



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Odontologia

Barbara Bruno Fagundes Marques

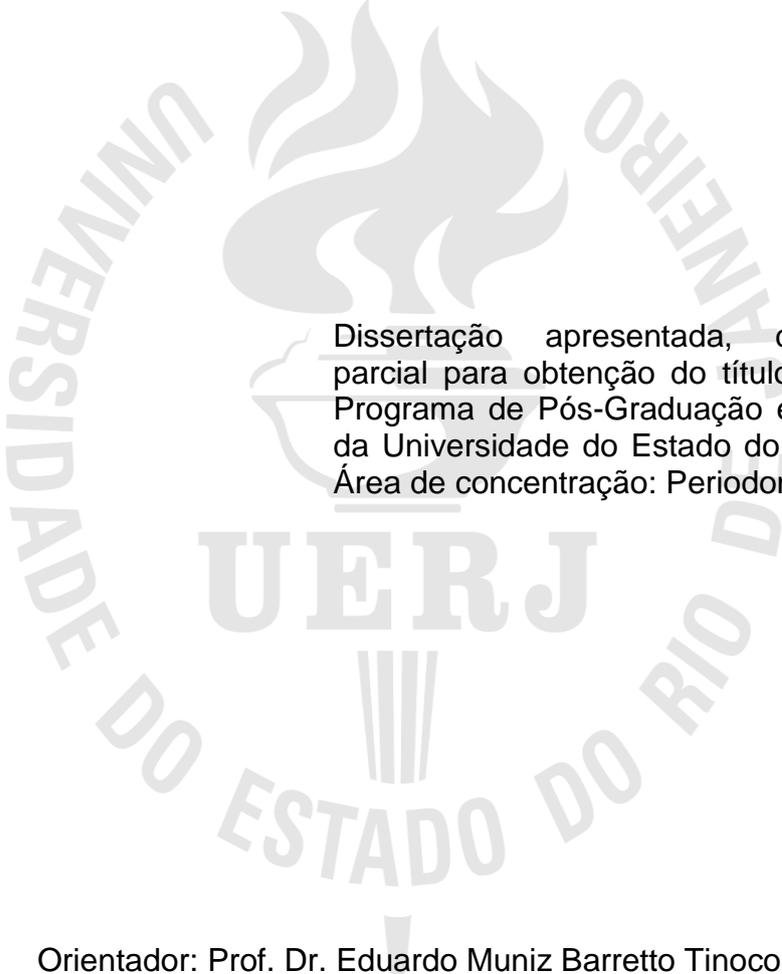
**Avaliação de biomarcadores bucais e salivares em pacientes com
COVID-19**

Rio de Janeiro

2022

Barbara Bruno Fagundes Marques

Avaliação de biomarcadores bucais e salivares em pacientes com COVID-19



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Rio de Janeiro

2022

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB/B

M357 Marques, Barbara Bruno Fagundes.
Avaliação de biomarcadores bucais e salivares em pacientes com COVID-19 / Barbara Bruno Fagundes. – 2022.
49 f.

Orientador: Eduardo Muniz Barretto Tinoco

Dissertação (mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Odontologia.

1. COVID-19. 2. Saliva - Imunologia. 3. Anticorpos. 4. Células epiteliais. 5. SARS-CoV-2. 6. Glicoproteína da espícula de Coronavírus. 7. Estudos de casos e controles. I. Tinoco, Eduardo Muniz Barretto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Odontologia. III. Título.

CDU
616.314

Bibliotecária: Adriana Caamaño CRB7/5235

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Barbara Bruno Fagundes Marques

Avaliação de biomarcadores bucais e salivares em pacientes com COVID-19

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Periodontia.

Aprovada em 07 de fevereiro de 2022.

Orientador:

Prof. Dr. Eduardo Muniz Barretto Tinoco
Faculdade de Odontologia – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Ricardo Guimaraes Fischer
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof.^a Dra. Maria Eliza Barbosa Ramos
Faculdade de Odontologia - UERJ

Prof. Dr. Márcio Eduardo Vieira Falabella
Universidade Federal de Juiz de Fora

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos aqueles que foram linha de frente contra a COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me manter firme para concluir esse trabalho, e aos meus pais pelo auxílio.

Ao meu noivo, Fabio Mathias, pela paciência em ter que lidar com a distância enquanto eu estava na linha de frente, por se fazer presente mesmo nesses momentos de isolamento social, e por todo incentivo durante esses anos.

Aos meus amigos, que mesmo em período de distanciamento sempre me incentivaram e torceram por mim.

Ao meu orientador, Eduardo Muniz Barretto Tinoco, que mesmo em meio a pandemia esteve sempre presente, sou imensamente grata pela confiança, paciência e incentivo no decorrer de todo o mestrado e por ter me dado a oportunidade de participar desse projeto de pesquisa extremamente enriquecedor.

Ao professor Ricardo Guimaraes Fischer, por todo auxílio, incentivo e por ser parte fundamental da grande equipe por trás desse projeto.

Ao professor Fabio Ramoa Pires, que abriu as portas do departamento de patologia e colaboraram imensamente para a conclusão desse trabalho.

Ao professor Josué da Costa Lima Junior, por abrir as portas da FIOCRUZ para que pudéssemos colaborar e desenvolver esse projeto.

À Taísa Coelho Guimarães, grande companheira de mestrado que esteve presente em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho, sendo parte fundamental do mesmo. Obrigada pela parceria nesse projeto desafiador, apoio e amizade, que tornaram esses 2 anos mais leves.

À toda equipe do Laboratório de Histocompatibilidade e criopreservação da UERJ, pela colaboração com o processamento e armazenamento das amostras.

À todas as instituições que nos ajudaram a concluir esse projeto, agradeço imensamente aos profissionais da Policlínica Piquet Carneiro, diretores e profissionais de saúde do Hospital Universitário Pedro Ernesto e toda a equipe do Hospital Municipal São José e a Prefeitura de Duque de Caxias que abriram suas portas para nos receber e ajudar na coleta das amostras necessárias.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ por conceder uma bolsa de estudos, que foi de fundamental importância para que o projeto fosse viável.

E por último, mas não menos importante, agradeço à todos os pacientes que dispuseram de seu tempo para participar da pesquisa.

Se não puder voar, corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje.

Mas, continue em frente de qualquer jeito.

Martin Luther King Jr

RESUMO

MARQUES, Barbara Bruno Fagundes. *Avaliação de biomarcadores bucais e salivares em pacientes com COVID-19*. 2022. 49 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Objetivo: os objetivos do presente estudo foram: a) avaliar os aspectos morfológicos das células epiteliais do dorso da língua e a expressão da proteína Spike do SARS-CoV-2 nessas células, em pacientes com e sem COVID-19; b) avaliar também a presença e níveis de IgG e IgA em saliva de pacientes controle de antes da pandemia, negativos e convalescentes para COVID-19. Métodos: indivíduos com pelo menos um sintoma de COVID-19 foram recrutados. Pacientes com teste positivo para COVID-19 por RT-PCR foram incluídos no grupo caso e os com teste negativo foram incluídos no grupo controle para avaliar a expressão de proteína spike. Esfregaços citológicos do dorso da língua foram obtidos dos pacientes e analisadas por imunohistoquímica dirigida contra a proteína Spike do SARS-CoV-2. As alterações morfológicas nas células epiteliais foram analisadas em microscopia de luz. Já na avaliação de anticorpos, os participantes do estudo foram divididos em 4 grupos, Grupo 1 - Pré-COVID-19, Grupo 2 – Negativo, Grupo 3 - Convalescente <1 mês, e Grupo 4 - Convalescente >3 meses. As amostras de saliva foram coletadas pelo próprio paciente em coletor universal estéril. IgG total humano e IgA presente na saliva foram testados usando ELISA indireto contra proteína S1 recombinante humana do SARS-CoV-2. Resultados: A imunohistoquímica mostrou que 71% dos pacientes com COVID-19 apresentavam células epiteliais positivas para a presença da proteína Spike do SARS-CoV-2, e todas as células provenientes de pacientes do grupo controle foram negativas. A análise citológica mostrou diferenças significativas ao comparar células epiteliais de pacientes positivos e negativos para COVID-19. Na avaliação salivar através de ELISA observou-se que apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos com amostras coletadas após o início da pandemia, o grupo 3 foi o grupo com níveis mais elevados de IgG e IgA, os grupos 4 e 2 também expressaram IgG e IgA, porém em menor proporção. Contudo, foram observadas diferenças significativas nos níveis de IgG nos grupos 2, 3 e 4 em comparação ao grupo 1. Com relação aos níveis de IgA, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos. Houve um percentual significativamente maior de indivíduos positivos para IgG e IgA contra Sars-Cov-2 na saliva nos pacientes convalescentes de COVID-19 do que nos controles. Conclusão: COVID-19 pode gerar alterações dimensionais nas células epiteliais da língua; entretanto, mais estudos são necessários para entender como isso acontece. A utilização da saliva como método não-invasivo para coleta de amostras biológicas tem se mostrado uma ferramenta útil e promissora, capaz de revelar exposições prévias ao vírus.

Palavras-chave: COVID-19. Saliva. Células epiteliais. Anticorpos. Sars-Cov-2.

ABSTRACT

MARQUES, Barbara Bruno Fagundes. *Evaluation of oral and salivary biomarkers in patients with COVID-19*. 2022. 49 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

Objective: The objectives of the present study were: a) to evaluate the morphological aspects of the tongue dorsum epithelial cells and the expression of the Spike SARS-CoV-2 protein in these cells, in patients with and without COVID-19; b) also evaluate the presence and levels of IgG and IgA in the saliva of control patients before the pandemic, negative and convalescent for COVID-19. **Methods:** individuals with at least one symptom of covid-19 were recruited from. Patients testing positive for covid-19 by RT-PCR were included in the case group and those testing negative were included in the control group to assess spike protein expression. Cytological smears from the dorsum of the tongue were obtained from the patients and analyzed by immunohistochemistry directed against the spike protein of Sars-Cov-2. Morphological changes in epithelial cells were analyzed under light microscopy. In the assessment of antibodies, the study participants were divided into 4 groups, Group 1 - Pre-COVID-19, Group 2 - Negative, Group 3 - Convalescent <1 month, and Group 4 - Convalescent >3 months. Saliva samples were collected by the patient himself in a steril universal collector. Igg and iga present in saliva were tested using indirect elisa against recombinant human sars-cov-2 s1 protein. **Results:** Immunohistochemistry showed that 71% of patients with COVID-19 had epithelial cells positive for the presence of the SARS-CoV-2 Spike protein, and all cells from patients in the control group were negative. Cytological analysis showed significant differences when comparing epithelial cells from COVID-19 positive and negative patients. In the salivary evaluation through ELISA, it was observed that although there were no statistically significant differences between the groups with samples collected after the beginning of the pandemic, group 3 was the group with the highest levels of IgG and IgA, groups 4 and 2 also expressed IgG and IgA, but in a smaller proportion. However, significant differences were observed in IgG levels in groups 2, 3 and 4 compared to group 1. Regarding IgA levels, there was no significant difference in antibody levels. There was a significantly higher percentage of individuals positive for IgG and IgA against Sars-Cov-2 in saliva in patients convalescent from COVID-19 than in controls. **Conclusion:** COVID-19 can generate dimensional changes in tongue epithelial cells; however, more studies are needed to understand how this happens. The use of saliva as a non-invasive method for collecting biological samples has shown to be a useful and promising tool, capable of revealing previous exposures to the virus.

Keywords: COVID-19. SALIVA. Epithelial cells. Antibodies. Sars-Cov-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Células epiteliais de dorso de língua	21
Figura 2 –	Células epiteliais do dorso da língua grupos caso e controle.....	22
Gráfico 1 –	Níveis de IgG salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4.....	43
Gráfico 2 –	Níveis de IgA salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4.....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Status demográfico e clínico dos pacientes avaliados para expressão da proteína Spike SARS-CoV-2 no dorso da língua.....	35
Tabela 2 –	Comparação das medidas citológicas de acordo com a infecção por COVID-19 e expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike.....	37
Tabela 3 –	Porcentagem de pacientes reativos e não-reativos a IgG e IgA em amostras de saliva	38
Tabela 4 -	Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2	Enzima conversora de angiotensina 2
CDC	Centro de controle de prevenção de doenças
COVID-19	Doença por Corona Vírus 2019
DLR	Domínio de ligação ao receptor
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FGC	Fluído gengival crevicular
HCl	Ácido clorídrico
IgA	Imunoglobulina A
IgG	Imunoglobulina G
PBS	Tampão fosfato-salino
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	Transcriptase reversa - reação em cadeia da polimerase
Sars-Cov-2	Síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2
SDRA	síndrome do desconforto respiratório agudo
TMPRSS2	Protease transmembrana serina 2
T-PBS	Tampão fosfato-salino com detergente não-iônico Tween

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	MATERIAIS E MÉTODOS	17
1.1	Células epiteliais do dorso da língua	17
1.1.1	<u>Desenho e amostra do estudo</u>	17
1.1.2	<u>Análise citológica e imuno-histoquímica</u>	18
1.2	Anticorpo anti-Sars-Cov-2 em saliva	18
1.2.1	<u>Desenho e amostra do estudo</u>	18
1.2.2	<u>Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)</u>	19
1.3	Análise estatística	20
1.3.1	<u>Células epiteliais do dorso da língua</u>	20
1.3.2	<u>Anticorpo anti-Sars-Cov-2 em saliva</u>	20
2	RESULTADOS	21
2.1	Células epiteliais do dorso da língua	21
2.2	Anticorpo Anti-Sars-Cov-2 em saliva	23
3	DISCUSSÃO	25
3.1	Células epiteliais do dorso da língua	25
3.2	Anticorpo Anti-Sars-Cov-2 em saliva	26
	CONCLUSÃO	29
	REFERÊNCIAS	30
	APÊNDICE A - Status demográfico e clínico dos pacientes avaliados para expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike no dorso da língua.....	35
	APÊNDICE B - Comparação das medidas citológicas de acordo com a infecção por COVID-19 e expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike.....	37

APÊNDICE C – Porcentagem de pacientes reativos e não-reativos a IgG e IgA em amostras de saliva.....	38
APÊNDICE D - Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva.....	39
APÊNDICE E – Níveis de IgG salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4.....	43
APÊNDICE F – Níveis de IgA salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4	44
ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa.....	45
ANEXO B – Artigo - Morphological alterations in tongue epithelial cells infected by SARS- CoV- 2: A case-control study.....	49

INTRODUÇÃO

Desde dezembro de 2019, quando a doença COVID-19 foi inicialmente relatada na China, ela vem se espalhando mundialmente, com mais de 296 milhões de casos confirmados e mais de 5 milhões de mortes relatadas globalmente (em 06 de janeiro de 2022)^{1,2}.

O patógeno foi reconhecido como um novo beta-coronavírus de RNA envelopado³ e no presente momento é conhecido como síndrome respiratória aguda grave de coronavírus 2 (SARS-CoV-2), que tem uma semelhança filogenética com o SARS-CoV⁴. Coronavírus são vírus de RNA envelopados extensivamente distribuídos entre humanos, outros mamíferos e aves e que causam doenças agudas e crônicas respiratórias, entéricas, hepáticas e neurológicas⁵.

Os ensaios em tempo real fundamentados na transcriptase reversa - reação em cadeia polimerase (RT-PCR) realizados em amostras respiratórias são o padrão ouro para o diagnóstico de COVID-19. Contudo, novas tecnologias estão surgindo rapidamente com alta sensibilidade e especificidade. Apesar de existirem inúmeras técnicas diagnósticas para pacientes sintomáticos, ainda existem lacunas para diagnóstico de pacientes assintomáticos que estão na fase de incubação do vírus, bem como na determinação da inexistência da presença de vírus viáveis de infecção, para se tomar a decisão de encerrar o isolamento⁶.

Os sintomas causados pela infecção por SARS-CoV-2 são os mais variáveis possíveis, e vão desde rinite leve, febre, tosse ou diarreia até pneumonia e síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA). Foi também exposto que os sintomas digestivos podem ocorrer na ausência de qualquer sintoma respiratório típico⁷.

Hoje sabe-se que a maior parte da transmissão de vírus respiratórios ocorre a partir de gotículas infectadas grandes produzidas pela tosse, espirro e respiração próximos de outra pessoa, e esse entendimento fez com que as autoridades em saúde estabelecessem o distanciamento social como medida protetiva a COVID-19. Em outubro de 2020 o CDC indicou evidências que a transmissão pode ocorrer devido a exposição aérea ao vírus, e se a transmissão via gotícula e aérea são as principais rotas de contágio, o risco de infecção pode ser muito menor onde se tem melhor ventilação⁸.

A saliva é uma combinação da secreção das glândulas salivares e transudato dos capilares abaixo dos tecidos periodontais, o chamado fluido gengival crevicular

(FGC), que flui constantemente da fenda entre a margem gengival e os dentes, esse fluído é um exsudato sérico que sustenta todos os principais componentes moleculares (componentes complementares e anticorpos) e celulares (neutrófilos e células plasmáticas) da resposta imune⁹⁻¹⁴.

Para um hospedeiro suscetível desenvolver a infecção, gotículas infecciosas de saliva podem entrar na boca, nos olhos ou ser inalados diretamente nos pulmões¹⁵. Xu et al.¹⁶ descreveram que o domínio de ligação ao receptor do SARS-CoV-2 tem uma forte interação com moléculas ACE2 humanas, e esta descoberta sugere que as células que expressam ACE2 podem atuar como alvos e são suscetíveis a infecção por SARS-CoV-2¹⁷. Dados anteriores mostraram que ACE2 é expresso na mucosa oral, principalmente nas células epiteliais da língua e glândulas salivares, estando assim o vírus presente na saliva^{18,19}. Gotículas de saliva contém microrganismos e a quantidade, distância e tamanho das gotículas de saliva variam entre os indivíduos, indicando que a intensidade infecciosa e a rota de transmissão das gotículas de saliva diferem quando o mesmo patógeno é contraído¹⁵.

Além do receptor ACE2, foi demonstrado que outras proteínas, como a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) e a endopeptidase Furin, são importantes para a infecção^{20,21}. Enquanto a TMPRSS2 é expressa no epitélio escamoso estratificado queratinizado do dorso da língua, a Furin foi expressa principalmente na camada basal do epitélio escamoso estratificado²².

Foi descoberto que o SARS-CoV-2 era o único no subtipo B β -CoV que contém o local do decote da Furin, e que a expressão da Furin está distribuída em diversos órgãos com pouca diferença no nível de expressão, o que não ocorre com o ACE2, que tem maiores níveis de expressão no intestino delgado e duodeno. Combinada com o possível mecanismo de infecção do SARS-CoV-2, a distribuição generalizada da Furin aumenta a infecção pelo SARS-CoV-2 de outros órgãos. A possibilidade de ataque de órgãos é consistente com os múltiplos sintomas clínicos observados na COVID-19²⁰. Contudo, no meio ambiente oral a localização da Furin foi observada nas partes mais profundas do epitélio escamoso estratificado, e não na camada superficial. Portanto, pode-se inferir que o TMPRSS2 tem um papel maior na infecção. A coexpressão ACE2 – TMPRSS2 é um alvo potencial para infecção por SARS-CoV-2²³ e as células epiteliais escamosas do dorso da língua tem risco potencial de infecção por SARS-CoV-2²².

Com isso, os objetivos desse estudo foram:

- avaliar os aspectos morfológicos das células epiteliais do dorso da língua e a expressão da proteína Spike SARS-CoV-2 nessas células, em pacientes com e sem infecção por COVID-19.

- avaliar a presença e níveis de IgA e IgG anti-Sars-Cov-2 através de ELISA em amostras de saliva em pacientes negativos para COVID-19, e convalescentes em 2 pontos de tempo diferentes com 3 meses de intervalo e em comparação com amostras de saliva de pacientes saudáveis antes da pandemia.

1 MATERIAIS E MÉTODOS

O relato deste estudo segue as diretrizes do STROBE (Elm et al., 2007). O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário Pedro Ernesto (CAAE-31222820.6.0000.5259), todos indivíduos incluídos no estudo deram consentimento por escrito para participar, e o estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinque (World Medical Association, 2013).

1.1 Células epiteliais do dorso da língua

1.1.1 Desenho e amostra do estudo

O cálculo do tamanho da amostra foi feito usando o software EPI Info TM (Centros para Controle e Prevenção de Doenças, Atlanta, GA, EUA) e foi baseado nas seguintes estimativas: erro α de 0,05; erro β de 0,20 (potência de 80%). A frequência da expressão da proteína Spike SARS-CoV-2 em pacientes COVID-19 + foi arbitrariamente fixada em 90% e no grupo controle em 25%. Assumindo um desenho de estudo caso-controle incomparável com grupos de tamanhos iguais, essas estimativas na equação geram um tamanho de amostra de 20 indivíduos (10 por grupo).

Este é um estudo caso-controle. Vinte e quatro indivíduos foram recrutados entre pacientes internados no Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro, Brasil). Todos eles apresentavam pelo menos um sintoma de COVID-19 (febre, tosse, dor de cabeça, dor de garganta, diarreia ou perda do paladar / olfato). Quatorze desses participantes testaram positivo para COVID-19 pelo ensaio RT-PCR (kit SARS-CoV-2 Bio-Manguinhos, Rio de Janeiro, Brasil) e foram incluídos no grupo de caso, e 10 dos participantes tiveram resultado negativo e foram incluídos no grupo de controle. A Tabela 1 (APÊNDICE A) mostra dados demográficos e clínicos, como idade, sexo, tabagismo, distribuição dos sintomas, estado clínico e etnia dos indivíduos dos grupos caso e controle.

1.1.2 Análise citológica e imuno-histoquímica

Um esfregaço citológico contendo células epiteliais superficiais do dorso da língua por raspagem com espátula foi obtido de todos os pacientes. As células foram distendidas em seis lâminas histológicas de vidro para cada paciente e fixado em álcool 95°. Os esfregaços foram corados com hematoxilina e eosina e Papanicolaou, e uma lâmina histológica de cada paciente foi submetida à imuno-histoquímica dirigido contra a proteína Spike do SARS-CoV-2 (anticorpo monoclonal de camundongo anti-SARS-CoV-2 proteína Spike, clone 1A9, Invitrogen, Massachusetts, EUA, diluição 1: 200) através da técnica de imunoperoxidase seguida por diaminobenzidina como cromógeno e contracoloração com Carazzi hematoxilina. Os esfregaços corados com hematoxilina e eosina e Papanicolaou foram analisados por dois examinadores (BM e TG) usando microscopia de luz em alta potência, e duas células epiteliais descamadas de cada paciente foram medidas em quatro planos: diâmetro máximo da célula, perpendicular máxima a esta medida, diâmetro máximo do núcleo e perpendicular máxima a esta medida. Todas as medidas foram realizadas por meio do software Image J (NIH, Bethesda, MD, EUA). Todas as lâminas imunohistoquímicas foram analisadas por um único patologista oral (FRP) e interpretadas como positivas ou negativas para a presença da proteína Spike do SARS-CoV-2.

1.2 **Anticorpo anti-Sars-Cov-2 em saliva**

1.2.1 Desenho e amostra do estudo

Este estudo é um estudo descritivo transversal, que conta com 52 amostras de saliva de 44 pacientes. Vinte pacientes internados no Hospital Municipal São José (Duque de Caxias, RJ - Brasil) em decorrência da COVID-19 foram recrutados, mas que no momento da coleta de saliva não apresentavam mais RT-PCR positivo para a doença, 15 pacientes que voluntariamente procuraram atendimento na

Policlínica Piquet Carneiro (Rio de Janeiro, Rio de Janeiro - Brasil) para realização do teste RT-PCR e que tiveram resultado negativo, 9 pacientes que tiveram sua saliva coletada antes do início da pandemia de COVID-19 e foram armazenados na Faculdade da Odontologia da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, e 8 pacientes que foram positivos que retornaram após 3 meses de doença para nova coleta de saliva. Os participantes do estudo foram então divididos em 4 grupos, Grupo 1 - Pré-COVID-19, Grupo 2 – Negativo, Grupo 3 - Convalescente <1 mês, e Grupo 4 - Convalescente >3 meses. As amostras de saliva foram coletadas pelo próprio paciente em coletor universal estéril, utilizando-se a técnica de saliva não estimulada.

1.2.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

IgG total humano e IgA presente na saliva foram testados usando ELISA indireto contra proteína S1 recombinante humana do SARS-CoV-2 (Acrobiosystems, cat. S1N-C52H3). Resumidamente, placas de 96 poços MaxiSorp (Nunc, Rochester, NY, EUA) foram revestidas com PBS contendo 100 ng/poço de proteína recombinante. Após incubação durante a noite a 4° C, as placas foram lavadas com PBS-Tween 0,05% (T-PBS) e bloqueadas por 1 h a 37° C com PBS 5% de leite em pó desnatado (PBS-5% M). Amostras de saliva humana, pré-centrifugadas a 15000 rpm por 10 minutos, foram diluídas cinco vezes em PBS-5% M e adicionadas em poços duplicados. Após 1 h a 37° C, e três lavagens de T-PBS, os anticorpos ligados foram detectados usando IgG de cabra anti-humano conjugado com peroxidase (SIGMA; 1: 2500 diluição) ou IgA anti-humano de cabra conjugado com peroxidase (SIGMA, diluição 1: 1000) foram incubados por 1 hora a 37°C e seguido da adição de 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina durante 30 minutos. A reação foi interrompida com HCl 1M (Merck) e a densidade óptica foi medida a 450 nm usando um espectrofotômetro de microplaca SpectraMax (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os anticorpos IgG ou IgA totais contra a glicoproteína spike SARS-CoV-2 humana recombinante presente em amostras de saliva humana foram calculados interpolando a média do valor de densidade óptica da amostra de saliva em um

gráfico de regressão linear de diluição de curva padrão de IgG ou IgA (variando de 0,500 a 0,031 µg/mL) realizado usando as mesmas condições descritas acima.

1.3 Análise Estatística

1.3.1 Células epiteliais do dorso da língua

Os dados foram analisados usando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics 20, IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). Depois de verificar se os dados não tinham distribuição normal, o teste não paramétrico de Mann-Whitney (U) foi usado. O nível de significância foi estabelecido em 0,05.

1.3.2 Anticorpo anti-Sars-Cov-2 em saliva

Os dados foram analisados usando o Statistical Package for the Social Sciences (SPSS Statistics 20, IBM Corporation, Armonk, NY, EUA). Após verificação de que os dados não apresentavam distribuição normal, foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com teste post hoc de Dunn. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. O teste Qui-quadrado também foi realizado para avaliar a relação entre os níveis de IgG e IgA e os sintomas apresentados pelos pacientes, e também para comparar possíveis divergências entre as frequências observadas de indivíduos reativos e não-reativos a IgG e IgA.

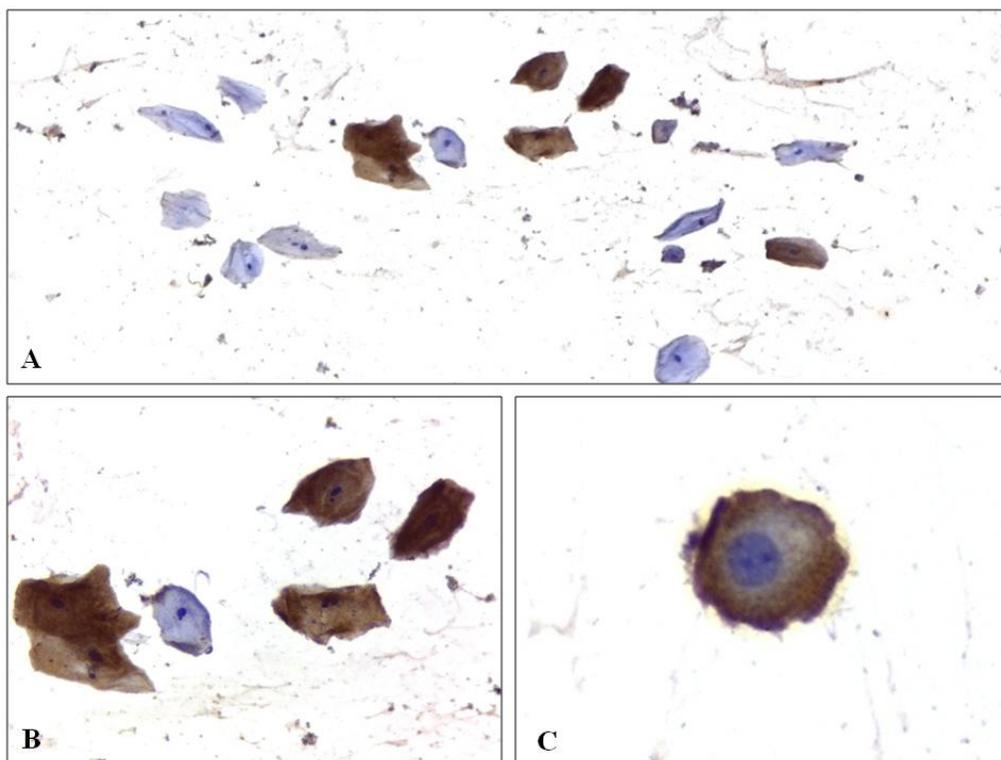
2 RESULTADOS

2.1 Células epiteliais do dorso da língua

Um coeficiente de correlação intraclasse para determinar a concordância entre os dois examinadores (BM e TG) nos quatro planos medidos foi calculado e variou de 0,97 a 0,99.

A análise citológica mostrou diferenças significativas em todas as medidas ao comparar células epiteliais descamadas derivadas de pacientes COVID-19-positivos e COVID-19-negativos, apresentadas na tabela 2 (APÊNDICE B). A imunistoquímica mostrou que 10 dos 14 (71%) dos pacientes com COVID-19 apresentaram células epiteliais positivas para a presença da proteína Spike SARS-CoV-2 e todas as células provenientes dos pacientes do grupo controle foram negativas (Figura 1).

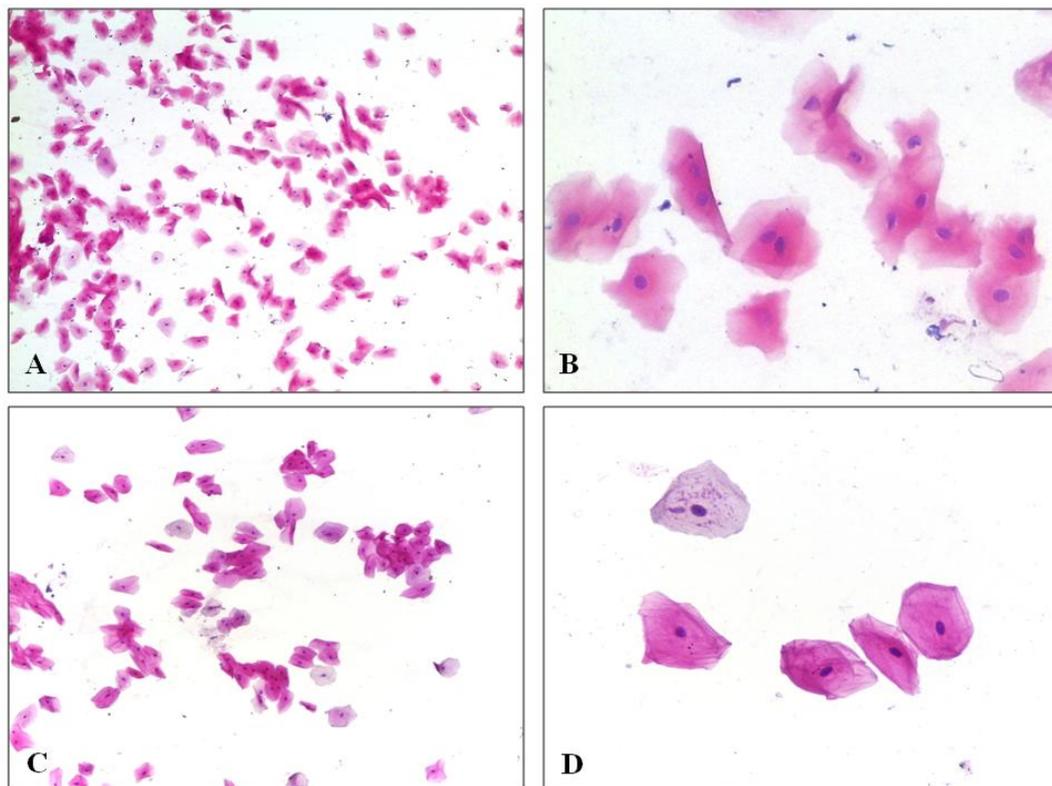
Figura 1 – Células epiteliais de dorso de língua



Legenda: Imunoexpressão da proteína Spike em células epiteliais descamadas da língua.
Fonte: A autora, 2021.

Ao comparar as medidas celulares e nucleares em células obtidas de pacientes COVID-19 expressando (10 pacientes) ou não (4 pacientes) a proteína Spike do SARS-CoV-2, não foram encontradas diferenças significativas. Em contraste, ao comparar as células obtidas de pacientes COVID-19 que expressam a proteína Spike do SARS-CoV-2 com células de todos os outros pacientes que não expressam a proteína Spike do SARS-CoV-2 (14 pacientes), o diâmetro perpendicular máximo da célula foi maior no segundo grupo, enquanto nenhuma diferença foi encontrada para as outras três medidas (Figura 2). Nenhuma outra alteração morfológica sugestiva de infecção viral (como multinucleação, hiperchromatismo nuclear e vacuolização) foi observada em células obtidas de pacientes com COVID e em células que expressam a proteína Spike do SARS-CoV-2. Nenhuma lesão intraoral foi observada nesta população.

Figura 2 – Células epiteliais do dorso da língua grupos caso e controle



Legenda: Características citológicas de células epiteliais descamadas da língua derivadas de um paciente infectado com COVID-19 (grupo de teste). (2a, ampliação 100x; 2b, ampliação 400x) em comparação com células epiteliais descamadas da língua derivadas de um paciente não infectado por COVID-19 (grupo de controle) (2c, ampliação 100x; 2d, ampliação 400x). Fonte: A autora, 2021.

Neste estudo, a origem étnica, o sexo, a proporção de tabagistas e a distribuição dos sintomas foram semelhantes nos dois grupos. No entanto, a média de idade do grupo controle foi menor (34,9 anos) do que no grupo caso (55,4 anos), o que pode ter atuado como um fator de confusão.

2.2 Anticorpo anti-Sars-Cov-2 em saliva

O teste de Kruskal-Wallis foi usado para fazer comparações múltiplas entre os níveis de IgG e IgA salivar (representados pelo índice de reatividade) para Sars-Cov-2 nos 4 grupos e mostrar se haviam diferenças significativas entre eles.

Apesar de não haver diferenças estatisticamente significantes entre os grupos nas amostras coletadas após o início da pandemia, o grupo 3 apresentou níveis mais elevados de IgG e IgA (Gráficos 1 e 2), seguido dos grupos 4 e 2 em níveis menores. O grupo 1 não apresentou níveis detectáveis de anticorpos contra Sars-Cov-2. Na comparação entre pares, pode-se observar que as diferenças significativas nos níveis de IgG são encontradas entre o Grupo 1 e os três outros grupos ($p = 0,000$).

Com relação aos níveis de IgA, não houve diferença significativa nos níveis de anticorpos ($p = 0,055$).

Avaliando os níveis das imunoglobulinas, observamos que há 3 indivíduos considerados “outliers” ou “fora da curva” no grupo 2 IgG e 2 indivíduos no grupo 2 IgA, o que sugere fortemente que os mesmos foram previamente expostos ao patógeno e desenvolveram uma resposta imune.

Dentre os indivíduos com níveis de IgG detectáveis no grupo 4 todos apresentaram o sintoma dor de cabeça ($p < 0,05$), enquanto os outros grupos e sintomas não mostraram nenhuma correlação significativa.

Houve um percentual significativamente maior de indivíduos reativos para IgG e IgA salivar nos grupos 3 e 4 quando comparados com os grupos 2 e 1 ($p < 0,05$).

A Tabela 3 (APÊNDICE C) mostra a Porcentagem de pacientes reativos e não-reativos a IgG e IgA em amostras de saliva e a tabela 4 (APÊNDICE D) mostra o status clínico desses pacientes. O teste Qui-quadrado demonstrou que não há diferenças estatisticamente significante entre os grupos.

Neste estudo, a proporção de tabagistas e a distribuição dos sintomas foram semelhantes entre os grupos. No entanto, a distribuição de indivíduos de sexo masculino foi maior nos grupos 2 e 4, enquanto o sexo feminino foi mais prevalente no grupo 3 ($p < 0,00$), e a média de idade do grupo 2 foi menor (39,9 anos) do que nos grupos 3 (57,5 anos) e 4 (48,1 anos), o que pode ter atuado como um fator de confusão.

3 DISCUSSÃO

3.1 Células epiteliais do dorso da língua

Neste estudo, as alterações morfológicas nas células epiteliais foram particularmente associadas à positividade do ensaio RT-PCR em swabs nasofaríngeos, uma vez que esse método é o padrão ouro para o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2⁶ e é uma técnica de detecção muito mais sensível do que a imunohistoquímica. É possível que a menor sensibilidade do ensaio imunohistoquímico possa ter influenciado os resultados.

A expressão de ACE2, furina e TMPRSS2 foi demonstrada em células epiteliais da língua, o que reforça a perspectiva de que a mucosa oral, e especificamente esta região anatômica, é uma via de acesso à infecção por SARS-CoV-2²⁴. Foi sugerido que essas características explicariam o mecanismo da disgeusia nesses pacientes e também que a remoção da saburra lingual reduziria o risco de exposição ao vírus²².

Os resultados deste estudo mostraram que a presença da proteína Spike do SARS-CoV-2 pode ser demonstrada em células epiteliais descamadas do dorso da língua, um dos modelos de doença baseados em células para COVID-19²⁵. Também foi demonstrado que as células epiteliais obtidas do dorso da língua de pacientes COVID-19-positivos apresentam alterações morfológicas quando comparadas com pacientes COVID-19-negativos, embora não tenham sido observadas alterações morfológicas classicamente associadas a outras infecções virais, como demonstrado anteriormente²⁶.

Existem poucas informações publicadas sobre alterações citológicas em tipos epiteliais, endoteliais e outros tipos celulares associadas à presença do vírus SARS-CoV-2. Alterações morfológicas também observadas em outras infecções virais, como a presença de queratinócitos multinucleados e / ou balonados, células acantolíticas, células descamadas, citoplasma granular anfófilico, núcleos hipercromáticos, bem como células apoptóticas, algumas delas com membrana de células de hialina, foram descrito em lesões cutâneas e pulmonares associadas à infecção pelo vírus SARS-CoV-2^{27,28}. Os presentes resultados mostraram que as

células epiteliais da mucosa oral de pacientes infectados com SARS-CoV-2 não apresentaram alterações morfológicas tipicamente associadas a infecções virais. No entanto, eles mostraram menor diâmetro celular e nuclear quando comparados com pacientes não infectados com SARS-CoV-2. Como essas alterações morfológicas são descritas durante as fases iniciais da apoptose, estudos adicionais com amostras maiores são encorajados a analisar sua relação com a presença de SARS-CoV-2 em células epiteliais da mucosa oral normal.

3.2 Anticorpos anti-Sars-Cov-2 em saliva

Sabe-se que atualmente a maior parte da transmissão de vírus respiratórios ocorre a partir de gotículas infectadas de fluídos corporais produzidas pela tosse, espirro e respiração próximos de outra pessoa. A expressão de ACE2, furina e TMPRSS2, moléculas que favorecem a entrada do vírus no corpo humano, foi demonstrada em diversos tecidos orais²⁹, o que possibilita a entrada do vírus na cavidade oral. Muitos estudos mostraram que o escarro é superior aos cotonetes nasofaríngeos na detecção da infecção pelo SARS-CoV-2, e vários relatórios preliminares mostraram que a carga viral na saliva é comparável à do escarro. Além disso, a coleta de saliva é minimamente invasiva e pode ser auto-administrada. Assim sendo, a saliva passou a ser considerada para a realização de testes diagnósticos de Sars-Cov-2 ativos e anteriores^{30,31}.

Através do FGC a IgG e IgM entram na cavidade oral, mas se encontram presentes em concentrações mais baixas na saliva³², já a IgA, é do conhecimento comum que a saliva contém IgA mucosa ou secretora (sIgA)⁹. Anticorpos SARS-CoV-2 na saliva servem como primeira linha de defesa contra o vírus. Eles estão presentes na mucosa após uma infecção recuperada e também após a vacinação³³. Os anticorpos desempenham um papel considerável na neutralização do vírus e oferecem proteção ao hospedeiro contra a reinfeção viral. A resposta de anticorpos à infecção por SARS-CoV-2 foi amplamente estudada no sangue (soro, plasma) de pacientes com COVID-19, com objetivo de obter noções sobre a resposta imune do hospedeiro. Os níveis de anticorpos para a proteína Spike são particularmente significativos, uma vez que esta glicoproteína trimérica abriga o domínio de ligação

ao receptor (DLR). O DLR simplifica o acesso do SARS-CoV-2 às células humanas ao se ligar ao seu contra-receptor da enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2)³⁴ e os anticorpos neutralizantes demonstraram ter como alvo o DLR³⁵. Isho et al, fornecem evidências de que a resposta do IgG a proteína spike da SARS-CoV-2 em saliva refletem as observadas em soro e persiste na saliva e no soro por pelo menos 3 meses na maioria dos pacientes³⁶, o que também foi observado em nosso estudo. Pinila et al. demonstraram que mesmo após 6 meses ainda é possível observar resposta de IgG em saliva³³. Outros estudos também demonstraram que o teste de IgG contra SARS-CoV-2 é possível em amostras de saliva, fornecendo uma opção fácil e não invasiva para detecção de infecção anterior, oferecendo assim uma alternativa aos ensaios à base de soro para entender a capacidade protetora conferida pela resposta imune adaptativa da infecção viral e da vacinação contra futuras reinfecções³⁷⁻³⁹, o que foi igualmente demonstrado em nosso trabalho de análise salivar.

Apesar da sIgA ser comumente observada na saliva, ela foi detectada em menor quantidade do que a IgG em nossos experimentos, de forma semelhante ao estudo de Martínez-Fleta et al, onde apenas um a cada doze indivíduos com Sars-Cov-2 reagem a IgA⁴⁰. Embora o IgA seja a principal imunoglobulina para imunidade mucosa, a evidência de SARS-CoV-2 específica de IgA em saliva ainda é inconsistente. Em comparação com o IgG, o sIgA é menos correlacionado com a IgA do soro⁴¹. Corroborando com nossos achados, outros estudos mostraram uma menor sensibilidade para a IgA detectar pacientes RT-PCR positivos em comparação com a IgG^{37,38}. Por outro lado, Sterlin et al. demonstraram que concentrações de IgA permaneceram por mais tempo em saliva do que em soro, e que mesmo 49 a 73 dias após o início dos sintomas, ainda existia atividade de IgA contra Sars-Cov-2 em saliva⁴². No presente estudo a presença de IgA em saliva também foi demonstrada mesmo após 3 meses da infecção por COVID-19. Sterlin et al. demonstraram que a neutralização do SARS-CoV-2 está mais correlacionada com o IgA do que com IgG nas primeiras semanas após o início dos sintomas, e que as concentrações de IgA foram maiores que as do IgG na saliva⁴², achado esse, que corrobora com os resultados de Dobaño et al.⁴³, que observou maior presença de IgA do que a de IgG, o que difere dos resultados do presente estudo.

O tamanho reduzido da amostra pode ter influenciado os resultados do presente estudo limitando o poder do mesmo. Variações inter-individuais na

resposta imune também podem ter influenciado as diferenças encontradas nos diferentes estudos.

Infecções potenciais que foram detectadas pelo anticorpo na saliva, mas não pelo RT-PCR, podem estar relacionadas a exposição a cargas virais mais baixas em assintomáticos e em crianças⁴³. Nossos resultados mostram que indivíduos do grupo 2 (COVID-19 Negativo) que apresentaram níveis detectáveis de anticorpos, mas tiveram resultado de RT-PCR negativo para COVID-19, provavelmente foram expostos ao patógeno e desenvolveram uma resposta imune. A utilização da saliva como método não-invasivo para coleta de amostras biológicas tem se mostrado uma ferramenta útil e promissora, capaz de revelar exposições prévias ao vírus.

CONCLUSÃO

A COVID-19 parece gerar mudanças dimensionais em células epiteliais da língua; entretanto, mais estudos são necessários para entender como isso ocorre. Houve um percentual significativamente maior de indivíduos positivos para IgG e IgA contra Sars-Cov2 na saliva nos pacientes convalescentes de COVID-19 do que nos controles sugerindo que a utilização da saliva como método não-invasivo e de fácil aceitação pelos pacientes é uma alternativa útil e promissora na testagem da população.

REFERÊNCIAS

1. Guan W, Ni Z, Hu Y, Liang W, Ou C, He J, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Apr 30 [cited 2020 Oct 12];382(18):1708–20. Available from: [/pmc/articles/PMC7092819/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37073260/)
2. WHO. Coronavirus disease (COVID-19) Global epidemiological situation. 2021.
3. Lu R, Zhao X, Li J, Niu P, Yang B, Wu H, et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet* [Internet]. 2020 Feb 22 [cited 2020 Oct 12];395(10224):565–74. Available from: [/pmc/articles/PMC7159086/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
4. Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J, et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med* [Internet]. 2020 Feb 20 [cited 2020 Oct 12];382(8):727–33. Available from: [/pmc/articles/PMC7092803/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
5. Weiss SR, Leibowitz JL. Coronavirus pathogenesis. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press Inc.; 2011 [cited 2020 Oct 12]. p. 85–164. Available from: [/pmc/articles/PMC7149603/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
6. Younes N, Al-Sadeq DW, AL-Jighefee H, Younes S, Al-Jamal O, Daas HI, et al. Challenges in laboratory diagnosis of the novel coronavirus SARS-CoV-2 [Internet]. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020 [cited 2020 Oct 13]. Available from: [/pmc/articles/PMC7354519/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
7. Nuccetelli M, Pieri M, Gisone F, Bernardini S. Combined anti-SARS-CoV-2 IgA, IgG, and IgM Detection as a Better Strategy to Prevent Second Infection Spreading Waves. *Immunol Invest* [Internet]. 2020 [cited 2020 Oct 12];1–13. Available from: [/pmc/articles/PMC7544959/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
8. The Lancet Respiratory Medicine. COVID-19 transmission—up in the air [Internet]. Vol. 8, *The Lancet Respiratory Medicine*. Lancet Publishing Group; 2020 [cited 2021 Jun 2]. p. 1159. Available from: [/pmc/articles/PMC7598535/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37375296/)
9. Madar R, Straka S, Baska T. Detection of antibodies in saliva- -an effective auxiliary method in surveillance of infectious diseases. *Bratisl Lek Listy*. 2002;103(1):38–41.
10. Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva [Internet]. Vol. 70, *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard; 2016 [cited 2020 Oct 8]. p. 7–10. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26662478/>
11. Perry KR, Brown DWG, Parry J V., Panday S, Pipkin C, Richards A. Detection of measles, mumps, and rubella antibodies in saliva using antibody capture radioimmunoassay. *J Med Virol* [Internet]. 1993 [cited 2020 Oct 8];40(3):235–40. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8355022/>

12. Major CJ, Read SE, Coates RA, Francis A, McLaughlin BJ, Millson M, et al. Comparison of saliva and blood for human immunodeficiency virus prevalence testing. *J Infect Dis* [Internet]. 1991 [cited 2020 Oct 8];163(4):699–702. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2010625/>
13. Parry J V., Perry KR, Mortimer PP. SENSITIVE ASSAYS FOR VIRAL ANTIBODIES IN SALIVA: AN ALTERNATIVE TO TESTS ON SERUM. *Lancet* [Internet]. 1987 Jul 11 [cited 2020 Oct 8];330(8550):72–5. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2885575/>
14. Mortimer PP, Parry J V. Non-invasive virological diagnosis: Are saliva and urine specimens adequate substitutes for blood? *Rev Med Virol* [Internet]. 1991 Jun 1 [cited 2020 Oct 8];1(2):73–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/rmv.1980010204>
15. Baghizadeh Fini M. Oral saliva and COVID-19 [Internet]. Vol. 108, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2020 [cited 2021 Jun 2]. p. 104821. Available from: </pmc/articles/PMC7250788/>
16. Xu X, Chen P, Wang J, Feng J, Zhou H, Li X, et al. Evolution of the novel coronavirus from the ongoing Wuhan outbreak and modeling of its spike protein for risk of human transmission [Internet]. *Science China Life Sciences* Science in China Press; Mar 1, 2020 p. 457–60. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7089049/>
17. Zou X, Chen K, Zou J, Han P, Hao J, Han Z. Single-cell RNA-seq data analysis on the receptor ACE2 expression reveals the potential risk of different human organs vulnerable to 2019-nCoV infection. [cited 2020 Oct 24]; Available from: <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0754-0>
18. 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* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2020 Oct 24];12(1):1–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0074-x>
19. GTEx Portal [Internet]. [cited 2020 Oct 17]. Available from: <https://www.gtexportal.org/home/gene/ACE2#geneExpression>
20. Wu C, Zheng M, Yang Y, Gu X, Yang K, Li M, et al. Furin: A Potential Therapeutic Target for COVID-19. *iScience*. 2020 Oct 23;23(10):101642.
21. 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 Apr 16;181(2):271-280.e8.
22. Sakaguchi W, Kubota N, Shimizu T, Saruta J, Fuchida S, Kawata A, et al. Existence of SARS-CoV-2 Entry Molecules in the Oral Cavity. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 Sep 1 [cited 2021 Apr 29];21(17):1–16. Available from: </pmc/articles/PMC7503451/>
23. Collin J, Queen R, Zerti D, Dorgau B, Georgiou M, Djidrovski I, et al. Co-expression of SARS-CoV-2 entry genes in the superficial adult human conjunctival, limbal and corneal epithelium suggests an additional route of

- entry via the ocular surface. *Ocul Surf* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Nov 12];19:190–200. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32502616/>
24. Zhong M, Lin B, Pathak JL, Gao H, Young AJ, Wang X, et al. ACE2 and Furin Expressions in Oral Epithelial Cells Possibly Facilitate COVID-19 Infection via Respiratory and Fecal–Oral Routes. *Front Med* [Internet]. 2020 Dec 10 [cited 2021 Apr 27];7:580796. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmed.2020.580796/full>
 25. Mhaske S, Yuwanati M, Mhaske A, Desai A, Sarode SC, Sarode GS. Perspective on oral exfoliative cytology and COVID-19. Vol. 107, *Oral Oncology*. Elsevier Ltd; 2020.
 26. Parada D, Peña KB, Gumà J, Guilarte C, Riu F. Liquid-based cytological and immunohistochemical study of nasopharyngeal swab from persons under investigation for SARS-CoV-2 infection. *Histopathology* [Internet]. 2021 Mar 1 [cited 2021 Apr 27];78(4):586–92. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32970870/>
 27. Batah SS, Fabro AT. Pulmonary pathology of ARDS in COVID-19: A pathological review for clinicians. *Respir Med* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Nov 19];176. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33246294/>
 28. Rongioletti F, Ferreli C, Sena P, Caputo V, Atzori L. Clinicopathologic correlations of COVID-19-related cutaneous manifestations with special emphasis on histopathologic patterns. *Clin Dermatol* [Internet]. 2021 Jan 1 [cited 2021 Nov 19];39(1):149–62. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33972045/>
 29. Orozco MFS, Niño-Martínez N, Martínez-Castañón GA, Marín NP, Sámano Valencia C, Velázquez FAD, et al. Presence of SARS-CoV-2 and Its Entry Factors in Oral Tissues and Cells: A Systematic Review. *Medicina (Kaunas)* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2021 Nov 19];57(6). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34070998/>
 30. Hung KF, Sun YC, Chen BH, Lo JF, Cheng CM, Chen CY, et al. New COVID-19 saliva-based test: How good is it compared with the current nasopharyngeal or throat swab test? *J Chinese Med Assoc* [Internet]. 2020 Oct 1 [cited 2021 Dec 7];83(10):891. Available from: [/pmc/articles/PMC7526585/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34070998/)
 31. Heaney CD, Pisanic N, Randad PR, Kruczynski K, Howard T, Zhu X, et al. Comparative performance of multiplex salivary and commercially available serologic assays to detect SARS-CoV-2 IgG and neutralization titers. *J Clin Virol* [Internet]. 2021 Dec [cited 2021 Dec 7];145(2):104997. Available from: [/pmc/articles/PMC8502080/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34070998/)
 32. Corstjens PLAM, Abrams WR, Malamud D. Saliva and viral infections [Internet]. Vol. 70, *Periodontology 2000*. Blackwell Munksgaard; 2016 [cited 2020 Oct 8]. p. 93–110. Available from: [/pmc/articles/PMC7167623/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34070998/)
 33. Pinilla YT, Heinzl C, Caminada L-F, Consolaro D, Esen M, Kremsner PG, et al. SARS-CoV-2 Antibodies Are Persisting in Saliva for More Than 15 Months

- After Infection and Become Strongly Boosted After Vaccination. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Dec 9 [cited 2022 Jan 3];12. Available from: [/pmc/articles/PMC8695841/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094589/)
34. Letko M, Marzi A, Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020 Apr 1 [cited 2020 Oct 13];5(4):562–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094589/>
 35. Berry JD, Hay K, Rini JM, Yu M, Wang L, Plummer FA, et al. Neutralizing epitopes of the SARS-CoV S-protein cluster independent of repertoire, antigen structure or mAb technology. *MAbs* [Internet]. 2010 Jan [cited 2020 Oct 13];2(1):53–66. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20168090/>
 36. Isho, B., Abe, K. T., Zuo, M., Jamal, A. J., Rathod, B., Wang, J. H., Li, Z., Chao, G., Rojas, O. L., Bang, Y. M., Pu, A., Christie-Holmes, N., Gervais, C., Ceccarelli, D., Samavarchi-Tehrani, P., Guvenc, F., Budyłowski, P., Li, A., Paterson, A., Yue, F. AC, Isho, Baweleta, Kento T. Abe, Michelle Zuo, Alainna J. Jamal, Bhavisha Rathod JHW, Zhijie Li GC, Rojas OL, Bang YM, Pu A, et al. Persistence of serum and saliva antibody responses to SARS-CoV-2 spike antigens in COVID-19 patients [Internet]. Vol. 5, *Science immunology*. *Sci Immunol*; 2020 Oct [cited 2020 Oct 12]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33033173/>
 37. MacMullan MA, Ibrayeva A, Trettner K, Deming L, Das S, Tran F, et al. ELISA detection of SARS-CoV-2 antibodies in saliva. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Jun 23];10(1). Available from: [/pmc/articles/PMC7705674/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33067270/)
 38. Pisanic N, Randad PR, Kruczynski K, Manabe YC, Thomas DL, Pekosz A, et al. COVID-19 Serology at Population Scale: SARS-CoV-2-Specific Antibody Responses in Saliva. *J Clin Microbiol* [Internet]. 2020 Jan 1 [cited 2021 Dec 8];59(1). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33067270/>
 39. Chellamuthu P, Angel AN, MacMullan MA, Denny N, Mades A, Santacruz M, et al. SARS-CoV-2 Specific IgG Antibodies Persist Over a 12-Month Period in Oral Mucosal Fluid Collected From Previously Infected Individuals. *Front Immunol* [Internet]. 2021 Dec 9 [cited 2022 Jan 10];12. Available from: [/pmc/articles/PMC8697108/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094589/)
 40. Martínez-Fleta P, Alfranca A, González-Álvaro I, Casasnovas JM, Fernández-Soto D, Estes G, et al. SARS-CoV-2 Cysteine-like Protease Antibodies Can Be Detected in Serum and Saliva of COVID-19–Seropositive Individuals. *J Immunol* [Internet]. 2020 Dec 1 [cited 2021 Dec 7];205(11):3130–40. Available from: <https://www.jimmunol.org/content/205/11/3130>
 41. Keuning MW, Grobden M, Groen A-EC de, Jong EPB, Bijlsma MW, Cohen S, et al. Saliva SARS-CoV-2 Antibody Prevalence in Children. *Microbiol Spectr* [Internet]. 2021 Oct 31 [cited 2021 Dec 8];9(2). Available from: [/pmc/articles/PMC8557814/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32094589/)
 42. Sterlin D, Mathian A, Miyara M, Mohr A, Anna F, Claër L, et al. IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2. *Sci Transl Med* [Internet]. 2021 Jan 20 [cited 2022 Jan 9];13(577):2223. Available from:

[/pmc/articles/PMC7857408/](#)

43. Dobaño C, Alonso S, Fernández de Sevilla M, Vidal M, Jiménez A, Pons Tomas G, et al. Antibody conversion rates to SARS-CoV-2 in saliva from children attending summer schools in Barcelona, Spain. BMC Med [Internet]. 2021 Dec 1 [cited 2022 Jan 10];19(1). Available from: [/pmc/articles/PMC8608564/](#)

APÊNDICE A - Status demográfico e clínico dos pacientes avaliados para expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike no dorso da língua

Tabela 1 - Status demográfico e clínico dos pacientes avaliados para expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike no dorso da língua (continua)

ID	Gênero	Idade	Grupo	Tabagista	Febre	Tosse	Mal-estar	Perda de olfato ou paladar	Dor abdominal	Estágio clínico	Etnia
1	Masculino	57	COVID-19	Ex tabagista	Sim	Sim	Não	Não	Não	Moderado	Pardo
2	Feminino	75	COVID-19	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Moderado	Pardo
3	Masculino	70	COVID-19	Ex tabagista	Não	Não	Sim	Não	Não	Moderado	Pardo
4	Feminino	53	COVID-19	Ex tabagista	Não	Sim	Não	Sim	Não	Moderado	Pardo
5	Masculino	79	COVID-19	Ex tabagista	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Moderado	Negro
6	Masculino	47	COVID-19	Ex tabagista	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Moderado	Pardo
7	Masculino	61	COVID-19	Não	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Moderado	Pardo
8	Masculino	55	COVID-19	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Moderado	Pardo
9	Masculino	67	COVID-19	Ex tabagista	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Moderado	Pardo
10	Masculino	28	COVID-19	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Leve	Branco
11	Feminino	83	COVID-19	Não	Não	Não	Sim	Não	Não	Moderado	Negro

Tabela 1 - Status demográfico e clínico dos pacientes avaliados para expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike no dorso da língua (conclusão)

12	Feminino	23	COVID-19	Não	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Moderado	Pardo
13	Masculino	46	COVID-19	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Moderado	Pardo
14	Masculino	32	COVID-19	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Leve	Pardo
15	Feminino	32	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo
16	Feminino	26	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo
17	Masculino	17	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Branco
18	Feminino	24	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Branco
19	Masculino	25	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Negro
20	Feminino	53	Controle	Ex tabagista	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo
21	Masculino	53	Controle	Tabagista	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo
22	Feminino	70	Controle	Tabagista	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo
23	Feminino	24	Controle	Não	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Branco
24	Masculino	25	Controle	Ex tabagista	Não	Não	Não	Não	Não	Sem COVID-19	Pardo

Fonte: A autora, 2022

APÊNDICE B – Comparação das medidas citológicas de acordo com a infecção por COVID-19 e expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike

Tabela 2 - Comparação das medidas citológicas de acordo com a infecção por COVID-19 e expressão da proteína SARS-CoV-2 Spike

Parâmetros	Células epiteliais derivadas de pacientes infectados com COVID-19 Média(SD; \pmCI95%)	Células epiteliais derivadas de pacientes sem COVID-19 Média(SD; \pmCI95%)	Valor de P	Pacientes que expressam a proteína Spike SARS-CoV-2 Média(SD; \pmCI95%)	Pacientes que não expressam a proteína Spike SARS-CoV-2 Média(SD; \pmCI95%)	Valor de P
N	14	10	-	10	14	-
Diâmetro máximo da célula (mm)	18.460 (6.30; \pm 1.69)	23.531 (7.95; \pm 2.55)	0.001*	18.900 (6.92; \pm 2.22)	21.768 (7.62; \pm 2.04)	0.104
Perpendicular máximo ao diâmetro máximo da célula (mm)	16.983 (6.16; \pm 1.60)	20.210 (7.18; \pm 2.3)	0.018*	16.392 (6.16; \pm 1.97)	19.710 (6.88; \pm 1.85)	0.015*
Diâmetro máximo do núcleo (mm)	2.763 (654,21; \pm 0.26)	3.267 (1.17; \pm 0.37)	0.032*	2.779 (891,4; \pm 0.28)	3.112 (1.17; \pm 0.32)	0.123
Perpendicular máximo ao diâmetro máximo do núcleo (mm)	2.679 (935,2; \pm 0.25)	3.120 (1.00; \pm 0.33)	0.025*	2.695 (920,5; \pm 0.29)	2.983 (1.01; \pm 0.27)	0.109

Fonte: A autora, 2022

APÊNDICE C – Porcentagem de pacientes reativos e não-reativos a IgG e IgA em amostras de saliva separados por grupos

Tabela 3 – Porcentagem de pacientes reativos e não-reativos a IgG e IgA em amostras de saliva separados por grupos (Controle Pré-pandêmico – grupo 1 , COVID-19 Negativo – grupo 2, COVID-19 Convalescente <1 mês – grupo 3 e COVID-19 Convalescente >3 mês – grupo 4)

	Controle Pré-pandêmico	COVID-19 Negativo *	Convalescente < 1 mês *	Convalescente > 3 meses *
n Total	9 (100%)	16 (100%)	19 (100%)	8 (100%)
IgG Reativo	0%	50%	73,68%	87,5%
IgG Não-reativo	100%	50%	26,31%	12,5%
IgA Reativo	0%	25%	36,84%	75%
IgA Não-reativo	100%	75%	63,15%	25%
Reativo somente a IgG	0%	31,25%	42,10%	12,5%
Reativo somente a IgA	0%	6,25%	5,2%	0%
Reativo a IgG e IgA	0%	18,75%	31,57%	75%
Não-reativo	100%	43,75%	21,05%	12,5

*Apresentaram maior porcentagem de pacientes que expressaram IgG e IgA.

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE D – Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva

Tabela 4 - Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva (continua)

ID	Grupo	Tabagismo	Febre	Tosse	Mal estar	Perda de Olfato e Paladar	Dor Abdominal	Sexo	Idade
S1	Convalescente <1 mês	não	não	não	sim	sim	não	feminino	24
S2	Convalescente <1 mês	não	não	não	não	sim	não	masculino	64
S3	Convalescente <1 mês	não	sim	sim	sim	sim	sim	masculino	46
S4	Convalescente <1 mês	não	sim	não	sim	sim	sim	feminino	31
S5	Convalescente <1 mês	não	sim	sim	sim	sim	sim	feminino	45
S6	Convalescente <1 mês	Ex-tabagista	sim	sim	sim	sim	não	masculino	32
S7	Convalescente <1 mês	Ex-tabagista	não	sim	sim	sim	não	masculino	68
S8	Convalescente <1 mês	não	sim	sim	sim	sim	não	masculino	58
S9	Convalescente <1 mês	Ex-tabagista	sim	sim	não	sim	não	feminino	86
S10	Convalescente <1 mês	Ex-tabagista	não	não	sim	não	não	masculino	70

Tabela 4. Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva (continuação)

S11	Convalescente <1 mês	não	não	sim	sim	não	sim	masculino	61
S12	Convalescente <1 mês	Ex- tabagista	não	sim	sim	não	não	masculino	62
S13	Convalescente <1 mês	não	sim	sim	sim	sim	sim	masculino	63
S14	Convalescente <1 mês	Ex- tabagista	sim	sim	sim	não	sim	feminino	67
S15	Convalescente <1 mês	não	sim	sim	sim	não	não	masculino	65
S16	Convalescente <1 mês	não	não	sim	sim	não	sim	feminino	76
S17	Convalescente <1 mês	não	sim	não	sim	sim	não	feminino	73
S18	Negativo	Ex- tabagista	sim	sim	sim	sim	sim	feminino	66
S19	Convalescente <1 mês	Ex- tabagista	sim	não	sim	não	não	masculino	63
S20	Convalescente <1 mês	não	não	sim	sim	sim	sim	feminino	39
S21	Negativo	Tabagista	sim	sim	sim	não	sim	feminino	30
S22	Negativo	não	não	sim	sim	sim	não	feminino	35
S23	Negativo	não	não	sim	sim	não	sim	feminino	32

Tabela 4. Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva (continuação)

S24	Negativo	não	sim	sim	sim	sim	sim	feminino	29
S25	Negativo	não	sim	sim	sim	sim	sim	feminino	56
S26	Negativo	não	sim	sim	sim	não	sim	feminino	34
S27	Negativo	não	não	sim	sim	não	não	masculino	36
S28	Negativo	não	sim	sim	sim	não	não	masculino	48
S29	Negativo	não	sim	sim	sim	não	não	feminino	41
S29	Negativo	não	sim	não	sim	não	sim	feminino	48
S30	Negativo	não	sim	não	sim	não	não	masculino	36
S31	Negativo	Ex- tabagista	sim	sim	sim	sim	não	masculino	20
S32	Negativo	não	não	não	sim	não	não	feminino	38
S33	Negativo	não	não	sim	não	não	não	masculino	38
S34	Negativo	não	sim	não	sim	não	não	feminino	52

Tabela 4. Status e clínico dos pacientes avaliados para expressão IgG e IgA em saliva (conclusão)

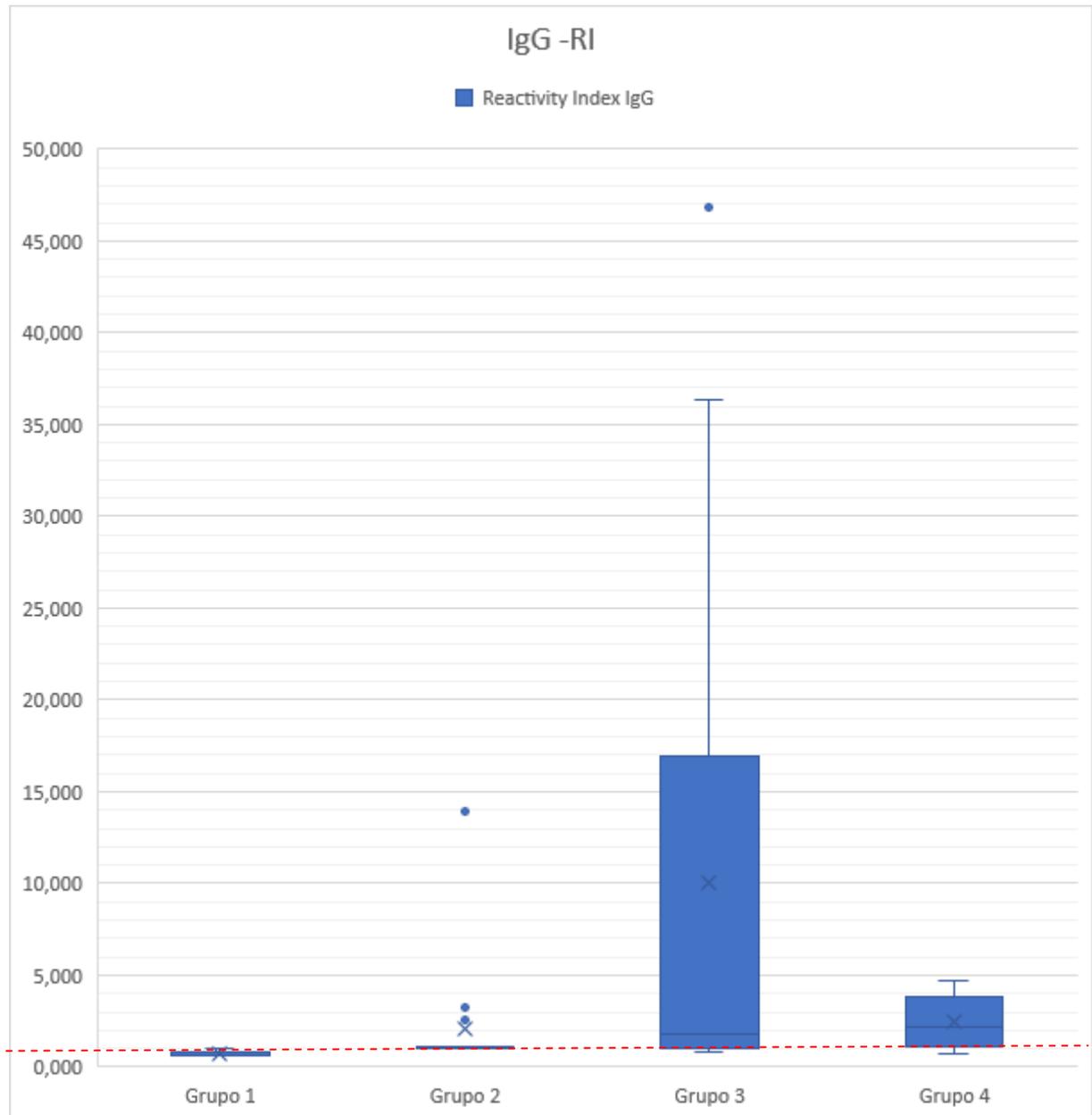
S35	Convalescente >3 meses	Ex- tabagista	sim	não	sim	não	não	masculino	63
S36	Convalescente >3 meses	não	sim	sim	sim	não	não	masculino	65
S37	Convalescente >3 meses	não	não	sim	sim	sim	sim	feminino	39
S38	Convalescente >3 meses	não	não	não	sim	sim	não	feminino	24
S39	Convalescente >3 meses	não	sim	sim	sim	sim	não	masculino	32
S40	Convalescente >3 meses	não	sim	sim	sim	sim	não	masculino	58
S41	Convalescente >3 meses	não	não	não	não	sim	não	masculino	58
S42	Convalescente >3 meses	não	sim	sim	sim	sim	sim	masculino	46

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE E – Níveis de IgG salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4

Gráfico 1 - Níveis de IgG salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4

Índice de reatividade



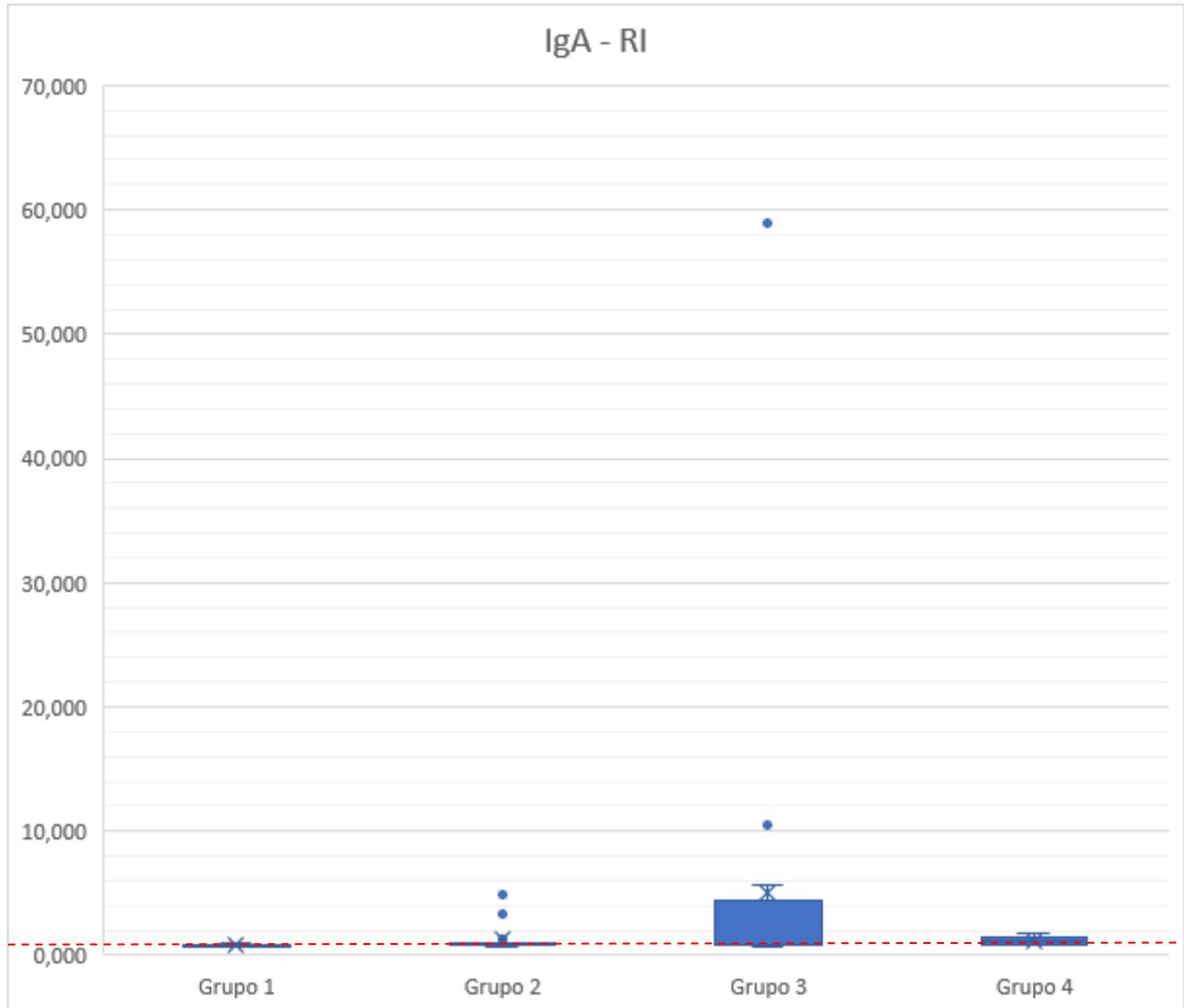
A linha tracejada vermelha representa o ponto de corte que separa os pacientes que expressaram a imunoglobulina dos que não expressaram.

Fonte: A autora, 2022.

APÊNDICE F – Níveis de IgA salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4

Gráfico 2 - Níveis de IgA salivar entre os grupos 1, 2, 3 e 4

Índice de reatividade



A linha tracejada vermelha representa o ponto de corte que separa os pacientes que expressaram a imunoglobulina dos que não expressaram.

Fonte: A autora, 2022.

ANEXO A – Comitê de ética em pesquisa**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Avaliação in vivo da eficácia de duas soluções antissépticas na redução da carga viral de SARS-CoV-2 na saliva de pacientes com COVID-19

Pesquisador: Justine Monteiro Monnerat Tinoco **Área Temática:**

Versão: 1

CAAE: 31222820.6.0000.5259

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da UERJ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.045.586

Apresentação do Projeto:

Transcrição editada do conteúdo registrado no protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou que a disseminação desenfreada da SARS-CoV-2 e sua doença associada (COVID-19) é uma emergência de saúde pública com uma taxa de mortalidade geral atualmente conhecida como 3,4%. Dada a ampla transmissão do SARS-CoV-2 e os relatos de sua disseminação entre prestadores de serviços de saúde, estudantes e profissionais de odontologia correm alto risco de infecção hospitalar e podem se tornar portadores potenciais da doença. Esses riscos podem ser atribuídos às peculiaridades das intervenções odontológicas, como a geração de aerossóis e a proximidade do profissional à região orofaríngea do paciente. Além disso, se as precauções adequadas não forem tomadas, a clínica odontológica pode potencialmente expor os pacientes à contaminação cruzada. Portanto, medidas preventivas de controle de infecção são importantes para proteger estudantes e profissionais de odontologia do COVID-19. O uso pré-operatório de antissépticos orais é capaz de reduzir a carga microbiana na saliva em até 70%. No entanto, a eficácia dos antissépticos orais contra SARS-CoV-2 na saliva não é bem conhecida. O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a redução da carga viral salivar por meio de antissépticos orais em pacientes com teste positivo para COVID-19.

Objetivo da Pesquisa:

Transcrição editada do conteúdo registrado no protocolo e dos arquivos anexados à Plataforma Brasil. O objetivo deste projeto de pesquisa é avaliar a redução da carga viral salivar por antissépticos orais (clorexedina 0,12%; H₂O₂ 1%) em pacientes com teste positivo para COVID-19.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Prezado pesquisador: Caracteriza-se como risco direto para os participantes da pesquisa a possibilidade de desconforto ou constrangimento no momento do preenchimento dos questionários. Os pesquisadores devem se comprometer a minimizar os riscos ou desconfortos que possam vir a ser causados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Para avaliar a eficácia das soluções antissépticas orais, serão recrutados 36 indivíduos da Policlínica Piquet Carneiro da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, com sintomas de COVID-19 e que já haviam testado positivo para SARS-CoV-2 usando swabs nasofaríngeos. Os pacientes serão divididos em 3 grupos de 12 indivíduos e cada grupo receberá um enxaguatório bucal contendo: A- solução de clorexidina (0,12%); B: Solução de H₂O₂ (1%); ou C - placebo (água). A pesquisa está bem estruturada e o referencial teórico e metodológico estão explicitados, demonstrando aprofundamento e conhecimento necessários para sua realização. As referências estão adequadas e a pesquisa é exequível.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Foram analisados os seguintes documentos de apresentação obrigatória:

- 1) Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos: Documento devidamente preenchido, datado e assinado
- 2) Projeto de Pesquisa: Adequado
- 3) Orçamento financeiro e fontes de financiamento: adequado/apresentado
- 4) Termo de Consentimento Livre e Esclarecido: Adequado
- 5) Cronograma: Adequado

6) Documentos pertinentes à inclusão do HUPE: Adequado

7) Currículo do pesquisador principal e demais colaboradores: anexados e conforme as normas.

Os documentos de apresentação obrigatória foram enviados a este Comitê, estando dentro das boas práticas e apresentando todos dados necessários para apreciação ética e tendo sido avaliadas as informações contidas na Plataforma Brasil e as mesmas se encontram dentro das normas vigentes e sem riscos iminentes aos participantes envolvidos de pesquisa.

Recomendações:

De acordo com a Resolução 446/12 do Conselho Nacional de Saúde/CNS, o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que deverá seguir os seguintes itens:

Acrescentar - Contado do Comitê de Ética em Pesquisa - Caso seja necessário você pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do HUPE para esclarecimentos ou informações quanto a validade da pesquisa: Av. 28 de setembro, 77 térreo Vila Isabel – CEP 20551-030 - Tel: 21-2868.8253 – Email: cephupe@uerj.br.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto pode ser realizado da forma como está apresentado. Diante do exposto e à luz da Resolução CNS nº466/2012, o projeto pode ser enquadrado na categoria – APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em consonância com a resolução CNS 466/12 e a Norma Operacional CNS 001/13, o CEP recomenda ao Pesquisador: Comunicar toda e qualquer alteração do projeto e no termo de consentimento livre e esclarecido, para análise das mudanças; Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa; O Comitê de Ética solicita a V. S^a., que encaminhe relatórios parciais de andamento a cada 06 (seis) Meses da pesquisa e ao término, encaminhe a esta comissão um sumário dos resultados do projeto; Os dados individuais de todas as etapas da pesquisa devem ser mantidos em local seguro por 5 anos para possível auditoria dos órgãos competentes.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1548293.pdf	30/04/2020 00:55:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/04/2020 00:55:05	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Declaração de concordância	CONCORDANCIA.pdf	30/04/2020 00:54:02	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	vinculo_preenchido.pdf	30/04/2020 00:52:25	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_detalhado.pdf	30/04/2020 00:49:37	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Orçamento	Orcamento.docx	30/04/2020 00:48:26	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	30/04/2020 00:47:58	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_assinada.pdf	30/04/2020 00:47:44	Justine Monteiro Monnerat Tinoco	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 25 de Maio de 2020

**Assinado por:
WILLE OIGMAN
(Coordenador(a))**

ANEXO B – Artigo - Morphological alterations in tongue epithelial cells infected by SARS- CoV- 2: A case-control study

Marques, B. B. F., Guimarães, T. C., Fischer, R. G., Tinoco, J. M. M., Pires, F. R., Lima Junior, J. C., Stevens, R. H., & Tinoco, E. M. B. (2021). Morphological alterations in tongue epithelial cells infected by SARS- CoV- 2: A case– control study. *Oral Diseases*, 00, 1– 6. <https://doi.org/10.1111/odi.13988>

Abstract Objective: The aim of the present case–control study was to evaluate the morphological aspects of the epithelial cells from the dorsum of the tongue and the expression of the SARS-CoV-2 Spike protein in these cells, in patients with and without COVID-19 infection. **Methods:** 24 individuals with at least one symptom of COVID-19 were recruited among inpatients from Hospital Universitário Pedro Ernesto (Rio de Janeiro, Brazil). 14 patients who tested positive for COVID-19 by RT-PCR were included in the case group, and 10 patients who tested negative were included in the control group. Cytological smears from the dorsum of the tongue were obtained from all patients and analyzed using immunohistochemistry directed against SARS-CoV-2-Spike protein. Morphological changes in epithelial cells were analyzed using light microscopy. **Results:** Immunohistochemistry showed that 71% of the COVID-19 patients presented epithelial cells positive for the presence of the SARS-CoV-2 Spike protein, and all cells coming from patients in the control group were negative. Cytological analysis showed significant differences when comparing epithelial cells from COVID-19- positive and COVID-19-negative patients. **Conclusion:** COVID-19 may generate dimensional changes in tongue epithelial cells; however, further studies are necessary to understand how this happens. **KEYWORDS** epithelial cells, RT-PCR, SARS-CoV-2, spike protein