaram um curso da doença com duração superior a 30 dias.

As análises histopatológicas mostraram algumas alterações morfológicas nos queratinócitos do epitélio de revestimento, caracterizadas principalmente por vacuolização do citoplasma e núcleo, e por vezes pleomorfismo nuclear. A maioria das amostras analisadas apresentou algum infiltrado de células inflamatórias mononucleares ou polimorfonucleares. Essas células inflamatórias expressaram sinais imuno-histoquímicos positivos de ACE2 e TMPRSS2. Em contraste com um estudo imuno-histoquímico anterior que encontrou menos de 20% das células inflamatórias expressando um sinal ACE2 positivo em amostras de tecido da língua, este estudo observou resultados diferentes, apesar de ter um número semelhante de pacientes [13]. Necrose, inflamação e vasos com marginação de trombos foram alterações encontradas em amostras de tecido cerebral de pacientes falecidos por COVID-19 e publicadas por um grupo paralelo da mesma instituição de saúde desta pesquisa [14]. Embora não tenhamos encontrado necrose em nossas amostras analisadas, trombos e degeneração neural foram observados com frequência.

ACE2 e TMPRSS2 são receptores necessários para a entrada do vírus SARS-CoV-2. Esses receptores estão presentes principalmente nas células do epitélio olfatório. O dano ao epitélio olfativo é o mecanismo identificado como a causa mais provável dos distúrbios olfativos causados pelo SARS-CoV-2, que podem ser agravados por lesões no sistema nervoso central [3]. A expressão epitelial de ACE2 e TMPRSS2 encontrada nesta investigação aponta para um mecanismo periférico semelhante de ageusia, não mediado centralmente. Semelhante ao que encontramos, algumas pesquisas baseadas em sequenciamento de RNA não confirmaram a expressão das proteínas de entrada do vírus em neurônios receptores olfativos, portanto, o SARS-Cov-2 parece ter como alvo principal células não neuronais [15].

Células receptoras de sabor (TRCs) são células epiteliais especializadas responsáveis por distinguir entre os cinco sabores básicos: salgado, doce, amargo, umami e azedo. Todas as papilas gustativas contêm três tipos de TRCs: tipo I (salgado), tipo II (doce, amargo e umami) e tipo III (azedo). Descobertas recentes

indicam que o receptor ACE2 está presente nos TRCs tipo II nas papilas gustativas das papilas da língua, sugerindo que o vírus pode se replicar nas papilas gustativas, o que poderia explicar as mudanças no paladar que alguns pacientes com COVID-19 experimentam [16].

As observações deste estudo devem ser interpretadas com cautela devido a algumas limitações, pois se baseiam em apenas onze casos. Uma maior compreensão do papel do vírus nas papilas gustativas surgirá quando um número maior de casos for relatado. Os casos fatais aqui descritos representam pacientes graves com períodos prolongados de internação, ventilação mecânica e alimentação enteral, necessitando de sondas orais e nasais, o que poderia explicar algumas das alterações histopatológicas observadas. Além disso, como apresentamos casos fatais, há um entendimento pobre sobre a ageusia, embora uma autópsia verbal tenha sido realizada para coletar informações sobre os sintomas de um indivíduo familiarizado com o falecido. Por fim, é possível que as alterações observadas sejam diferentes em indivíduos com COVID-19 assintomáticos ou com sintomas leves.

Para entender completamente os mecanismos por trás da disfunção do paladar em pacientes com COVID-19 e desenvolver tratamentos eficazes, é importante integrar dados de metodologia single-cell e informações espaciais, utilizando técnicas como a transcriptômica espacial. Isso permitirá identificar os tipos de células afetadas pelo vírus e obter informações sobre os mecanismos subjacentes à disfunção do paladar. Além disso, o estudo das papilas gustativas no nível de uma única célula pode revelar novos alvos terapêuticos que podem ser explorados para tratar a disfunção do paladar em pacientes com COVID-19. A integração dos dados da metodologia de single-cell com a transcriptômica espacial permite o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes para a disfunção do paladar em pacientes infectados e pode ter implicações mais amplas para a compreensão do impacto do vírus em outros tecidos e órgãos.

5.5 REFERÊNCIAS

1. Huff HV, Singh A. Asymptomatic Transmission During the Coronavirus Disease 2019 Pandemic and Implications for Public Health Strategies. *Clin Infect Dis.* 2020;71(10):2752-6. doi: 10.1093/cid/ciaa654.

2. Amorim Dos Santos J, Normando AGC, Carvalho da Silva RL, Acevedo AC, De Luca Canto G, Sugaya N, et al. Oral Manifestations in Patients with COVID-19: A Living Systematic Review. *J Dent Res.* 2021;100(2):141-54. doi: 10.1177/0022034520957289.

3. Costa KVT, Carnaúba ATL, Rocha KW, Andrade KCL, Ferreira SMS, Menezes PL. Olfactory and taste disorders in COVID-19: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020;86(6):781-92. doi: 10.1016/j.bjorl.2020.05.008.

4. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, Johnsson J, Cunha MDP, Pour SZ, Saraiva AC, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(7):e0007625. doi: 10.1371/journal.pntd.0007625.

5. Nguyen NN, Hoang VT, Dao TL, Meddeb L, Cortaredona S, Lagier JC, et al. Long-Term Persistence of Olfactory and Gustatory Disorders in COVID-19 Patients. *Front Med (Lausanne).* 2022;9:794550. doi: 10.3389/fmed.2022.794550.

6. HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell*, v. 181, n. 2, p. 271-280.e8, Apr 16 2020. ISSN 1097-4172. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32142651> >

7. Park GC, Bang SY, Lee HW, Choi KU, Kim JM, Shin SC, et al. ACE2 and TMPRSS2 immunolocalization and oral manifestations of COVID-19. *Oral Dis.* 2022. doi: 10.1111/odi.14126.

8. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome

coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol.* 2011;85(8):4025-30. doi: 10.1128/JVI.02292-10.

9. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x.

10. Matuck BF, Dolhnikoff M, Duarte-Neto AN, Maia G, Gomes SC, Sendyk DI, et al. Salivary glands are a target for SARS-CoV-2: a source for saliva contamination. *J Pathol.* 2021;254(3):239-43. doi: 10.1002/path.5679.

11. Okada Y, Yoshimura K, Toya S, Tsuchimochi M. Pathogenesis of taste impairment and salivary dysfunction in COVID-19 patients. *Jpn Dent Sci Rev.* 2021;57:111-22. doi: 10.1016/j.jdsr.2021.07.001.

12. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, da Silva LFF, Malheiros DMAC, de Oliveira EP, Theodoro-Filho J, et al. Pulmonary and systemic involvement in COVID-19 patients assessed with ultrasound-guided minimally invasive autopsy. *Histopathology.* 2020;77(2):186-97. doi: 10.1111/his.14160.

13. Allawi N, Abdullah B. Immunohistochemical expression of angiotensin-converting enzyme 2 in superficial and deep maxillofacial tissues: A cross-sectional study. *Health Sci Rep.* 2022;5(4):e737. doi: 10.1002/hsr2.737.

14. Crunfli F, Carregari VC, Veras FP, Silva LS, Nogueira MH, Antunes ASLM, et al. Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2022;119(35):e2200960119. doi: 10.1073/pnas.2200960119.

15. Butowt R, Bilinska K, von Bartheld CS. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. *Trends Neurosci.* 2023;46(1):75-90. doi: 10.1016/j.tins.2022.11.003.

16. Doyle ME, Appleton A, Liu QR, Yao Q, Mazucanti CH, Egan JM. Human Type II Taste Cells Express Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Are Infected by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Am J Pathol.* 2021;191(9):1511-9. doi: 10.1016/j.ajpath.2021.05.010.

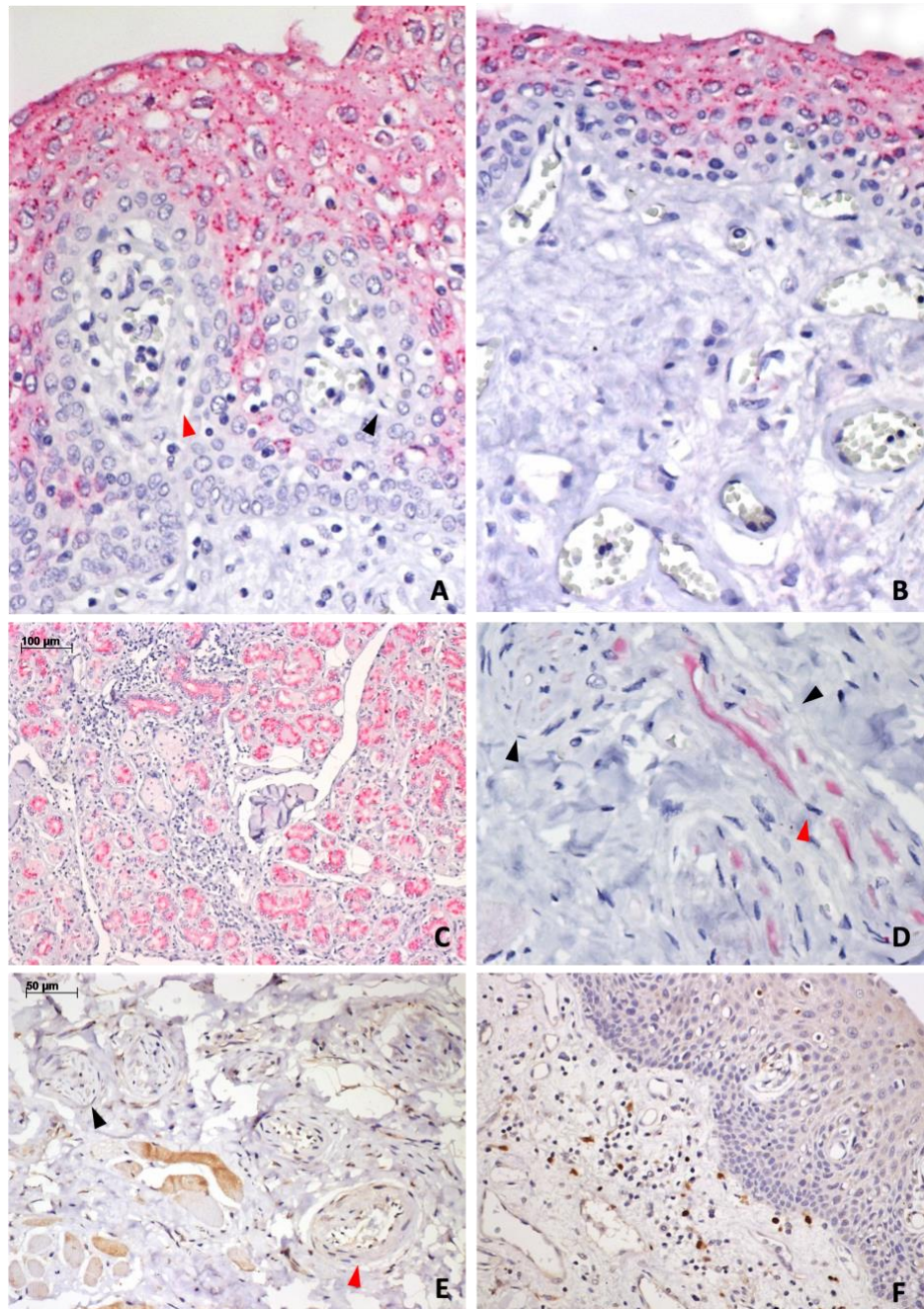
Tabela 5.1 Descrição das amostras de papilas gustativas

Caso	Gênero	Idade	Intervalo sintoma - óbito (dias)	CT RT-PCR	DM	HAS	Grau de inflamação	Trombo	Degeneração Neural	Tumefação Endotelial
1	M	51	31	Negativo	N	N	I	S	S	N
2	F	71	16	31,62	S	S	II	S	N	S
3	M	67	10	37,17	N	S	II	S	S	S
4	F	74	23	25,33	S	N	II	N	N	N
5	M	64	14	30,1	S	S	II	S	N	S
6	M	49	23	32,63	S	N	II	N	S	S
7	F	38	9	34,36	N	N	I	N	S	N
8	M	8	10	Negativo	N	N	I	S	N	S
9	M	74	29	32,92	N	S	I	N	S	S
10	M	76	47	Negativo	N	N	II	S	S	S
11	F	54	39	Negativo	N	N	I	N	N	N

(S=Sim; N=Não; DM=Diabetes Mellitus; HAS=Hipertensão Arterial Sistêmica).

Fonte: O autor

Figura 5.1. Achados histológicos de biópsia post-mortem: Papilas linguais de paciente falecido por COVID-19: (A) Epitélio mostrando coloração positiva para SARS-CoV-2. Epitélio de revestimento caracterizado por pleomorfismo nuclear. Nervo periférico (seta preta) ao lado de um vaso sanguíneo (seta vermelha); (B) Imunohistoquímica para SARS-CoV-2, mais intensa direcionada a células suprabasais em relação às células basais. (C) Glândula salivar menor mostrando coloração positiva para SARS-CoV-2 e infiltração inflamatória difusa. Isso suporta a heterogeneidade que pode ser encontrada em diferentes locais da cavidade oral; (D) Imunohistoquímica para SARS-CoV-2. Secção longitudinal e transversal de nervo periférico (setas pretas) ao lado de um vaso sanguíneo (seta vermelha); (E) Imunohistoquímica do receptor TMPRSS, direcionada à proteína humana TMPRSS (marrom), revelando coloração no endotélio (presença de endotelite com edema endotelial - seta vermelha). Nervo periférico (seta preta); (F) Imunohistoquímica do receptor ACE2. Expressão de ACE2 foi observada nos núcleos e citoplasma de células endoteliais da língua. Infiltração inflamatória difusa abaixo da camada basal



6 CONCLUSÃO

A utilização de várias metodologias para estabelecer um padrão de evidência desempenha um papel crucial na construção do conhecimento científico. Ainda há poucos estudos que relacionam achados histopatológicos e biomoleculares com infecções respiratórias na cavidade oral. Compreender a interação entre esses patógenos e os tecidos presentes na cavidade oral pode ser uma estratégia assertiva para melhorar a compreensão dos padrões de contaminação e dos mecanismos de disseminação dessas doenças.

Em meio a uma crise epidemiológica global, o projeto em questão buscou aproveitar a disponibilidade de material biológico para colaborar com pesquisadores e laboratórios de diversas áreas de expertise clínica, fisiopatológica e molecular. O objetivo foi construir um quadro significativo da distribuição e dos possíveis papéis do SARS-CoV-2 na cavidade oral.

Foi constatado que o epitélio da cavidade oral pode servir como um reservatório para o SARS-CoV-2, uma vez que não apenas é capaz de armazená-lo, mas também favorece sua proliferação. A presença do vírus em tecidos da cavidade oral foi confirmada, o que sugere a saliva como um vetor de transmissão, inclusive em pacientes assintomáticos. O tecido periodontal se comportou como alvo para SARS-CoV-2, e pode contribuir por muito tempo para a presença do vírus em amostras de saliva

A utilização de autópsias minimamente invasivas para obtenção de amostras é uma maneira eficaz para o entendimento do processo doença/paciente de uma forma mais completa uma vez que é possível analisar tecidos de diferentes órgãos. Essa metodologia permite uma compreensão dos achados em tecidos específicos e permite também observar sua relevância para o paciente como um todo. Essa abordagem permite a percepção do comportamento dos tecidos da cavidade oral diante de diferentes reações do órgão alvo, incluindo manifestações orais relacionadas ao SARS-CoV-2. Além disso, permite avaliar a gravidade do acometimento pulmonar e das vias aéreas em pacientes com infecção respiratória.

Durante muito tempo, a autópsia tem sido considerada um método de estudo que possibilita uma análise integral do indivíduo e do processo de doença, permitindo a integração entre diferentes especialidades médicas. Contudo, neste projeto, foi possível demonstrar que a inclusão de técnicas para a obtenção de amostras da região de cabeça e pescoço, bem como a presença de profissionais da odontologia em serviços de autópsia, pode ampliar esse campo de pesquisa. Além disso, pode fornecer fundamentos para a rede de saúde pública e gestão para uma retomada segura dos atendimentos em saúde bucal em um momento crítico do sistema. Essa abordagem também destaca a importância de novos protocolos de biossegurança para a realização de procedimentos ambulatoriais que envolvam fluidos da cavidade nasal e oral, seja através do contato direto com gotículas de saliva ou da presença de sprays de aerossol no ar.

Embora existam possibilidades de correlação, não foi conclusivamente demonstrado que o SARS-CoV-2 seja capaz de causar lesões e manifestações bucais clinicamente evidentes como agente primário. Entretanto, a análise dos resultados indicou que, assim como em outros órgãos, a saúde geral deteriorada e as complicações associadas à gravidade do quadro nos órgãos centrais afetados (juntamente com o prolongado tempo de internação) parecem ter uma influência maior no aparecimento de lesões orais do que a própria infecção pelo SARS-CoV-2.

REFERÊNCIAS

1. Johns Hopkins University. Coronavirus Resource Center, Johns Hopkins University. <https://coronavirus.jhu.edu/map.html>. Accessed 1 May, 2022.
2. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3.
3. Amorim Dos Santos J, Normando AGC, Carvalho da Silva RL, Acevedo AC, De Luca Canto G, Sugaya N, et al. Oral Manifestations in Patients with COVID-19: A Living Systematic Review. *J Dent Res*. 2021;100(2):141-54.
4. Costa KVTD, Carnáuba ATL, Rocha KW, Andrade KCL, Ferreira SMS, Menezes PL. Olfactory and taste disorders in COVID-19: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2020;86(6):781-92.
5. Fehr AR, Channappanavar R, Perlman S. Middle East respiratory syndrome: emergence of a pathogenic human coronavirus. *Annu rev med*. 2017 Jan 14;68:387–399. doi: 10.1146/annurev-med-051215-03115.
6. Kindler E, Thiel V. SARS-CoV and IFN: too little, too late. *Cell host microbe*. 2016 Feb 10;19(2):139–141. doi: 10.1016/j.chom.2016.01.012 170.
7. Channappanavar R, Fehr AR, Vijay R, Mack M, Zhao J, Meyerholz DK, et al. Dysregulated Type I Interferon and Inflammatory Monocyte-Macrophage Responses Cause Lethal Pneumonia in SARS-CoV-Infected Mice. *Cell Host Microbe*. 2016;19(2):181-93.
8. Newton AH, Cardani A, Braciale TJ. The host immune response in respiratory virus infection: balancing virus clearance and immunopathology. *Semin immunopathol*. 2016 Jul;38(4):471–82. doi: 10.1007/s00281-016-0558- 0.
9. Chen N, Zhou M, Dong X, et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. *Lancet*. 2020;395(10223):507–13. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30211- 7.

10. Xiong Y, Liu Y, Cao L, Wang D, Guo M, Jiang A, et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. *Emerg Microbes Infect.* 2020;9(1):761-70.
11. Galhardo LF, Ruivo GF, de Oliveira LD, Parize G, Santos SSFD, Pallos D, et al. Inflammatory markers in saliva for diagnosis of sepsis of hospitalizes patients. *Eur J Clin Invest.* 2020;50(5):e13219.
12. Abe K, Takahashi A, Fujita M, Imaizumi H, Hayashi M, Okai K, et al. Dysbiosis of oral microbiota and its association with salivary immunological biomarkers in autoimmune liver disease. *PLoS One.* 2018;13(7):e0198757.
13. Arenius I, Ruukonen H, Ortiz F, et al. The relationship between oral diseases and infectious complications in patients under dialysis [published online ahead of print, 2020 Feb 5]. *Oral Dis.* 2020;10.1111/odi.13296. doi:10.1111/odi.13296
14. Marques Filho JS, Gobara J Jr, da Silva Salomao GV, et al. Cytokine Levels and Human Herpesviruses in Saliva from Clinical Periodontal Healthy Subjects with Peri-Implantitis: A Case-Control Study. *Mediators Inflamm.* 2018;2018:60206. doi:10.1155/2018/6020625
15. Äyräväinen L, Heikkinen AM, Kuuliala A, et al. Inflammatory biomarkers in saliva and serum of patients with rheumatoid arthritis with respect to periodontal status. *Ann Med.* 2018;50(4):333–44. doi:10.1080/07853890.2018.1468922
16. Pallos D, Leão MV, Togeiro FC, et al. Salivary markers in patients with chronic renal failure. *Arch Oral Biol.* 2015;60(12):1784–1788. doi:10.1016/j.archoralbio.2015.09.008
17. Kirchdoerfer RN, Cottrell CA, Wang N, Pallesen J, Yassine HM, Turner HL, Corbett KS, Graham BS, McLellan JS, Ward AB. Pre-fusion structure of a human coronavirus spike protein. *Nature.* 2016 Mar 3;531(7592):118-21. doi: 10.1038/nature17200.
18. Liu L, Wei Q, Alvarez X, Wang H, Du Y, Zhu H, Jiang H, Zhou J, Lam P, Zhang L et al. Epithelial cells lining salivary gland ducts are early target cells of severe acute respiratory syndrome coronavirus infection in the upper respiratory tracts of rhesus macaques. *J Virol.* 85(8):4025-30.

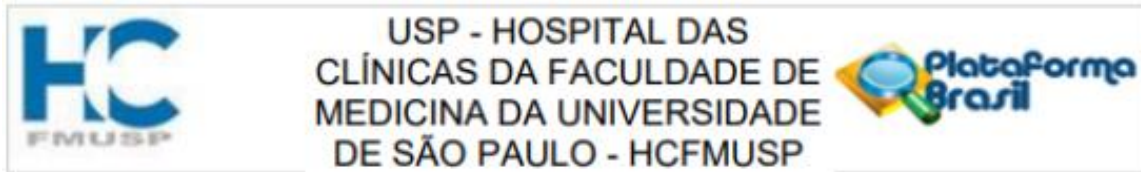
19. Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020;12(1):8.
20. Khurshid Z, Asiri FYI, Al Wadaani H. Human Saliva: Non-Invasive Fluid for Detecting Novel Coronavirus (2019-nCoV). *Int J Environ Res Public Health.* 2020;17(7).
21. Hamid H, Khurshid Z, Adanir N, Zafar MS, Zohaib S. COVID-19 Pandemic and Role of Human Saliva as a Testing Biofluid in Point-of-Care Technology [published online ahead of print, 2020 Jun 3]. *Eur J Dent.* 2020;10. doi:10.1055/s-0040-1713020
22. Li R, Pei S, Chen B, Song Y, Zhang T, Yang W, Shaman J. Substantial undocumented infection facilitates the rapid dissemination of novel coronavirus (SARS-CoV-2). *Science.* 2020; May 1;368(6490):489-493
23. Mohseni AH, Taghinezhad-S S, Xu Z, Fu X. Body fluids may contribute to human-to-human transmission of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2: evidence and practical experience. *Chin Med.* 2020;15:58.
24. Morawska L, Milton DK. It Is Time to Address Airborne Transmission of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Clin Infect Dis.* 2020;71(9):2311-3.
25. To KK, Tsang OT, Leung WS, Tam AR, Wu TC, Lung DC, et al. Temporal profiles of viral load in posterior oropharyngeal saliva samples and serum antibody responses during infection by SARS-CoV-2: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 2020;20(5):565-74.
26. Nikolai LA, Meyer CG, Kreamsner PG, Velavan TP. Asymptomatic SARS Coronavirus 2 infection: Invisible yet invincible. *Int J Infect Dis.* 2020 Nov;100:112-116. doi: 10.1016/j.ijid.2020.08.076.
27. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-80.e8.
28. Pitones-Rubio V, Chávez-Cortez EG, Hurtado-Camarena A, GonzálezRascón A, Serafín-Higuera N. Is periodontal disease a risk factor for severe COVID-19 illness? *Med Hypotheses.* 2020 Nov;144:109969. doi: 10.1016/j.mehy.2020.109969.

29. Duarte-Neto AN, Monteiro RAA, Johnsson J, Cunha MDP, Pour SZ, Saraiva AC, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(7):e0007625.
30. Corman VM, Landt O, Kaiser M, Molenkamp R, Meijer A, Chu DK, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*. 2020;25(3).
31. Heurich A, Hofmann-Winkler H, Gierer S, Liepold T, Jahn O, Pöhlmann S. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. *J Virol*. 2014;88(2):1293-307.
32. Senapati S, Banerjee P, Bhagavatula S, Kushwaha PP, Kumar S. Contributions of human ACE2 and TMPRSS2 in determining host-pathogen interaction of COVID-19. *J Genet*. 2021;100(1):12. doi: 10.1007/s12041-021-01262-w.
33. Janc J, Suchański M, Mierzchała-Pasierb M, Woźnica-Niesobka E, Łysenko L, Leśnik P. Does the Serum Concentration of Angiotensin II Type 1 Receptor Have an Effect on the Severity of COVID-19? A Prospective Preliminary Observational Study among Healthcare Professionals. *J Clin Med*. 2022 Mar 23;11(7):1769. doi: 10.3390/jcm11071769.
34. Li MY, Li L, Zhang Y, Wang XS. Expression of the SARS-CoV-2 cell receptor gene ACE2 in a wide variety of human tissues. *Infect Dis Poverty*. 2020 Apr 28;9(1):45. doi: 10.1186/s40249-020-00662-x.
35. Santos CF, Morandini AC, Dionísio TJ, Faria FA, Lima MC, Figueiredo CM, et al. Functional Local Renin-Angiotensin System in Human and Rat Periodontal Tissue. *PLoS One*. 2015;10(8):e0134601.
36. Madapusi Balaji T, Varadarajan S, Rao USV, Raj AT, Patil S, Arakeri G, et al. Oral cancer and periodontal disease increase the risk of COVID 19? A mechanism mediated through furin and cathepsin overexpression. *Med Hypotheses*. 2020;144:109936.
37. Sapkota D, Sølrand TM, Galtung HK, Sand LP, Giannecchini S, To KKW, Mendes-Correa MC, Giglio D, Hasséus B, Braz-Silva PH. COVID-19 salivary signature: diagnostic and research opportunities. *J Clin Pathol*. 2020 Aug 7:jclinpath-2020-206834. doi: 10.1136/jclinpath-2020-206834.

38. Santos CN, Rezende KM, Oliveira Neto NF, Okay TS, Braz-Silva PH, Bönecker M. Saliva: an important alternative for screening and monitoring of COVID-19 in children. *Braz Oral Res.* 2020 Nov 20;34:e0125. doi: 10.1590/1807-3107bor-2020.vol34.0125. 174.
39. Braz-Silva PH, Mamana AC, Romano CM, Felix AC, de Paula AV, Ferreira NE, Buss LF, Tozetto-Mendoza TR, Caixeta RAV, Leal FE, Grespan RMZ, Bizário JCS, Ferraz ABC, Sapkota D, Giannecchini S, To KK, Doglio A, MendesCorrea MC. Performance of at-home self-collected saliva and nasalaropharyngeal swabs in the surveillance of COVID-19. *J Oral Microbiol.* 2020 Dec 9;13(1):1858002. doi: 10.1080/20002297.2020.1858002
40. Das S, Krithiga GS, Gopalakrishnan S. Detection of human herpes viruses in patients with chronic and aggressive periodontitis and relationship between viruses and clinical parameters. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012;16(2):203-9.
41. Grenier G, Gagnon G, Grenier D. Detection of herpetic viruses in gingival crevicular fluid of patients suffering from periodontal diseases: prevalence and effect of treatment. *Oral Microbiol Immunol.* 2009; Dec;24(6):506-9.
42. Doyle ME, Premathilake HU, Yao Q, Mazucanti CH, Egan JM. Physiology of the tongue with emphasis on taste transduction. *Physiol Rev.* 2023;103(2):1193-246.
43. Roper SD, Chaudhari N. Taste buds: cells, signals and synapses. *Nat Rev Neurosci.* 2017;18(8):485-97
44. Mu L, Sanders I. Human tongue neuroanatomy: Nerve supply and motor endplates. *Clin Anat.* 2010;23(7):777-91.
45. Doyle ME, Appleton A, Liu QR, Yao Q, Mazucanti CH, Egan JM. Human Type II Taste Cells Express Angiotensin-Converting Enzyme 2 and Are Infected by Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *Am J Pathol.* 2021;191(9):1511-9.
46. Wang C, Wu H, Ding X, Ji H, Jiao P, Song H, et al. Does infection of 2019 novel coronavirus cause acute and/or chronic sialadenitis? *Med Hypotheses.* 2020;140:109789.
47. Xu J, Li Y, Gan F, Du Y, Yao Y. Salivary Glands: Potential Reservoirs for COVID-19 Asymptomatic Infection. *J Dent Res.* 2020;99(8):989.

48. Mariz BALA, Brandão TB, Ribeiro ACP, Lopes MA, Santos-Silva AR. New Insights for the Pathogenesis of COVID-19-Related Dysgeusia. *J Dent Res.* 2020;99(10):1206.
49. Amorim Dos Santos J, Normando AGC, Carvalho da Silva RL, De Paula RM, Cembranel AC, Santos-Silva AR, et al. Oral mucosal lesions in a COVID-19 patient: New signs or secondary manifestations? *Int J Infect Dis.* 2020;97:326-8.
50. Martín Carreras-Presas C, Amaro Sánchez J, López-Sánchez AF, Jané-Salas E, Somacarrera Pérez ML. Oral vesiculobullous lesions associated with SARS-CoV-2 infection. *Oral Dis.* 2021;27 Suppl 3(Suppl 3):710-12. doi:10.1111/odi.13382
51. Ansari R, Gheitani M, Heidari F, Heidari F. Oral cavity lesions as a manifestation of the novel virus (COVID-19). *Oral Dis.* 2021;27 Suppl 3:771-72. doi:10.1111/odi.13465
52. Dzedzic A, Wojtyczka R. The impact of coronavirus infectious disease 19 (COVID-19) on oral health. *Oral Dis.* 2021;27 Suppl 3:703-06. doi:10.1111/odi.13359

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise da presença do SARS-CoV-2 em glândulas salivares e tecidos periodontais: uma avaliação biomolecular, imunohistoquímica e de ultra-estrutura em casos fatais da COVID19

Pesquisador: Luiz Fernando Ferraz da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 45276721.4.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

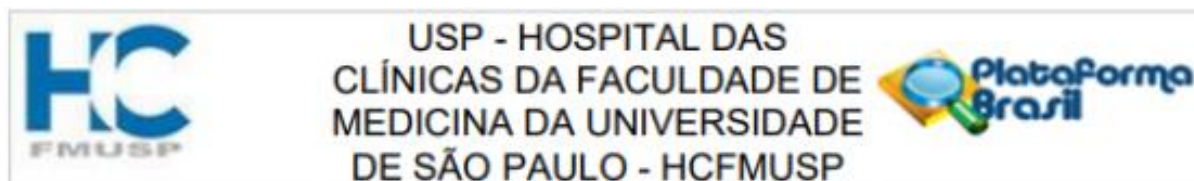
DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.687.643

Apresentação do Projeto:

Projeto bem escrito e delineado. Projeto que visa a análise da presença do SARS-CoV-2 em tecido salivar glandular e periodontal. Faz parte de um projeto maior com parecer já aprovado (CAAE: 30364720.0.0000.0068). O procedimento será realizado em pacientes com testes positivos, do tipo Rt-PCR de COVID-19, e óbito no Complexo HCFMUSP. A autópsia será realizada com autorização dos familiares, seguindo TCLE aprovado pelo CONEP com parecer 30364720.0.0000.0068. A Autópsia será realizada nas dependências do PISA (Plataforma de Imagem na Sala de Autópsia da FMUSP), por uma equipe composta por dois profissionais previamente treinados pela equipe de autópsia minimamente invasiva do PISA. A equipe será composta por ao menos um dentista e um técnico ou auxiliar de autópsia. Os corpos serão embalados com plástico protetor e submetidos a Tomografia Computadorizada a região de cabeça e pescoço, cujo protocolo já foi previamente testado em projeto da mesma instituição intitulado "Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom" cujo pesquisador principal é a professora Marisa Dolhnikoff com parecer número 30364720.0.0000.0068. A coleta será realizada em 30 cadáveres do sexo masculino ou feminino com idade entre 6 e 80 anos. A

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.687.643

biópsia post-mortem será realizada por punção de órgãos-alvo guiada por ultrassom ou sonda fibro-óptica, por meio de sistema com agulhas Tru-CutRsemi automáticas coaxiais de 14G, com 20 cm de comprimento. Os seguintes órgãos serão biopsiados: parótida, glândula submandibular, glândula salivar menor – removida da região de mucosa labial inferior e tecidos periodontais, sendo este caracterizado pela ameia mesial do primeiro molar superior. Na sua ausência o próximo espaço periodontal coletado será do dente adjacente ao espaço protético Utiliza-se equipamento portátil de ultrassonografia (US) SonoSite MTurboR(Fujifilm, Bothell, WA, USA) com transdutores banda larga multifrequenciais C60x (5-2 MHz Convexo) e HFL38X (13-6 MHz Linear) e imagens padrão DICOMR. E ótica Karl-Storz Optical, Tuttlingen –German, associado a smartphone do tipo iphone com aplicativo M-scope para visualização direta das amostras periodontais e de glândulas salivares menores.Serão coletados um mínimo de 5 fragmentos adequados de cada órgão alvo, os fragmentos terão espessura conforme protocolo padronizado pela autópsia minimamente invasiva [30]Um fragmento será armazenado em nitrogênio líquido, Os demais fragmentos colocados em frascos individuais com formol a 10% para posterior análise histopatológica e de ultraestrutura. As amostras serão submetidas a análise histopatológica, assim como, reações de imunohistoquímica para SARS-CoV-2, ACE2, TMPRSS2 e FURINA. A caracterização da inflamação será feita a partir da realização das reações de IHC para CD4, CD8 CD68, IL6, IL10.As Amostras congeladas serão submetidas a reação de PCR para SARS-CoV-2 e análise da ultraestrutura por microscopia eletrônica de transmissão.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar a presença do SARS-CoV-2 nas glândulas salivares e tecidos periodontais de casos fatais de COVID-19; Caracterizar as alterações celulares do sistema glandular salivar de pacientes que morreram em decorrência da COVID-19; Quantificar a expressão tecidual dos receptores ACE2, TMPRSS e Furina nos tecidos glandulares e periodontais de pacientes que morreram em decorrência da COVID-19 e casos controles; Caracterizar as alterações da ultraestrutura das células acinares, ductais e miofibroblastos infectadas pelo SARSCoV-2; Caracterizar as alterações da ultraestrutura

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 4.687.643

dos Fibroblastos e queratinócitos dos tecidos periodontais infectados pelo SARS-CoV-2; Quantificar a expressão imunohistoquímica do antígeno Anti-SARS-CoV-2 nas amostras coletadas de periodonto e glândulas salivares.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos aos cadáveres, os procedimentos realizados são inerentes a autópsia minimamente invasiva já realizada no centro de pesquisa em casos advindo do hospital das clínicas da faculdade de medicina da universidade de São Paulo

Benefícios: A identificação do vírus em tecidos glandulares e periodontais, podem explicar a presença da alta carga viral no fluido salivar em diferentes estágios da doença. Sendo este um órgão alvo de entrada do vírus no corpo humano, assim como, uma importante via de contaminação pessoa-pessoa.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem descrita e detalhada a respeito da pesquisa do SARS-CoV-2 em tecidos. Pesquisa será realizada por equipe treinada em relação a autopsia minimamente invasiva. Apresenta descrição detalhada da coleta do material e do processamento do mesmo.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE já aprovado em projeto anterior pela CONEP (CAAE: 30364720.0.0000.0068), sendo bem descrito, e de forma simples ao familiar/ responsável legal. Apresenta todos os itens que um TCLE deve apresentar, e deixa bem explícitos os benefícios da pesquisa.

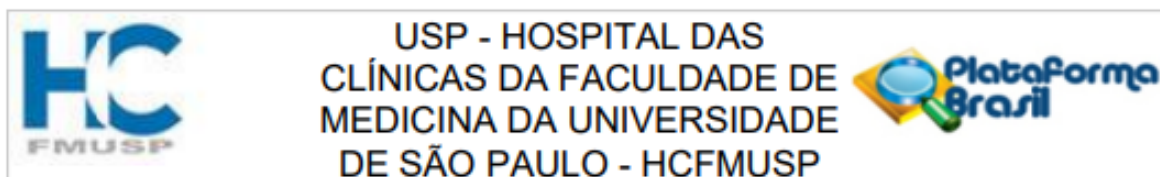
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pesquisa importante para o entendimento da fisiopatologia do vírus SARS-CoV-2 nos tecidos que apresentam os receptores ACE2. Apresenta financiamento já aprovado para a elaboração do mesmo (aprovação de projeto anterior CAAE: 30364720.0.0000.0068). Projeto bem descrito tanto em relação a coleta do material e sua análise.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.687.643

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1697899.pdf	05/04/2021 10:15:11		Aceito
Outros	docdigital.pdf	05/04/2021 10:14:39	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Cronograma	cronograma.pdf	05/04/2021 10:13:20	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	custos.pdf	05/04/2021 10:12:32	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	CartaCompromissoDoutorado.pdf	05/04/2021 10:11:20	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	SVO.pdf	05/04/2021 10:10:03	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	30/03/2021 11:26:20	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2.docx	30/03/2021 11:21:43	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investidor	projetodocMatuckBurnsglsalivar.docx	05/02/2021 21:11:09	Luiz Fernando Ferraz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 03 de Maio de 2021

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS DA PESQUISA

Título da pesquisa - Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom

Pesquisador principal – Marisa Dolhnikoff

Cargo / Função – Professora do Departamento de Patologia da FMUSP

Inscrição Conselho Regional de Medicina (CRM): 54500

Unidade do HCFMUSP: FMUSP, Departamento de Patologia

Departamento/Instituto – Departamento de Patologia/ Faculdade de Medicina da USP

Convidamos o(a) Sra. para participar desta pesquisa “Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom”.

Uma pessoa de sua família ou sob sua responsabilidade faleceu e os médicos que a atenderam solicitaram a realização de uma autópsia para esclarecer melhor todas as possíveis causas da morte. Atualmente, em alguns países já se realizam autópsias associadas aos exames de imagem, como por exemplo, ultrassonografia e tomografia, os quais têm contribuído para explicar melhor os motivos da morte desta pessoa.

O Hospital das Clínicas-FMUSP está implantando aqui a autópsia minimamente invasiva dirigida pela ultrassonografia (AMI-US), que consiste na coleta de tecido de vários órgãos para avaliação microscópica, utilizando-se uma punção por agulha, sem necessidade de realização de autópsia com abertura do corpo. Em casos específicos, ou seja, quando houver suspeita de eventos cardiovasculares com comprometimento de vasos de grande ou médio calibre, incluindo tromboembolismo pulmonar e infarto agudo do miocárdio, será realizada abertura de até 3,0 cm no tórax para retirada de fragmentos maiores de coração e pulmão. A avaliação do tecido coletado permitirá complementar os resultados obtidos pelos exames clínico-laboratoriais no diagnóstico da causa da morte e comorbidades e propiciará o estudo da patogenia dessa nova doença (COVID-19). Os tecidos coletados serão armazenados de forma adequada sob minha responsabilidade, e irão fazer parte de um biorrepositório de covid19. O biorrepositório é uma coleção de material biológico humano, coletado e armazenado ao longo da execução do estudo, conforme o regulamento e normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sem fins comerciais.

Por isso, solicitamos sua autorização para o estudo do tecido coletado pela Autópsia Minimamente Invasiva e do sangue coletado para exames laboratoriais e para o armazenamento dos tecidos em nosso biorrepositório para estudos futuros.

Embora não haja benefícios diretos para a pessoa, a análise do tecido coletado irá contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da COVID-19.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável

Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de de de		
Nome do pesquisador: Marisa Dolhnikoff		

Hospital das Clínicas da Faculdade De Medicina da USP	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa /Representante Legal	_____ Rubrica do Investigador Responsável

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis para esclarecimento de eventuais dúvidas. A investigadora coordenadora do estudo é a professora Marisa Dolhnikoff do Departamento de Patologia da FMUSP. Ela pode ser encontrada na Av. Dr. Arnaldo, 455 – 1º andar – sala 1155 no telefone (11) 3061-8521. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661- 1548, (11) 2661-1549, das 7 às 16h de segunda a sexta feira ou por e-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Mesmo tendo fornecido seu consentimento, você poderá retirá-lo a qualquer momento. Nesta situação o tecido coletado não será utilizado para pesquisa.

Todos os dados serão utilizados exclusivamente para fins de pesquisa e as informações de identificação serão mantidas sob sigilo, garantindo a confidencialidade. Os dados serão analisados em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente em particular seja por nome ou imagem que permita sua identificação.

Informamos ainda que não há despesas adicionais para os familiares / responsáveis em qualquer fase do estudo, incluindo os exames realizados. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Os familiares/responsáveis têm direito de serem mantidos atualizados sobre os resultados parciais do estudo.

O material obtido da autópsia minimamente invasivo será armazenado em um biorrepositório e será analisado pelo grupo de pesquisa deste estudo e de seu colaborador no exterior, respeitando as normas éticas previstas em lei (*Resolução CNS nº 441 de 2011, itens 1.II e 2.II*).

Porém pode acontecer que futuramente seja interessante usar estas amostras para outros trabalhos de pesquisa. Neste caso, há necessidade de consultá-lo para autorizar o uso deste material?

(....) SIM. Eu quero ser consultado para autorizar ou não cada pesquisa futura com o material.

(....) NÃO. Eu dispenso a autorização para cada pesquisa e estou informado (a) que a Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas (CAPPesq) irá examinar a nova pesquisa e decidir sobre a utilização ou não do material.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo a pesquisa “Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom”.

Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom	Confidencial
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de de de	

Nome do pesquisador: Marisa Dolhnikoff	Rubrica do Participante da Pesquisa /Representante Legal	Rubrica do Investigador Responsável
Hospital das Clinicas da Faculdade De Medicina da USP		

Eu discuti com o Dra Marisa Dolhnikoff sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a autorização para a inclusão de meu familiar é isenta de despesas e que tenho o direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais do estudo.

Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Data ____/____/____

Assinatura do participante /representante legal

Nome do participante/representante legal

Data ____/____/____

Assinatura do responsável pelo estudo

Estudos da COVID-19 fatal por meio da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom	Confidencial	
Termo de Consentimento Livre e Esclarecido versão 1 de de de	_____ Rubrica do Participante da Pesquisa /Representante Legal	_____ Rubrica do Investigador Responsável
Nome do pesquisador: Marisa Dolhnikoff		
Hospital das Clinicas da Faculdade De Medicina da USP		