

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS

DIÓGENES DIEGO DE CARVALHO BISPO

**Avaliação cognitiva, olfativa e microestrutural cerebral  
após COVID-19**

BRASÍLIA  
2023

DIÓGENES DIEGO DE CARVALHO BISPO

**Avaliação cognitiva, olfativa e microestrutural cerebral  
após COVID-19**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Neysa Aparecida Tinoco Regattieri  
Coorientador: Prof. Dr. Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares

BRASÍLIA  
2023



Ficha catalográfica elaborada automaticamente,  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

BB622a Bispo, Diógenes Diego de Carvalho  
Avaliação cognitiva, olfativa e microestrutural cerebral  
após COVID-19 / Diógenes Diego de Carvalho Bispo; orientador  
Neysa Aparecida Tinoco Regattieri; co-orientador Alexandre  
Anderson de Sousa Munhoz Soares. -- Brasília, 2023.  
127 p.

Tese(Doutorado em Ciências Médicas) -- Universidade de  
Brasília, 2023.

1. COVID-19. 2. Cérebro. 3. Cognição. 4. Olfato. 5.  
Ressonância Magnética. I. Regattieri, Neysa Aparecida  
Tinoco, orient. II. Soares, Alexandre Anderson de Sousa  
Munhoz, co-orient. III. Título.

DIÓGENES DIEGO DE CARVALHO BISPO

**Avaliação cognitiva, olfativa e microestrutural cerebral  
após COVID-19**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, área de concentração Medicina, da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Aprovado em 13 de dezembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Neysa Aparecida Tinoco Regattieri (presidente)  
Universidade de Brasília (UnB)

Profa. Dra. Iruena Moraes Kessler  
Universidade de Brasília (UnB)

Dr. Nasser Allam  
NA Neurologistas Associados

Prof. Dr. Bernardo Corrêa de Almeida Teixeira  
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Profa. Dra. Maria Clotilde Henrique Tavares  
Universidade de Brasília (UnB)

Dedico este trabalho à minha amada esposa Isis, com todo o meu amor e carinho. Dedico também aos meus pais, Ailton e Lécia, com profunda gratidão.

## AGRADECIMENTOS

A conclusão desta Tese de Doutorado foi possível graças ao trabalho colaborativo de um grupo notável de pessoas, a quem devo uma gratidão profunda e a quem admiro sinceramente.

À minha orientadora, Prof. Dra. Neysa Regattieri, por acreditar e apoiar o projeto desde o início e confiar a responsabilidade de produzir resultados relevantes. Um exemplo de professora e ser humano.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Alexandre Soares, que aceitou o desafio de nos orientar no momento de pandemia. Suas contribuições foram essenciais para minha formação como pesquisador crítico e cético.

Ao Dr. Pedro Brandão, que contribuiu em todas as etapas desse projeto, desde o delineamento, a execução, a análise de dados, as discussões dos resultados e as publicações. Muito obrigado pela parceria científica!

Ao Dr. Danilo Pereira, que compartilhou seu conhecimento em estatística e psicometria, além de sua disponibilidade para discussões metodológicas e análise de dados de maneira crítica e perspicaz.

Ao Prof. Dr. Maxime Descoteaux, cuja contribuição trouxe novas perspectivas às análises de neuroimagem, particularmente durante a pandemia de COVID-19, com ênfase em tratometria e conectividade estrutural.

Ao Prof. Dr. Felipe von Glehn, que permitiu que o projeto surgisse como um desdobramento do projeto NeuroCovBr.

Ao Dr. Fernando Maluf, que generosamente nos apoiou e disponibilizou a estrutura e os recursos do Hospital Santa Marta para a realização dos exames de Ressonância Magnética, parte essencial deste projeto.

À Dra. Bruna Dias e ao Dr. Hugo Paranhos, que contribuíram significativamente para a extensa coleta de dados clínicos, neuropsicológicos e de neuroimagem.

Ao Dr. Brainerd Bandeira, que disponibilizou a estrutura da Unidade de Diagnóstico por Imagem do Hospital Universitário de Brasília para atividades do projeto.

A todos os pacientes e voluntários que reconhecem a importância da ciência e que, mesmo durante a pandemia de COVID-19, dedicaram seu tempo para tornar esta pesquisa possível, expresse minha sincera gratidão.

## RESUMO

**Introdução.** Fadiga, queixas cognitivas e disfunção olfativa são os sintomas persistentes mais frequentes em pacientes após infecção pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2). Este estudo teve como objetivo avaliar a fadiga e o desempenho neuropsicológico, bem como investigar alterações na espessura e volume da substância cinzenta e anormalidades microestruturais na substância branca em um grupo de pacientes com doença do coronavírus 2019 (COVID-19) de leve a moderada gravidade. Além disso, investigamos alterações no volume do bulbo olfatório e na rede de substância branca cerebral em pacientes com hiposmia persistente após a COVID-19.

**Métodos.** Estudamos 56 pacientes com COVID-19 e 37 controles pareados usando ressonância magnética (MRI). A cognição foi avaliada usando *Montreal Cognitive Assessment* (MoCA) e *Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery* (CANTAB), e a fadiga foi avaliada usando a Escala de Fadiga de Chalder (CFQ-11). O teste de identificação de odores Sniffin' Sticks (SS-16) foi utilizado para avaliar a capacidade dos participantes de identificar odores. A MRI ponderada em T1 foi utilizada para avaliar a espessura e o volume da substância cinzenta. Os bulbos olfatórios foram segmentados manualmente a partir da MRI ponderada em T2. Dados de densidade de fibra aparente específica ao feixe (FD), índice de água livre e imagens de tensor de difusão foram extraídos usando MRI ponderada em difusão (d-MRI). Estatísticas baseadas em rede (NBS) e análise teórica de grafos foram usadas para explorar a substância branca. Os dados de d-MRI foram correlacionados com medidas clínicas e cognitivas usando correlações parciais e modelo linear generalizado.

**Resultados.** Os pacientes com COVID-19 tiveram uma doença aguda leve a moderada (95% não hospitalizados). O período médio entre o diagnóstico baseado em reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcrição reversa em tempo real (RT-qPCR) e as avaliações clínicas/MRI foi de 93,3 ( $\pm 26,4$ ) dias. O grupo COVID-19 apresentou escores totais mais altos da CFQ-11 em comparação com os controles ( $p < 0,001$ ). Não houve diferenças no desempenho neuropsicológico entre os grupos. O grupo COVID-19 apresentou menor FD nos tratos de associação, projeção e comissurais, mas nenhuma alteração na substância cinzenta. Coroa radiada, trato cor-

ticoespinhal, corpo caloso, fascículo arqueado, cíngulo, fórnix, fascículo fronto-occipital inferior, fascículos longitudinais superior e inferior e fascículo uncinado estavam comprometidos. O escore CFQ-11 e o desempenho no tempo de reação e nos testes de memória visual se correlacionaram com as mudanças microestruturais em pacientes com COVID-19.

O grupo de hiposmia persistente por COVID-19 apresentou redução no volume dos bulbos olfatórios em comparação com os controles. Na NBS, os pacientes com COVID-19 mostraram aumento na conectividade estrutural em uma sub-rede composta por regiões cerebrais parietais. Em relação às propriedades topológicas de rede global, os pacientes apresentaram menor *global efficiency* e *local efficiency* e maior *assortativity* em comparação com os controles. Em relação às propriedades topológicas de rede local, os pacientes apresentaram menor *local efficiency* (giro orbital lateral esquerdo e globo pálido), aumento no *clustering* (giro orbital lateral esquerdo), aumento na *nodal strength* (giro orbital anterior direito) e redução na *nodal strength* (amígdala esquerda). A pontuação no teste SS-16 se correlacionou negativamente com o *clustering* de toda a substância branca no grupo COVID-19.

**Conclusões.** A d-MRI quantitativa detectou alterações na microestrutura da substância branca de pacientes em recuperação da COVID-19. Este estudo sugere um possível substrato cerebral subjacente aos sintomas causados pelo SARS-CoV-2 durante a recuperação de médio a longo prazo. Pacientes com disfunção olfativa após a COVID-19 apresentaram alteração relevante na rede da substância branca com aumento da conectividade no córtex sensorial parietal. A redução da integração e o aumento da segregação são observados dentro das áreas cerebrais relacionadas ao olfato, o que pode ser devido a mecanismos de plasticidade compensatória dedicados à recuperação da função olfativa.

**Palavras-chave:** COVID-19; cérebro; fadiga; cognição; olfato; ressonância magnética; plasticidade neuronal.

## ABSTRACT

**Background.** Fatigue, cognitive complaints, and olfactory dysfunction are the most frequent persistent symptoms in patients after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. This study aimed to assess fatigue and neuropsychological performance and investigate changes in the thickness and volume of gray matter and microstructural abnormalities in the white matter in a group of patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019 (COVID-19). Additionally, we aimed to investigate changes in olfactory bulb volume and brain network in the white matter in patients with persistent hyposmia following COVID-19.

**Methods.** We studied 56 COVID-19 patients and 37 matched controls using magnetic resonance imaging (MRI). Cognition was assessed using Montreal Cognitive Assessment and Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery, and fatigue was assessed using Chalder Fatigue Scale (CFQ-11). The Sniffin' Sticks smell identification test (SS-16) was used to evaluate participants' ability to identify odors. T1-weighted MRI was used to assess gray matter thickness and volume. The olfactory bulbs were manually segmented from T2-weighted MRI. Fiber-specific apparent fiber density (FD), free water index, and diffusion tensor imaging data were extracted using diffusion-weighted MRI (d-MRI). Network-Based Statistics (NBS) and graph theoretical analysis were used to explore the WM. d-MRI data were correlated with clinical, cognitive measures, and SS-16 score using partial correlations and general linear modeling.

**Results.** COVID-19 patients had mild-to-moderate acute illness (95% non-hospitalized). The average period between real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction-based diagnosis and clinical/MRI assessments was 93.3 ( $\pm 26.4$ ) days. The COVID-19 group had higher total CFQ-11 scores than the control group ( $p < 0.001$ ). There were no differences in neuropsychological performance between groups. The COVID-19 group had lower FD in the association, projection, and commissural tracts, but no change in gray matter. The corona radiata, corticospinal tract, corpus callosum, arcuate fasciculus, cingulate, fornix, inferior fronto-occipital fasciculus, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, and uncinate fasciculus were involved. CFQ-11 scores and performance in

reaction time and visual memory tests correlated with microstructural changes in patients with COVID-19.

The COVID-19 persistent hyposmia group had reduced olfactory bulb volume compared to controls. In NBS, COVID-19 patients showed increased structural connectivity in a subnetwork comprising parietal brain regions. Regarding global network topological properties, patients exhibited lower global and local efficiency and higher assortativity than controls. Concerning local network topological properties, patients had reduced local efficiency (left lateral orbital gyrus and pallidum), increased clustering (left lateral orbital gyrus), increased nodal strength (right anterior orbital gyrus), and reduced nodal strength (left amygdala). SS-16 test score was negatively correlated with clustering of whole-brain white matter in the COVID-19 group.

**Conclusions.** Quantitative d-MRI detected changes in the white matter microstructure of patients recovering from COVID-19. This study suggests a possible brain substrate underlying the symptoms caused by SARS-CoV-2 during medium- to long-term recovery. Additionally, patients with olfactory dysfunction after COVID-19 had relevant white matter network dysfunction with increased connectivity in the parietal sensory cortex. Reduced integration and increased segregation are observed within olfactory-related brain areas might be due to compensatory plasticity mechanisms devoted to recovering olfactory function.

**Keywords:** COVID-19; brain; fatigue; cognition; olfaction; magnetic resonance imaging; neuronal plasticity.



## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Mecanismos prováveis de lesão do sistema nervoso central..... 20
- Figura 2 - Linha do tempo da COVID-19 Pós-Aguda..... 30
- Figura 3 - Fluxograma de processamento de MRI (análise de tratometria). (A e B) Imagens brutas ponderadas em difusão e ponderadas em T1 são processadas pelo TractoFlow. (C) As imagens brutas ponderadas em T1 são processadas pelo pacote FreeSurfer para segmentação da substância cinzenta. (D) Medidas derivadas de d-MRI e índice de água livre são computadas. (E) A tratografia probabilística do cérebro inteiro é realizada usando um algoritmo de filtro de partículas anatomicamente restrito. (F) Extração dos tratos de substância branca por RecoBundlesX (por exemplo, fascículo longitudinal superior). (G) A análise baseada em voxel foi usada para investigar as métricas de difusão (índice de água livre, imagens de tensor de difusão corrigidas por água livre e densidade de fibra aparente baseada em voxel). (H) A densidade de fibra aparente específica à fibra (FD) é extraída em cada fixel (por exemplo, fascículo longitudinal superior). (I) Tratometria de cada feixe utilizando FD. .... 51
- Figura 4 - Fluxograma de processamento de MRI (análise de conectividade estrutural). (A e B) O pipeline TractoFlow processa imagens ponderadas em difusão e T1. (C) As imagens ponderadas em T1 são rotuladas em 171 regiões cerebrais do atlas AAL3. (D) São calculadas medidas derivadas de ressonância magnética de difusão. (E) A tratografia probabilística em todo o cérebro é realizada usando um algoritmo de filtro de partículas com restrição anatômica. (F) Extração da matriz de conectividade ponderada por COMMIT2. (G) Análise baseada em voxel investigou métricas de difusão (imagens de tensor de difusão). (H) Análise de estatísticas baseadas em rede. (I) Análise de teoria dos grafos: rede global e local..... 56
- Figura 5 - Segmentação manual dos bulbos olfativos. (A) Imagem coronal ponderada em T2 de um participante. (B) Imagem coronal ponderada em T2 com segmentação dos dois avaliadores. Vermelho: Avaliador 1; Verde: Avaliador 2; Amarelo: Sobreposição das segmentações. .... 58

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Proposta de estadiamento da NeuroCovid. ....	29
Quadro 2 - Tradução brasileira adaptada culturalmente para o teste olfativo de identificação Sniffin' Sticks (SS-16).....	47
Quadro 3 - Principais medidas dos subtestes cognitivos da Avaliação Neuropsicológica Computadorizada Automatizada de Cambridge (CANTAB).....	48

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COVID-19	Doença de coronavírus 2019
AAL3	Automated anatomical labeling 3
AD	<i>Axial diffusivity</i>
ADt	<i>Tissue axial diffusivity</i>
AFD	<i>Apparent fiber density</i>
BHE	Barreira hematoencefálica
CANTAB	<i>Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery</i>
CFQ-11	<i>Chalder fatigue scale</i>
CSD	<i>Constrained spherical deconvolution</i>
d-MRI	<i>Diffusion-weighted magnetic resonance imaging</i>
DTI	<i>Diffusion tensor imaging</i>
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
FA	<i>Fractional anisotropy</i>
FAt	<i>Tissue fractional anisotropy</i>
FD	<i>Fiber density</i>
FDG-PET	<i>Fluorodeoxyglucose positron emission tomography</i>
FDR	<i>False discovery rate</i>
FOV	<i>Field-of-view</i>
FW	<i>Free water</i>
GLM	<i>Generalized linear model</i>
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MD	<i>Mean diffusivity</i>
MDt	<i>Tissue mean diffusivity</i>
MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment</i>
MRI	<i>Magnetic resonance imaging</i>
NBS	<i>Network-Based Statistics</i>
NRP1	Neuropilina 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTS	<i>One touch stockings of Cambridge</i>
PAL	<i>Paired associates learning</i>
PRM	<i>Pattern recognition memory</i>

PS	Proteína spike
RD	<i>Radial diffusivity</i>
RDt	<i>Tissue radial diffusivity</i>
RT-qPCR	<i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i>
RTI	<i>Reaction time</i>
SARS-CoV-2	<i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SWM	<i>Spatial working memory</i>
TBSS	<i>Tract-Based Spatial Statistics</i>
TE	Tempo de eco
TFCE	<i>Threshold-free cluster enhancement</i>
TFE	<i>Turbo field echo</i>
TI	Tempo de inversão
TMPRSS2	<i>Transmembrane serine protease 2</i>
TR	Tempo de repetição
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
VIC	Volume intracraniano
VRM	<i>Visual recognition memory</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>1.1. SARS-CoV-2 e COVID-19</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2. Rotas potenciais de invasão direta do SNC</b> .....	<b>20</b>
1.2.1. Rota de invasão neuronal.....	20
1.2.2. Rota de invasão hematogênica.....	21
<b>1.3. “Tempestade de citocinas” e ativação de micróglia</b> .....	<b>23</b>
<b>1.4. Efeitos indiretos no sistema nervoso</b> .....	<b>24</b>
1.4.1. Quebra da barreira hematoencefálica.....	24
1.4.2. Disfunção do SNC associada à hipóxia.....	25
1.4.3. Estado hipercoagulável.....	26
1.4.4. Neuropatias autoimunes.....	27
<b>1.5. Sintomas neurológicos na fase aguda da COVID-19</b> .....	<b>27</b>
<b>1.6. COVID-19 Pós-Aguda</b> .....	<b>29</b>
<b>1.7. Disfunção Cognitiva após COVID-19</b> .....	<b>31</b>
1.7.1. Fatores de risco para o comprometimento cognitivo.....	34
<b>1.8. Disfunção Olfativa após COVID-19</b> .....	<b>35</b>
<b>1.9. Neuroimagem na COVID-19</b> .....	<b>37</b>
1.9.1. Avaliação estrutural, microestrutural e funcional cerebral com ressonância magnética.....	37
1.9.2. Avaliação funcional cerebral com tomografia por emissão de pósitrons	39
1.9.3. Avaliação dos bulbos olfatórios e do sistema olfatório.....	40
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>42</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>43</b>
<b>3.1. Geral</b> .....	<b>43</b>
<b>3.2. Específicos</b> .....	<b>43</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>44</b>
<b>4.1. Aspectos éticos</b> .....	<b>44</b>

<b>4.2. Delineamento e contexto .....</b>	<b>44</b>
<b>4.3. Participantes .....</b>	<b>45</b>
4.3.1. Participantes com hiposmia persistente relacionada à COVID-19 .....	45
<b>4.4. Variáveis demográficas, avaliação clínica e neuropsicológica.....</b>	<b>46</b>
4.4.1. Escala de fadiga .....	46
4.4.2. Teste olfativo.....	46
4.4.3. Avaliação Cognitiva de Montreal.....	47
4.4.4. Avaliação Neuropsicológica Computadorizada Automatizada de Cambridge .....	48
<b>4.5. Imagem por ressonância magnética .....</b>	<b>49</b>
4.5.1. Aquisição de MRI .....	49
4.5.2. Segmentação cortical e subcortical automatizada .....	50
4.5.3. Processamento das d-MRI .....	51
4.5.4. Análise de imagem de difusão baseada em voxel .....	53
4.5.5. Segmentação de tratos de substância branca.....	53
4.5.6. Análise de imagem de difusão baseada em trato .....	54
4.5.7. Construção da rede.....	54
4.5.8. Estatísticas baseadas em rede .....	56
4.5.9. Medidas de rede.....	57
4.5.10. Segmentação manual dos bulbos olfatórios .....	58
4.5.11. Controle de qualidade de MRI.....	58
<b>4.6. Análise estatística.....</b>	<b>59</b>
4.6.1. Avaliação demográfica, clínica e neuropsicológica.....	59
4.6.2. Análise das segmentações da substância cinzenta.....	59
4.6.3. Análise de imagem de difusão baseada em voxel .....	59
4.6.4. Análise de imagem de difusão baseada em trato .....	60
4.6.5. Estatísticas baseadas em rede .....	61
4.6.6. Métricas de rede.....	61
4.6.7. Segmentação dos bulbos olfatórios .....	61
4.6.8. Cálculo do tamanho da amostra .....	62

<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1. Estudo 1: Alterações microestruturais cerebrais e fadiga após COVID-19 .....</b>	<b>63</b>
<b>5.2. Estudo 2: Conectividade estrutural alterada na disfunção olfativa após COVID-19 leve.....</b>	<b>91</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>105</b>
<b>7. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>108</b>
<b>8. ANEXOS .....</b>	<b>122</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Desde a sua descoberta em Wuhan, na China, no final de 2019, a doença de coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (*severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*, SARS-CoV-2), resultou em mais de 600 milhões de infectados e 6 milhões de mortes (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY, 2023) e determinou uma pressão sem precedentes nos sistemas social, econômico e de saúde em todo o mundo (AL-ALY; XIE; BOWE, 2021). Mais de três anos após a pandemia da COVID-19 ter sido declarada, o mundo ainda está se recuperando de sua devastação. Embora as pesquisas sobre o COVID-19 tenham se concentrado predominantemente em doenças agudas, ficou claro que ocorrem consequências a longo prazo (NALBANDIAN et al., 2021). Muitos sobreviventes da fase aguda da infecção continuam a experimentar sintomas neurológicos persistentes e debilitantes, que têm implicações significativas em termos socioeconômicos e pessoais. Portanto, é crucial obter uma compreensão abrangente das síndromes clínicas em evolução e dos mecanismos fisiopatológicos subjacentes. Isso permitirá a implementação rápida de intervenções terapêuticas baseadas em evidências (AL-ALY; XIE; BOWE, 2021), para atender às necessidades dos pacientes que sofrem os efeitos de longo prazo da COVID-19.

Embora a COVID-19 seja uma infecção viral que afeta principalmente o sistema respiratório, relatórios iniciais da China já mostravam que o vírus SARS-CoV-2 tem capacidade de afetar o sistema nervoso central (SNC) (MAO et al., 2020). No entanto, é importante ressaltar que esses relatórios se basearam principalmente em dados de pacientes hospitalizados, o que limita sua representatividade em relação ao verdadeiro impacto das manifestações neurológicas em toda a comunidade após a infecção por SARS-CoV-2 (PEZZINI; PADOVANI, 2020). Dada a extensão da pandemia, é altamente provável que um número significativamente maior de pacientes com COVID-19 tenha experimentado manifestações neurológicas ao longo do curso da doença do que os relatados até o momento. O espectro de manifestações neurológicas na infecção por SARS-CoV-2 provavelmente envolve diversas vias patogênicas. Foram propostos vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de manifestações neurológicas após a invasão neurotrópica do vírus, incluindo disfunção endotelial, hiperinflamação, hipercoagulabilidade, hipóxia e agravamento da doença. Ainda há muito a ser explorado para uma compreensão



completa da patogenicidade do SARS-CoV-2 e de seus efeitos prejudiciais no sistema nervoso (BROLA; WILSKI, 2022).

### 1.1. SARS-CoV-2 e COVID-19

Os coronavírus constituem uma família diversificada de vírus com uma ampla gama de hospedeiros, incluindo humanos, e estão predominantemente associados a infecções leves do trato respiratório superior. O reservatório e a diversidade de coronavírus em morcegos parecem ser substanciais (LI et al., 2020). O SARS-CoV-2 provavelmente teve origem em morcegos e foi transmitido aos humanos por meio de um hospedeiro intermediário, possivelmente pangolins (XIAO et al., 2020). Devido à semelhança entre os coronavírus, é provável que existam vários locais de interação entre o SARS-CoV-2 e as células hospedeiras, o que pode contribuir para os diversos sintomas da COVID-19 e servir como possíveis alvos terapêuticos.

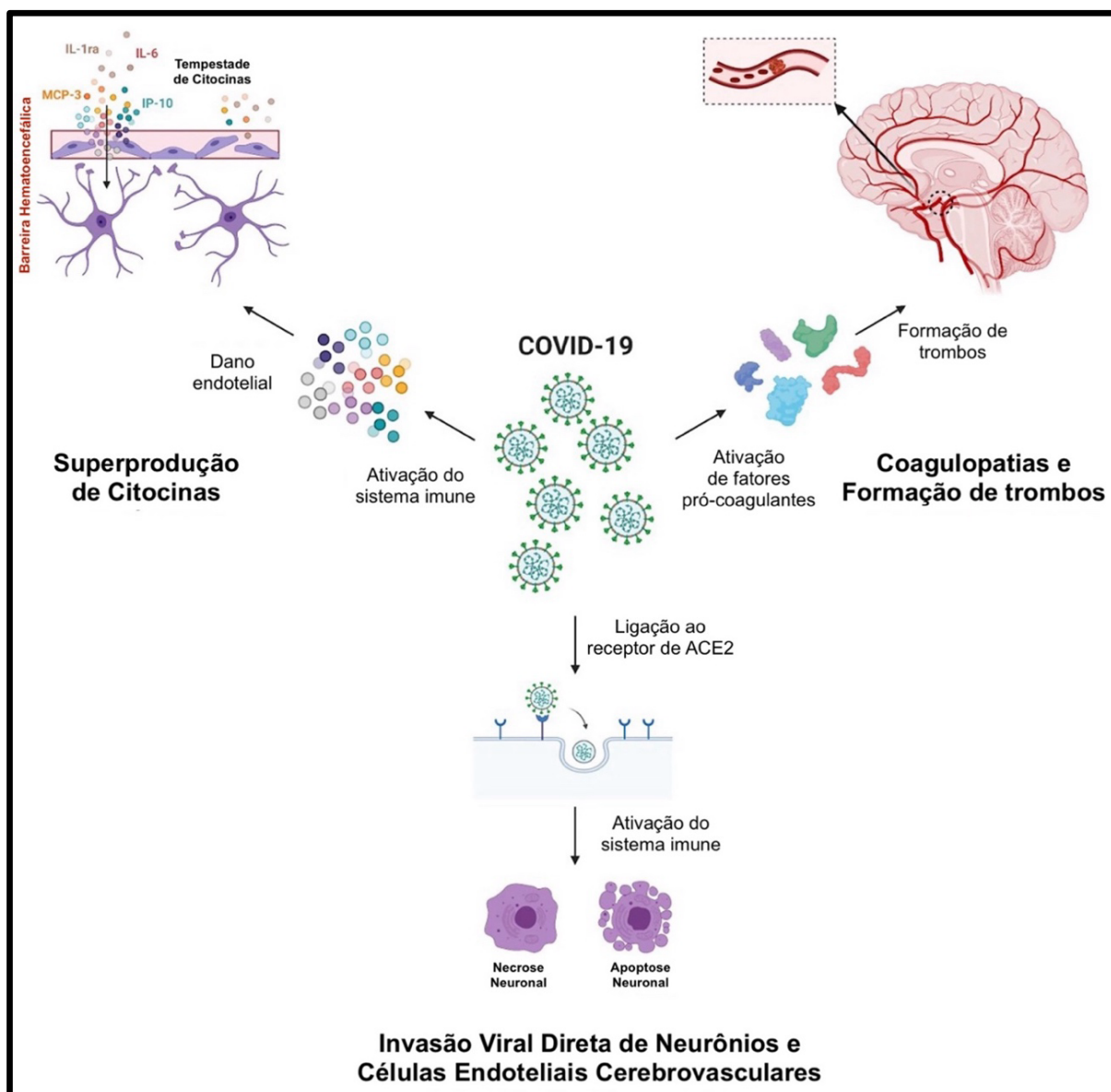
Há evidências na literatura de que o neurotropismo é uma característica comum entre os coronavírus, devido a suas semelhanças estruturais e mecanismos de infecção (LI; BAI; HASHIKAWA, 2020). A proteção do SNC contra patógenos e agentes químicos nocivos é realizada principalmente pela barreira hematoencefálica (BHE), que é formada por células endoteliais que regulam seletivamente a passagem de substâncias presentes na corrente sanguínea, como anticorpos, sistema complemento e fatores de coagulação (ABBOTT et al., 2010). O SARS-CoV-2 tem potencial de usar mecanismos para invadir o SNC. Esses mecanismos estão principalmente relacionados à enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), uma glicoproteína que é produzida em vários órgãos, como o endotélio vascular, o coração, os rins e o cérebro (NI et al., 2020).

O SARS-CoV-2 é composto por um envelope viral de membrana lipídica que envolve o nucleocapsídeo, que é o material genético do vírus que interage com o material genético da célula hospedeira. A membrana lipídica contém proteínas estruturais, como a proteína spike (PS), proteína de membrana, glicoproteína de envelope pequeno e hemaglutinina-esterase (DAS; MUKHERJEE; GHOSH, 2020). O SARS-CoV-2 entra nas células usando a PS que se liga ao receptor ECA2 na membrana plasmática (WANG et al., 2020). Há outros co-receptores como a protease transmembrana serina 2 (*transmembrane serine protease 2*, TMPRSS2), CD147, GRP78, entre outros, que facilitam a entrada viral em células que não expressam

ECA2 (GADANEC et al., 2021). Vale destacar que a neuropilina 1 (NRP1) e CD147 são encontrados mais do que ECA2 e TMPRSS2 no cérebro, inclusive no bulbo olfatório, e atuam como co-receptores para a entrada celular, podendo aumentar a infectividade viral (BURKS et al., 2021; GADANEC et al., 2021). A patogênese do SARS-CoV-2 envolve a interação entre a PS e receptores nas células, usando várias vias de entrada endocítica (SHANG et al., 2020).

A infecção pelo vírus SARS-CoV-2 tem o potencial de causar doença cerebral por meio de mecanismos diretos e indiretos. Devido à expressão de diversos receptores em partes do SNC, o vírus pode potencialmente invadi-lo, levando a manifestações neurológicas. Essas manifestações também podem ocorrer devido a efeitos indiretos da infecção, incluindo respostas imunológicas e “tempestades de citocinas” (LIMA et al., 2020). A infecção pelo SARS-CoV-2 desencadeia uma cascata de citocinas. Evidências recentes indicam que a interleucina-1ra, interleucina-6, proteína quimioatraente de monócito-3 e a proteína induzida por interferon-gama no soro estão associadas a desfechos fatais da infecção por COVID-19 (YANG et al., 2020b). Mesmo sem o vírus penetrar na BHE, as “tempestades de citocinas” podem danificar uma BHE intacta e perturbar o funcionamento normal do SNC. Além disso, COVID-19 tem sido associada a um estado pró-trombótico, o que pode resultar em oclusão de vasos cerebrais e causar lesões cerebrais (DIVANI et al., 2020). Por fim, ECA2 pode promover a invasão direta de neurônios e células endoteliais cerebrovasculares, resultando em apoptose e necrose de neurônios e células adjacentes (AGHAGOLI et al., 2021; JACOMY et al., 2006) (**Figura 1**).

Figura 1 - Mecanismos prováveis de lesão do sistema nervoso central.



FONTE: Adaptado de AGHAGOLI et al., 2021.

## 1.2. Rotas potenciais de invasão direta do SNC

### 1.2.1. Rota de invasão neuronal

O principal modo de transmissão do SARS-CoV-2 é através das gotículas respiratórias resultantes de tosse e espirro de pacientes com COVID-19 (HOFFMANN et al., 2020). Para compreender o surgimento de sintomas como anosmia (perda do olfato) e ageusia (perda do paladar), é crucial entender como o vírus pode entrar no SNC por meio das vias intranasal e oral (MEINHARDT et al., 2021). O vírus pode atingir os pulmões após penetrar na cavidade nasal através de gotículas que contêm o vírus ou infectar a mucosa nasal e células suscetíveis (HOFFMANN et al., 2020). O

epitélio olfatório na cavidade nasal é composto por diversos tipos de células, incluindo os neurônios sensoriais olfatórios e células basais. As células basais horizontais expressam ECA2, ao contrário dos neurônios olfatórios que não expressam ECA2. As células basais horizontais infectadas podem se diferenciar em neurônios olfatórios e acessar o bulbo olfatório através da placa cribiforme, potencialmente infectando outras regiões do cérebro por meio de uma via trans-sináptica (BRIGUGLIO et al., 2020; MEINHARDT et al., 2021). O transporte axonal rápido é um mecanismo proposto para entender a propagação do vírus dentro do sistema nervoso periférico (SNP) e neurônios do parênquima cerebral. O vírus é internalizado nos neurônios periféricos por meio da endocitose, desencadeando um transporte retrógrado dependente de microtúbulos para o corpo celular e o núcleo. Durante esse transporte neuronal, o envelope do vírus deve permanecer estável (BRIGUGLIO et al., 2020; DUBÉ et al., 2018).

O SARS-CoV-2 pode utilizar outras possíveis vias de nervos periféricos para chegar ao tronco cerebral e ao SNC, além do nervo olfatório. Duas dessas vias alternativas são a rede pulmonar e o sistema nervoso entérico via nervo vago (BRIGUGLIO et al., 2020). O sistema gastrointestinal apresenta altos níveis de expressão de proteínas cruciais às quais o vírus se liga, incluindo NRP1 e ECA2. Essas proteínas também são expressas por células gliais e neurônios intestinais, tornando-os suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2. O nervo vago e as fibras nervosas simpáticas, que conectam diretamente o sistema nervoso entérico ao SNC, apresentam potencial de disseminação da infecção para o SNC em modelos animais. No entanto, a força dessa ligação e a capacidade do vírus de se espalhar pelo eixo intestino-cérebro ainda requerem mais estudos em humanos. Como resultado de sua proximidade física com o SNC, o nervo olfatório é provavelmente a principal rota para a disseminação do SARS-CoV-2 em estágios iniciais (BODNAR et al., 2021; BRIGUGLIO et al., 2020; ZUO et al., 2020).

### 1.2.2. Rota de invasão hematogênica

A dispersão de partículas virais por via hematogênica é outra possível rota de infecção pelo SARS-CoV-2. Estudos revelam que até 40% dos pacientes com COVID-19 apresentam o SARS-CoV-2 em sua corrente sanguínea (ZHENG et al., 2020). Partículas virais circulantes têm o potencial de atravessar a BHE e entrar no tecido

cerebral (ZHANG et al., 2021). Os pericitos e as células endoteliais do cérebro contêm receptores ECA2 que facilitam essa entrada (CHEN et al., 2020). Organoides dos vasos humanos são suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2 de maneira dependente de ECA2, de acordo com investigações *in vitro* (CONSTANT et al., 2021). Em investigações clínicas, células endoteliais de diversos órgãos de pacientes com COVID-19 também apresentaram elementos virais, e micrografias eletrônicas das células endoteliais do cérebro revelaram a presença de proteínas semelhantes a vírus em seu interior (PANIZ-MONDOLFI et al., 2020; VARGA et al., 2020). Além disso, há evidências de que receptores alternativos do SARS-CoV-2, incluindo NRP1 e CD147, são amplamente expressos na vasculatura cerebral, o que pode facilitar essa via (IADECOLA; ANRATHER; KAMEL, 2020; TORICES et al., 2021). Além da pneumonia causada pela COVID-19 que leva à hipóxia, o aumento na liberação de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas poderiam aumentar a entrada viral e contribuir para a invasão do SNC pelo SARS-CoV-2 (TAY et al., 2020).

O plexo coroide e os órgãos circunventriculares são potenciais locais de infiltração no cérebro por partículas circulantes de SARS-CoV-2 (JACOB et al., 2020). O plexo coroide é uma estrutura seletivamente permeável que controla o transporte molecular na interface sangue com o SNC e auxilia na produção do líquido cefalorraquidiano (LCR) (YANG et al., 2020a). Pesquisas *in vitro* usando organoides demonstraram que as células do plexo coroide humano são altamente suscetíveis à infecção pelo SARS-CoV-2, uma vez que expressam ECA2 e TMPRSS2 (JACOB et al., 2020). No entanto, é possível que a quebra da barreira sangue-LCR devido à infecção do plexo coroide desempenhe um papel mais significativo no desenvolvimento dos sintomas neurológicos da COVID-19 (JACOB et al., 2020). Vale destacar que TMPRSS2 e ECA2 podem ser expressos nos órgãos circunventriculares, próximas ao terceiro e quarto ventrículo, especialmente no hipotálamo, o que poderia facilitar a entrada do SARS-CoV-2 no tecido e sua disseminação pelo cérebro (IADECOLA; ANRATHER; KAMEL, 2020; JACOB et al., 2020).

A disseminação de leucócitos infectados pelo vírus na corrente sanguínea e a subsequente penetração nos tecidos cerebrais representam um mecanismo potencial para que o vírus entre no SNC (BAIG et al., 2020). Esse processo, frequentemente chamado de "Cavalo de Troia", foi estudado no contexto dos vírus neurotrópicos, como o Vírus do Nilo Ocidental (PAUL et al., 2017). Dado que o SARS-CoV-2 pode infectar linfócitos, granulócitos, monócitos e suas derivadas, é plausível que ele possa

utilizar essa estratégia para infectar glóbulos brancos que expressam ECA2 e penetrar no SNC (BAIG et al., 2020; ZUBAIR et al., 2020). Isso, somado à inflamação sistêmica e à hipóxia durante a infecção, pode facilitar a infiltração de leucócitos através da BHE, aumentando a probabilidade de neuroinvasão do SARS-CoV-2 por meio desse mecanismo (ALQUISIRAS-BURGOS et al., 2021; BAIG et al., 2020; SEFIK et al., 2022).

### **1.3. “Tempestade de citocinas” e ativação de micróglia**

A COVID-19 desencadeia uma resposta inflamatória robusta conhecida como "tempestade de citocinas" no hospedeiro, caracterizada por níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa, interleucina-6 e interferon-gama (ALMUTAIRI et al., 2021; KOX et al., 2020). Essas citocinas desempenham um papel vital no controle da resposta imunológica e são liberadas pelas células do sistema imunológico, principalmente pelos leucócitos (KOX et al., 2020). Essas citocinas pró-inflamatórias são produzidas por macrófagos ativados e recrutam células do sistema imunológico para o local da infecção (YE; WANG; MAO, 2020). No SNC, a interleucina-6 é produzida por astrócitos e micróglia, e em alguns estudos, foi associada ao distúrbio da BHE, tornando-a mais permeável (ALMUTAIRI et al., 2021).

A invasão do SNC pelo SARS-CoV-2 leva à ativação de micróglia, que são consideradas marcadores de diversas condições neurológicas e inflamação no cérebro (ALMUTAIRI et al., 2021). Embora as células microgliais não sejam as únicas responsáveis pela inflamação cerebral (células imunológicas sistêmicas também podem iniciar a neuroinflamação liberando citocinas pró-inflamatórias que atravessam a BHE), elas respondem rapidamente às mudanças ambientais (ALMUTAIRI et al., 2021). Quando ativadas, as células microgliais não apenas englobam células danificadas, mas também liberam substâncias como ácido quinolínico, interleucinas, proteínas do sistema complemento e fator de necrose tumoral alfa (ALMUTAIRI et al., 2021; BOLDRINI; CANOLL; KLEIN, 2021). Níveis elevados de ácido quinolínico, que é um agonista do receptor N-metil D-aspartato, podem levar à neurotoxicidade, afetando a memória, o aprendizado, a neuroplasticidade e causando alucinações (BOLDRINI; CANOLL; KLEIN, 2021).

## 1.4. Efeitos indiretos no sistema nervoso

### 1.4.1. Quebra da barreira hematoencefálica

A BHE é uma barreira protetora que separa o SNC da circulação e regula a passagem de substâncias, protegendo-o de toxinas e patógenos (ZHAO et al., 2015). No entanto, evidências sugerem que o SARS-CoV-2 pode comprometer a integridade da BHE, levando a um aumento na permeabilidade (BAIG et al., 2020; BELLON et al., 2021). Estudos demonstraram que a PS do vírus pode comprometer a BHE, como demonstrado em um modelo artificial da BHE (BUZHDIYGAN et al., 2020). Complicações neurológicas em pacientes com COVID-19, como encefalopatia e convulsões, podem estar associadas à perturbação da BHE. A causa exata dessa perturbação, seja uma invasão direta do vírus ou uma resposta inflamatória, ainda é desconhecida.

A BHE é composta por células endoteliais cerebrais especializadas que possuem junções estreitas intercelulares e transporte molecular limitado, o que as distingue das células endoteliais em outros tecidos. A integridade da BHE pode ser comprometida tanto diretamente quanto indiretamente pela infecção por SARS-CoV-2. A presença do vírus nas células endoteliais microvasculares cerebrais e a expressão de receptores ECA2 e NRP1 nessas células sugerem lesões diretas na BHE (PELLEGRINI et al., 2020). No entanto, o estado hiperinflamatório induzido pelo vírus provavelmente é a causa mais provável da perturbação da BHE na COVID-19 (ALQUISIRAS-BURGOS et al., 2021; PELLEGRINI et al., 2020). Níveis elevados de fatores pró-inflamatórios, como interleucina-1, foram associados a disfunção da BHE, resultando em meningite e alterações na distribuição de proteínas de junção estreita (ALMUTAIRI et al., 2016).

A inflamação sistêmica, desencadeada por citocinas, desencadeia a superexpressão de diversas proteases, incluindo as metaloproteinases de matriz (ALQUISIRAS-BURGOS et al., 2021). Essas proteases desempenham um papel crucial nesse processo, degradando as junções estreitas e as proteínas da membrana basal associadas às células endoteliais. Inúmeros estudos têm investigado os efeitos prejudiciais das metaloproteinases de matriz desreguladas, destacando o papel fundamental delas em patologias do SNC, como edema cerebral, infiltração de leucócitos, hemorragias e agravamento das respostas inflamatórias (ALQUISIRAS-BURGOS et al., 2021). Citocinas pró-inflamatórias como fator de necrose tumoral alfa

e interleucina-1 estimulam a atividade da ciclo-oxigenase, resultando na produção de eicosanoides como prostaglandinas. As prostaglandinas mediadas pela ciclo-oxigenase-2 podem induzir a expressão de metaloproteinases de matriz, comprometendo a integridade das junções estreitas e da BHE. A liberação de prostaglandina E nas células endoteliais cerebrais pela ciclo-oxigenase-1 ou ciclo-oxigenase-2 pode ativar o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal, causando sintomas como febre e mal-estar (ERICKSON; BANKS, 2018; WU et al., 2015).

#### 1.4.2. Disfunção do SNC associada à hipóxia

A infecção pelo SARS-CoV-2 pode causar hipóxia, o que pode perturbar a BHE e contribuir para a infiltração de células imunes e proteínas sanguíneas, incluindo citocinas, no cérebro (ERICKSON et al., 2021). Essa perturbação é o resultado de insuficiência respiratória e circulatória, que leva à hipoxemia e lesão alveolar (SEREBROVSKA et al., 2020). As células e tecidos respondem à hipoxia ativando os fatores induzíveis por hipoxia, que desempenham um papel fundamental na regulação do metabolismo de oxigênio (SEREBROVSKA et al., 2020). A infecção pelo SARS-CoV-2 aumenta a expressão do fator induzível por hipóxia-1 em células imunes, causando a liberação de mais citocinas e resultando na síndrome da angústia respiratória aguda (TIAN et al., 2021). Além disso, a estabilização desse fator em células endoteliais microvasculares aumenta a transcrição de fator de crescimento endotelial vascular (*vascular endothelial growth factor*, VEGF) e integrinas, aumentando assim a permeabilidade vascular (ERICKSON et al., 2021).

O VEGF tem ampla distribuição no SNC e regula angiogênese, proliferação de células endoteliais e permeabilidade vascular (YIN et al., 2020). A hipoxia aumenta a expressão de fator induzível por hipóxia-1 e VEGF, o que perturba a BHE e permite que o SARS-CoV-2 invada o SNC (HOFFMANN et al., 2020). A inibição do fator induzível por hipóxia-1 pode aprimorar a estabilidade da BHE e reduzir a disfunção do SNC causada pelo SARS-CoV-2 (HOFFMANN et al., 2020). Pacientes com níveis de saturação de oxigênio acima de 90% têm uma taxa de sobrevivência mais alta, enquanto aqueles com níveis mais baixos de saturação de oxigênio podem necessitar de cuidados mais intensivos e terapias medicamentosas (ERICKSON et al., 2021).



### 1.4.3. Estado hipercoagulável

Vários estudos identificaram anormalidades na coagulação e complicações trombóticas como manifestações comuns da COVID-19 (AL-SAMKARI et al., 2020; KLOK et al., 2020; LEVI et al., 2020; LODIGIANI et al., 2020). Pacientes com COVID-19 frequentemente apresentam aumento no tempo de protrombina e níveis elevados de D-dímero, que os predispõem a eventos trombóticos vasculares (CONNORS; LEVY, 2020; DIVANI et al., 2020). Em um estudo realizado na China, níveis de D-dímero foram encontrados elevados em 46,4% dos pacientes, com uma taxa ainda maior em casos graves (GUAN et al., 2020). Pacientes com COVID-19 também relataram ocorrências de tromboembolismo e acidentes cerebrovasculares isquêmicos (DIVANI et al., 2020; LODIGIANI et al., 2020).

Há hipóteses de que a regulação negativa do ECA2 pelo SARS-CoV-2, a hipóxia induzida pela pneumonia e a liberação de vesículas extracelulares de neutrófilos possam contribuir para a etiologia da hipercoagulabilidade na COVID-19 (CHEN et al., 2022; DOMINGO et al., 2020). No entanto, a hiperplasia endotelial e uma resposta inflamatória mediada por macrófagos foram identificadas como duas das características mais proeminentes das manifestações pró-trombóticas associadas à COVID-19 (IBA et al., 2020). A infecção viral e uma resposta inflamatória vigorosa inibem as funções anticoagulantes e anti-inflamatórias do endotélio (IBA et al., 2020). A regulação negativa de fatores anticoagulantes em células endoteliais infectadas por vírus, juntamente com a produção excessiva de citocinas pró-inflamatórias, resulta em danos endoteliais e trombose (IBA et al., 2020).

A ativação do sistema de complemento também contribui para o estado inflamatório e hipercoagulável da COVID-19 (CONWAY; PRYZDIAL, 2020; FLETCHER-SANDERSJÖÖ; BELLANDER, 2020; NOOIJER et al., 2020). A infecção pelo SARS-CoV-2 desencadeia a ativação de várias vias do complemento, que culminam em uma cascata comum para produzir moléculas semelhantes a anafilatoxinas (NOOIJER et al., 2020). Esses componentes do complemento são poderosos ativadores de mecanismos inflamatórios e de coagulação, desempenhando um papel essencial na resposta imune inata contra infecções virais (NOOIJER et al., 2020). No entanto, uma função desregulada do sistema de complemento pode causar complicações tromboembólicas (NOOIJER et al., 2020).

#### 1.4.4. Neuropatias autoimunes

Com base em relatos de casos de várias neuropatias autoimunes associadas a COVID-19, foi sugerido que o SARS-CoV-2 pode potencialmente induzir efeitos autoimunogênicos, principalmente por meio de mimetismo molecular. A perda de tolerância imunológica a sítios antigênicos críticos em vários componentes neuronais pode levar a neuropatias autoimunes periféricas. Em outras palavras, o mimetismo molecular entre as proteínas do SARS-CoV-2 e vários autoantígenos de células humanas, incluindo aqueles no sistema nervoso, pode servir como um possível gatilho para a autoimunidade em vários órgãos na COVID-19. Essa hipótese é respaldada pela análise de compartilhamento de peptídeos entre o vírus e antígenos proteicos usando a ferramenta de alinhamento local básica de sequências. Regiões do SNP contêm neurônios que apresentam proteínas com epítopos semelhantes às proteínas do SARS-CoV-2, tornando-os capazes de induzir uma resposta autoimune. Além disso, existem evidências de autoimunidade induzida pelo SARS-CoV-2 no SNC (EHRENFELD et al., 2020; GUPTA; WEAVER, 2021).

A Síndrome de Guillain-Barré no contexto da COVID-19 tem sido observada como um fenômeno pós-infeccioso, provavelmente mediado pelo sistema imunológico, manifestando-se principalmente na sua forma clássica com disfunção sensoriomotora, mas também em raras variantes, como a síndrome de Miller Fisher, na qual insultos oculomotores e ataxia são mais comuns. Estudos do LCR nesses pacientes deram resultados negativos para o RNA do SARS-CoV-2 (ABU-RUMEILEH et al., 2021). Outras associações proeminentes de infecções por COVID-19 incluem paralisia do nervo facial (GUPTA et al., 2021). A COVID-19 também mostrou associações raras com a encefalomielite aguda disseminada. Esta condição associada às infecções por COVID-19 parecia ter um período de incubação mais longo após a infecção viral e afetar mais a população adulta em comparação com a encefalomielite aguda disseminada típica, que afeta crianças. Além disso, esses pacientes tiveram prognósticos mais desfavoráveis e maior mortalidade em comparação com pacientes com quadro típico (WANG et al., 2022).

### **1.5. Sintomas neurológicos na fase aguda da COVID-19**

A COVID-19 pode manifestar uma variedade de sintomas neurológicos em qualquer estágio da doença, independentemente da gravidade. Manifestações

neuroológicas agudas da COVID-19 podem incluir sintomas inespecíficos, como cefaleia, tontura, mialgia e fadiga. Sintomas mais específicos podem incluir anosmia e ageusia. Estudos mostram que a prevalência desses sintomas varia, com taxas de até 53% para anosmia e 44% para ageusia em alguns casos (TONG et al., 2020). É importante notar que a anosmia e a ageusia podem ser os sintomas iniciais da COVID-19, e, por vezes, os únicos, diferentemente de outras doenças respiratórias, onde a perda do olfato pode estar associada a rinite ou congestão nasal (ZUBAIR et al., 2020). Alguns estudos sugerem que a presença de anosmia e ageusia pode estar relacionada a uma forma mais leve da doença, mas há ceticismo sobre se isso ocorre devido ao fato de pacientes mais gravemente afetados não conseguirem perceber esses sintomas (LECHIEN et al., 2020; TALAVERA et al., 2020). Variantes subsequentes do SARS-CoV-2, como a ômicron, parecem estar associadas a taxas significativamente menores de anosmia e ageusia (VON BARTHELD; WANG, 2023), embora não esteja claro se isso se deve às altas taxas de vacinação na população estudada.

A cefaleia é outro sintoma inicial e comum da COVID-19 e se assemelha às dores de cabeça associadas a muitas infecções virais. Frequentemente, é acompanhada por outros sintomas, como febre e congestão nasal; portanto, não é um sintoma isolado. Em pacientes com COVID-19, a cefaleia tem uma tendência a persistir por mais de três dias e são frequentemente resistentes ao tratamento analgésico (AL-HASHEL et al., 2021). No entanto, em casos raros, a cefaleia pode ser um sintoma de maior gravidade, indicando doença cerebrovascular ou meningoencefalite associada à COVID-19. A fadiga foi outro sintoma comum e debilitante durante a doença aguda. A prevalência relatada estava em torno de 30%. No entanto, é provável que tenha sido subdiagnosticada devido à subjetividade das notificações (LIGUORI et al., 2020).

Os casos graves de COVID-19 têm maior probabilidade de desenvolver sintomas neurológicos, sendo a encefalopatia a manifestação mais comum (CHOU et al., 2021). Outras manifestações neurológicas graves parecem ser mais raras, incluindo acidente vascular cerebral isquêmico ou hemorrágico, convulsão, meningoencefalite, injúria hipóxico-isquêmica e síndrome de Guillain-Barré. A maioria dos estudos demonstra que o envolvimento neurológico no COVID-19 ocorre frequentemente em pacientes idosos, muitas vezes com história prévia de distúrbio neurológico e frequentemente em pacientes com fatores de risco vasculares (CHOU

et al., 2021; DIVANI et al., 2020). O acidente vascular cerebral isquêmico agudo foi relatado em pacientes jovens com COVID-19, que pode estar relacionado com distúrbios da coagulação (OXLEY et al., 2020). Vale ressaltar que o envolvimento neurológico parece estar uniformemente associado a piores desfechos, incluindo maior tempo de internamento na unidade de terapia intensiva, mortalidade e aumento da incapacidade nos sobreviventes.

Com base na análise dos potenciais mecanismos fisiopatológicos envolvidos nas manifestações neurológicas do SARS-CoV2, foi proposto um estadiamento da “NeuroCovid” (FOTUHI et al., 2020), conforme **Quadro 1**.

Quadro 1 - Proposta de estadiamento da NeuroCovid.

<b>Estágios</b>	<b>Estágio NeuroCovid I</b> (Leve ou Neuroinvasão)	<b>Estágio NeuroCovid II</b> (Moderado ou Depuração no SNC)	<b>Estágio NeuroCovid III</b> (Grave ou Resposta imunológica)
<b>Vias de infecção cerebral</b>	Nervo olfatório Corrente sanguínea	Tronco encefálico Centro respiratório cerebral	Cérebro Conexão de nervos dos pulmões com o cérebro
<b>Resposta inflamatória</b>	Baixa e controlada	Níveis elevados de citocinas	“Tempestade de citocinas” extrema
<b>Sintomas</b>	Perda do olfato ou do paladar Sintomas respiratórios leves ou ausentes	Acidentes vasculares cerebrais Vasculite nos músculos Fadiga Perda sensorial Visão dupla Tetraplegia, afasia Ataxia Sintomas respiratórios	Edema Injúria cerebral Delírio Encefalopatia Convulsões Hemorragia intracraniana Hipertensão Confusão Coma Perda de consciência Sintomas respiratórios graves
<b>Exame de Líquido cefalorraquidiano</b>	Positivo	Negativo	Positivo / Negativo
<b>Exame de swab nasofaríngeo</b>	Positivo	Positivo	Positivo

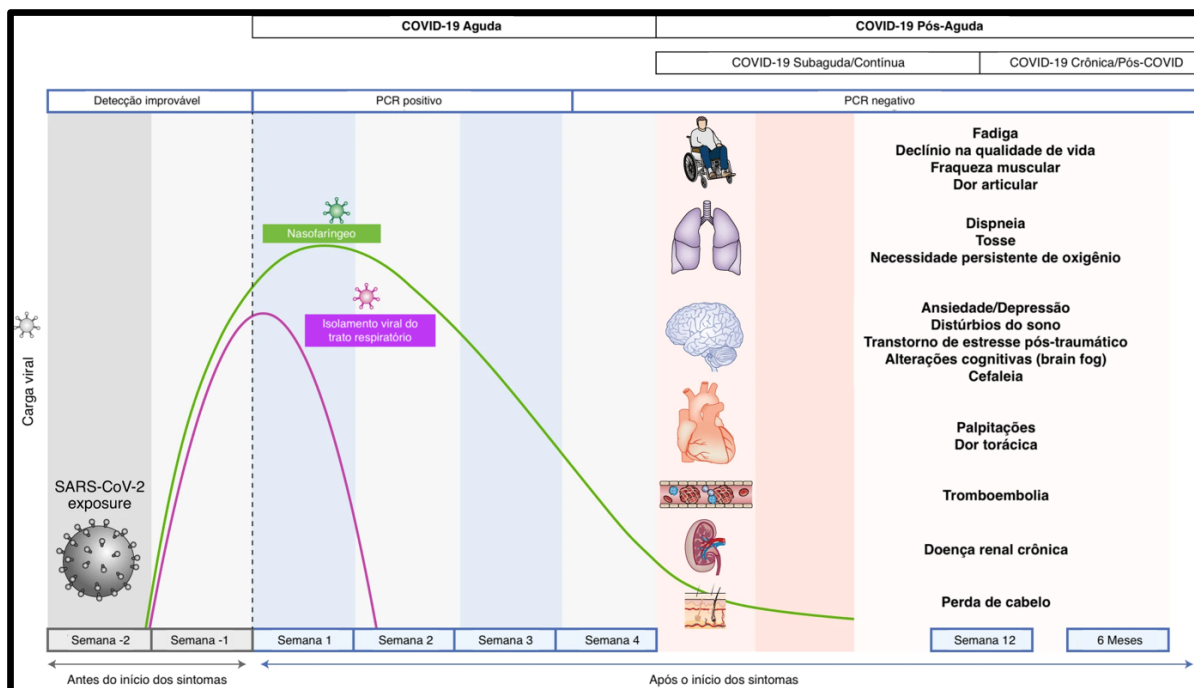
FONTE: Adaptado de FOTUHI et al., 2020.

## 1.6. COVID-19 Pós-Aguda

A maioria dos pacientes que sofrem da COVID-19 se recupera totalmente, mas alguns permanecem com efeitos de longo prazo em vários sistemas, principalmente os sistemas pulmonar, cardiovascular e nervoso, além de efeitos psicológicos (DENNIS et al., 2021). Esses efeitos parecem ocorrer independentemente da

gravidade inicial da infecção, com maior frequência no sexo feminino. O risco de sintomas persistentes é relatado como diretamente relacionado à idade (SORIANO et al., 2021). A fase aguda da COVID-19 geralmente dura até 4 semanas a partir do início dos sintomas. A COVID-19 Pós-Aguda é definida como sintomas persistentes e/ou complicações tardias ou de longo prazo além de 4 semanas a partir do início dos sintomas. Os sintomas comuns observados na COVID-19 Pós-Aguda estão resumidos na **Figura 2**. Esse grupo de sinais e sintomas pode ser denominado também como: síndrome de COVID longa, COVID longa, condição pós-COVID-19, COVID crônica, sequelas pós-agudas da infecção por SARS-CoV-2 e síndrome neurológica pós-COVID-19.

Figura 2 - Linha do tempo da COVID-19 Pós-Aguda.



FONTE: Adaptado de NALBANDIAN et al., 2021.

Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs a definição de condição pós-COVID-19 que ocorre em indivíduos com histórico de infecção por SARS-CoV-2, geralmente três meses após o início da COVID-19, com sintomas que duram pelo menos dois meses, mas não explicados por um diagnóstico alternativo (SORIANO et al., 2021). Os sintomas mais comuns são fadiga, falta de ar e disfunção cognitiva, bem como outros que frequentemente prejudicam a funcionalidade diária. Os sintomas podem aparecer após a recuperação de um episódio agudo de COVID-

19, persistir por um período prolongado (NALBANDIAN et al., 2021), flutuar ou recair ao longo do tempo (SORIANO et al., 2021). Não há sinais e sintomas específicos da condição pós-COVID-19 e pode ser difícil separar claramente dos sintomas da fase aguda da doença. Vale ressaltar que de acordo com a definição da OMS, a condição pós-COVID-19 pode incluir indivíduos com provável infecção por COVID-19, sem confirmação laboratorial, e isso pode criar dificuldades em cenários clínicos. Apesar da extensa pesquisa em andamento em todo o mundo, atualmente não existem metodologias de diagnóstico ou tratamentos claros para COVID-19 Pós-Aguda.

Ainda não se sabe se esta condição é uma apresentação contínua da fase aguda da COVID-19 ou uma condição patológica recente desenvolvida associada à infecção por SARS-CoV-2. Nas diretrizes do Instituto Nacional de Excelência em Saúde e Cuidados (*National Institute for Health and Care Excellence*), o termo COVID longa é comumente usado para descrever sinais e sintomas que continuam ou se desenvolvem após a fase aguda da COVID-19. Inclui COVID-19 sintomático contínuo (de 4 a 12 semanas) e síndrome pós-COVID-19 (12 semanas ou mais) (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE, 2022).

As manifestações clínicas da COVID-19 Pós-Aguda são altamente variáveis em termos de sintomas, intensidade e duração. Esses sintomas em curso se enquadram amplamente em duas categorias: respiratórios/cardiovasculares (por exemplo, tosse, dispneia, dor torácica) e neuropsiquiátricos (por exemplo, mal-estar ou fadiga, insônia e outros distúrbios do sono, disfunção cognitiva, cefaleia, perda do olfato ou paladar, depressão e ansiedade, transtorno de estresse pós-traumático, psicose). Dada a heterogeneidade dos sintomas, foi proposto que a COVID-19 Pós-Aguda pode não ser uma condição unificada e, em vez disso, reflete um grupo de fenótipos distintos ((REESE et al., 2023; THAWEETHAI et al., 2023). Entre essas sequelas neurológicas duradouras, a dificuldade cognitiva persistente conhecida como "brain fog" da COVID-19 tem sido amplamente relatada, podendo afetar funções cognitivas como atenção/concentração, velocidade de processamento, memória e função executiva (KUBOTA; KURODA; SONE, 2023; XU; XIE; AL-ALY, 2022).

### **1.7. Disfunção Cognitiva após COVID-19**

Numerosos sintomas gerais e neurológicos, como fadiga, mialgia, anosmia, disgeusia e comprometimento cognitivo (dificuldade de concentração e queixas de

memória), foram relatados após infecção por SARS-CoV-2 (GROFF et al., 2021). Muitos pacientes infectados podem desenvolver alterações neurológicas ou cognitivas, mesmo em coortes de pacientes não hospitalizados com sintomas leves (BECKER et al., 2021). A redução do desempenho foi descrita em atenção e memória de trabalho (GRAHAM et al., 2021), bem como em tarefas de raciocínio, resolução de problemas, planejamento espacial, velocidade de processamento (HAMPSHIRE et al., 2021), fluência verbal fonêmica e construção visuoespacial (MATOS et al., 2021). Apesar de várias tentativas de investigar as consequências neuropsicológicas da COVID-19, a natureza e as causas da disfunção cognitiva em todo o espectro de gravidade da doença permanecem controversos.

Testes de triagem cognitiva foram amplamente utilizados nas fases aguda e pós-aguda da COVID-19 (CRIVELLI et al., 2022; DE ALCÂNTARA et al., 2023; TAVARES-JÚNIOR et al., 2022). Um exame abrangente realizado em 49 pacientes com COVID-19, na maioria não hospitalizados, com idade média de 60 anos, mostrou pontuações mais baixas no Mini-Exame do Estado Mental em comparação com controles da mesma faixa etária, e 53% apresentaram comprometimento significativo em pelo menos um domínio cognitivo (atenção e função executiva, memória ou visuoespacial) usando uma bateria neuropsicológica mais abrangente 2–3 meses após a infecção (CECCHETTI et al., 2022). Uma revisão sistemática e meta-análise sobre o comprometimento cognitivo em pacientes recuperados da COVID-19 foi realizada, examinando 6.202 artigos, dos quais apenas 27 estudos, envolvendo 2.049 indivíduos, atenderam aos critérios de inclusão (CRIVELLI et al., 2022). Os resultados revelam uma prevalência significativa de comprometimento cognitivo em pacientes recuperados, tanto na fase aguda quanto durante o acompanhamento de curto prazo, até 6 meses após a infecção. Os domínios mais frequentemente afetados incluem atenção, memória e funções executivas. Surpreendentemente, essas deficiências foram observadas em diversas faixas etárias, independentemente da gravidade da infecção (CRIVELLI et al., 2022). Embora a maioria dos déficits cognitivos tenha sido leve, a persistência ao longo do tempo levanta preocupações, com possíveis implicações a longo prazo nos domínios cognitivos.

Pode-se argumentar que sobreviver a qualquer doença crítica pode resultar em comprometimento cognitivo duradouro (PANDHARIPANDE et al., 2013), e esse efeito relatado pode, portanto, não ser específico para a infecção por SARS-CoV-2. Para abordar essa questão, um estudo de caso-controle combinado (NERSESJAN et al.,

2022) encontrou que, em comparação com 60 pacientes não infectados emparelhados quanto ao status de internamento em unidade de terapia intensiva, 85 pacientes com COVID-19 tiveram pontuações significativamente mais baixas no teste de avaliação cognitiva de Montreal (*Montreal Cognitive Assessment*, MoCA) seis meses após a alta hospitalar, e mais pacientes com COVID-19 pontuaram abaixo do limite para o comprometimento cognitivo leve.

Durante a pandemia, houve grande interesse em testes cognitivos digitais, nos quais as pessoas completam testes informatizados remotamente. Em um estudo foi realizada uma série de testes cognitivos online em 81.337 pessoas (HAMPSHIRE et al., 2021). Desses, 12.689 pessoas foram confirmadas (n = 518) ou suspeitas de ter COVID-19, e a maioria havia sido infectada dois meses antes. Pessoas que se recuperaram da COVID-19, incluindo aquelas que não relataram mais sintomas, exibiram déficits cognitivos significativos versus controles quando controlados por idade, sexo, nível de escolaridade, renda, grupo étnico-racial, distúrbios médicos pré-existentes, cansaço, depressão e ansiedade. Os déficits tiveram uma dimensão de efeito substancial para as pessoas que tinham sido hospitalizadas, mas também para os casos não hospitalizados que tiveram confirmação biológica da infecção por SARS-CoV-2. Uma análise mais detalhada do desempenho em todos os subtestes apoiou a hipótese de que a COVID-19 tem um impacto em vários domínios na cognição humana. Independentemente da gravidade dos sintomas agudos, os domínios mais afetados foram o raciocínio analógico semântico e o planejamento em múltiplas etapas.

Alguns sobreviventes da COVID-19 podem apresentar déficits de atenção, função executiva e memória por mais de 3 meses (CECCHETTI et al., 2022; DOUAUD et al., 2022), e potencialmente até 2 anos se tiverem sintomas contínuos (CHEETHAM et al., 2023). A prevalência do comprometimento cognitivo crônico permanece incerta na população infectada. É importante ressaltar que, embora as funções cognitivas sejam medidas de forma independente, o comprometimento cognitivo em vários domínios é mais comum do que em um único domínio (CECCHETTI et al., 2022). No geral, os dados de testes objetivos indicam que, para a maioria dos indivíduos levemente a moderadamente infectados, a recuperação ocorre no primeiro ano após a infecção; no entanto, alguns podem experimentar algum grau de déficit cognitivo além de 1 ano, semelhante à trajetória dos sintomas autodeclarados de condição pós-COVID-19 (BALLOUZ et al., 2023). A presença de sintomas contínuos também pode



ser um fator-chave: um estudo de testes digitais que acompanhou 101 pacientes autodeclarados com condição pós-COVID-19 por 9 meses não encontrou sinais de recuperação na cognição ao longo desse período, e o comprometimento cognitivo ainda era evidente mesmo 2 anos após a infecção (CHEETHAM et al., 2023).

#### 1.7.1. Fatores de risco para o comprometimento cognitivo

A gravidade aguda da COVID-19 é o fator de risco mais forte para o declínio cognitivo progressivo ao longo de 1 ano, seguido de hipertensão, doença coronariana e doença pulmonar obstrutiva crônica, de acordo com um estudo longitudinal com 1.458 pacientes infectados com mais de 60 anos (LIU et al., 2022). Com relação a sintomas específicos, indivíduos com hiposmia e disgeusia durante a fase aguda tiveram menos recuperação das funções de memória após a infecção em comparação com aqueles sem esses sintomas (CECCHETTI et al., 2022). A idade também desempenha um papel no comprometimento cognitivo após COVID-19 (BASELER et al., 2022; DOUAUD et al., 2022). No entanto, algumas evidências apontam para um desempenho pior em adultos jovens e de meia-idade em comparação com adultos mais velhos (BASELER et al., 2022). Atualmente, não podemos descartar a hipótese de que distintos mecanismos possam influenciar o desempenho cognitivo em diferentes faixas etárias.

Devido a uma combinação de taxas reduzidas de detecção do SARS-CoV-2, menor prevalência de queixas cognitivas e dificuldades na realização de testes cognitivos objetivos, a literatura sobre o impacto da COVID-19 na cognição de crianças e adolescentes é menos extensa. A taxa de incidência de sintomas cognitivos após 6 meses da infecção ( $n = 185.748$ ) foi de aproximadamente 1% nessa população, em comparação com 6% em pessoas com mais de 65 anos ( $n = 242.101$ ) (HARRISON; TAQUET, 2023). A ausência de sintomas cognitivos nem sempre indica uma função cognitiva normal, o que requer investigações adicionais. Adultos mais velhos (maior que 65 anos) têm um risco maior de receber um diagnóstico de demência 2 anos após a infecção inicial em comparação com adultos mais jovens (TAQUET et al., 2022). Foram identificadas taxas mais elevadas de demência entre os participantes que foram hospitalizados devido a infecções, respaldando a hipótese de que as infecções estão associadas a um maior risco de desenvolvimento de demências (BOHN et al., 2023).

### 1.8. Disfunção Olfativa após COVID-19

A disfunção olfativa pode apresentar gravidade variável, incluindo anosmia, hiposmia e parosmia, e afeta 30% a 70% dos pacientes com COVID-19 (AGYEMAN et al., 2020). A disfunção olfativa ocorre de forma precoce no curso da infecção, sem associação direta com a gravidade da doença ou carga viral (LECHIEN et al., 2021). Em um estudo, foi registrado como o primeiro sintoma de apresentação clínica em aproximadamente 12% dos pacientes (SAYIN; YAŞAR; YAZICI, 2020). Na maioria dos casos, os sintomas desaparecem espontaneamente em 3 a 4 semanas (LECHIEN et al., 2021; XYDAKIS et al., 2020). Mesmo assim, um subconjunto de pacientes desenvolveu comprometimento olfativo persistente até 12 meses após a infecção (LECHIEN et al., 2021), sugerindo que a lesão do sistema olfatório pode ser grave ou permanente.

O mecanismo subjacente à disfunção olfativa na COVID-19 é atualmente desconhecido. Várias hipóteses sobre lesão celular direta e inflamação secundária à infecção viral da via olfatória foram propostas (DE MELO et al., 2021; MEINHARDT et al., 2021). A teoria mais notável é a infecção por SARS-CoV-2 de neurônios receptores olfatórios através da mucosa nasal. No entanto, há evidências conflitantes sobre se o SARS-CoV-2 é capaz de infectar estes neurônios (KHAN et al., 2021). Embora os receptores da ECA2 sejam expressos por células de suporte não neuronais no epitélio olfatório, eles não são expressos em células neurais, o que pode explicar a rápida recuperação da função olfativa em muitos pacientes (BRANN et al., 2020). Em um estudo recente, foi evidenciada que a infecção por SARS-CoV-2 está associada a alterações axonais e microvasculopatia nos bulbos e tratos olfatórios, principalmente em pacientes com alterações olfativas, sem evidência de lesão viral direta, que poderia estar relacionada à inflamação local (HO et al., 2022).

As hipóteses atualmente viáveis que visam explicar a anosmia na COVID-19 podem ser divididas em duas grandes categorias que não são mutuamente exclusivas (BUTOWT; BILINSKA; VON BARTHELD, 2023):

- (i) eliminação de células de suporte com consequências para a função neuronal:
  - (a) redução ou alteração do muco que cobre o epitélio olfatório;

- (b) perda de energia (glicose) que normalmente alimenta os cílios olfatórios, devido à morte das células sustentaculares e das células da glândula de Bowman; e
  - (c) retração dos cílios olfatórios devido à morte das células sustentaculares e perda de um fator de manutenção dos cílios;
- (ii) respostas imunes do hospedeiro que afetam a função dos neurônios receptores olfatórios:
- (a) regulação negativa da expressão gênica para receptores odoríferos (e outras moléculas de sinalização) em neurônios receptores olfatórios; e
  - (b) inflamação e destruição do epitélio olfatório causada por citocinas imunes, incluindo perda ou dano de neurônios receptores olfatórios.

A variante ômicron do SARS-CoV-2 causa menor prevalência de disfunção quimiossensorial e isso foi confirmado por estudos subsequentes de grande coorte. A média agrupada é de aproximadamente 13%, o que representa uma redução de três a quatro vezes em relação à prevalência de anosmia causada pelas variantes alfa e delta (35–50%). A variante ômicron é mais hidrofóbica e, portanto, pode ser menos solúvel no muco, possivelmente resultando em menos vírions atingindo as células de suporte. Em segundo lugar, a ômicron tem uma menor eficiência de entrada em células que expressam TMPRSS2, aparentemente devido à clivagem menos eficiente da furina, resultando em menor atividade de fusão da membrana e uma mudança em direção à entrada celular através da via endossomal. Ômicron parece ser menos eficiente na infecção dessas células, resultando em menor frequência de anosmia (VON BARTHELD; WANG, 2023).

Alguns pacientes que foram infectados com SARS-CoV-2 apresentam déficits duradouros e provavelmente permanentes na capacidade de cheirar. Um estudo inicial descobriu que cerca de um terço dos pacientes re-testados objetivamente com o Teste de Identificação de Olfato da Universidade da Pensilvânia continuou a apresentar disfunção 6 a 8 semanas após o início dos sintomas. Os estudos sugerem que aproximadamente um quarto a um terço das pessoas infectadas com o vírus SARS-CoV-2 continuam a ter algum grau de disfunção olfativa mensurável durante meses após a infecção. Com base em pacientes que se recuperam de disfunção olfativa de outros vírus e distúrbios, a quantidade de recuperação a longo prazo,

quando ocorrer, provavelmente dependerá de fatores como a idade do sujeito e a quantidade de perda inicial (BOSCOLO-RIZZO et al., 2022).

## 1.9. Neuroimagem na COVID-19

### 1.9.1. Avaliação estrutural, microestrutural e funcional cerebral com ressonância magnética

Anormalidades cerebrais têm sido relatadas agudamente em pacientes com COVID-19, possivelmente secundárias a insultos micro e macrovasculares, causas infecciosas, inflamatórias ou autoimunes (LIN et al., 2020; PATERSON et al., 2020). Entretanto, a imagem de ressonância magnética (*magnetic resonance imaging*, MRI) é normal na maioria dos casos, mesmo em pacientes com COVID-19 internados em hospitais com sintomas neurológicos agudos (KIM et al., 2021). Um estudo quantitativo de imagem de ressonância magnética ponderada na difusão (*diffusion-weighted magnetic resonance imaging*, d-MRI) revelou uma redução dos volumes intra e extra-axonais e um aumento significativo na fração de água livre, sugestivo de edema vasogênico em 20 pacientes hospitalizados, sendo mais acentuado nas regiões frontoparietais, em média, 30 dias após o início da COVID-19 (RAU et al., 2022). Esse tipo de edema está comumente relacionado a um aumento na permeabilidade da BHE, contudo, é reversível. Nesse contexto, outro estudo com 58 pacientes hospitalizados com COVID-19 encontrou um aumento na difusividade média tanto na radiação talâmica quanto no estrato sagital 2-3 meses após o início da doença (RAMAN et al., 2021).

As características de imagem cerebral na COVID-19 Pós-Aguda também foram examinadas. Medidas de tratometria e MRI baseada em volume em pacientes 3 meses após a COVID-19 mostraram alterações na métrica da microestrutura da substância branca, especialmente nos sistemas frontal e límbico, em casos leves e graves (QIN et al., 2021). Em uma grande amostra do estudo UK Biobank, a infecção por SARS-CoV-2 foi associada a alterações na estrutura cerebral (DOUAUD et al., 2022). Este estudo examinou 401 pessoas que tiveram MRI cerebral inicial, mas testaram positivo para SARS-CoV-2 posteriormente, em média 141 dias antes da segunda MRI, e as comparou com 384 controles não infectados (DOUAUD et al., 2022). Os participantes que tiveram infecção por SARS-CoV-2 apresentaram um declínio cognitivo mais significativo entre os dois momentos e uma redução maior no

volume global do cérebro. Esse estudo revelou ainda uma redução na espessura cortical em áreas cerebrais correlacionadas funcionalmente com o córtex olfatório primário, como o giro para-hipocampal, córtex orbitofrontal, córtex cingulado anterior, polo temporal, ínsula e giro supramarginal, em pessoas que tiveram COVID-19. Foram observadas mudanças proeminentes nos marcadores de dano tecidual em regiões cerebrais funcionalmente ligadas ao córtex olfatório primário (córtex orbitofrontal, córtex cingulado anterior, ínsula e amígdala) 5 meses após a infecção (DOUAUD et al., 2022).

A d-MRI gera três famílias de métricas potencialmente úteis para investigar alterações microestruturais na substância branca cerebral após COVID-19. A primeira, medidas de imagem de tensor de difusão (*diffusion tensor imaging*, DTI) baseada em voxel, relaciona-se ao *eigenvector* principal e *eigenvalue* do tensor unidirecional elíptico (BASSER; MATTIELLO; LEBIHAN, 1994; PIERPAOLI et al., 1996). A segunda, métricas de imagem de água livre (*free water*, FW), permite a diferenciação de alterações teciduais, separando a contribuição da água extracelular em difusão livre do componente tecidual (PASTERNAK et al., 2009). A FW extracelular pode indicar alterações causadas por patologias como neuroinflamação, atrofia ou edema. A terceira, métricas de densidade de fibra aparente (*apparent fiber density*, AFD), derivada da deconvolução esférica restrita (*constrained spherical deconvolution*, CSD) (TOURNIER; CALAMANTE; CONNELLY, 2007), representam medidas indiretas de degeneração axonal, refletindo um número aparente de axônios (RAFFELT et al., 2017).

Usando processamentos avançados das d-MRI (imagens por curtos de difusão e de dispersão e densidade de neuritos), um estudo mostrou redução de densidade axonal cerebral em pacientes um ano após a recuperação de COVID-19, no entanto, a amostra consistiu principalmente de pacientes hospitalizados (HUANG et al., 2021). A coroa radiada, o joelho do corpo caloso e o fascículo longitudinal superior estavam envolvidos, e os pacientes internados na unidade de terapia intensiva apresentaram maior envolvimento do corpo caloso (HUANG et al., 2021). Um estudo com 84 pacientes que apresentam COVID-19 Pós-Aguda após 1 ano mostrou redução do volume dos hipocampos, especialmente em pacientes hospitalizados, e relatou uma associação entre os volumes da cabeça do hipocampo e o desempenho em testes cognitivos (DÍEZ-CIRARDA et al., 2023b).

Em diferentes modalidades de imagem, foi encontrada uma associação entre comprometimento cognitivo e os achados cerebrais. Um estudo recente de MRI multimodal em 86 pacientes com síndrome pós-COVID, que em média foram infectados há 11 meses (33% previamente hospitalizados), encontrou uma redução na conectividade funcional em repouso entre as regiões para-hipocampais, bem como entre o córtex orbitofrontal e o cerebelo, e as mudanças na conectividade funcional no córtex orbitofrontal estavam associadas ao desempenho de memória (DÍEZ-CIRARDA et al., 2023a). Déficits cognitivos, incluindo funções executivas, também foram associados à atrofia da substância cinzenta nessas áreas (DÍEZ-CIRARDA et al., 2023a; RAU et al., 2022) e a alterações na substância branca (CECCHETTI et al., 2022; RAU et al., 2022). Além disso, a saúde mental também pode estar relacionada a achados anormais nas imagens desses pacientes. Uma investigação com 42 pacientes hospitalizados com COVID-19 relatou que, aos 3 meses, a gravidade da depressão estava correlacionada com a atrofia no córtex cingulado anterior, enquanto os sintomas pós-traumáticos estavam relacionados com os volumes do córtex cingulado anterior e ínsula; ambos os sintomas estavam associados a danos microestruturais na substância branca em várias vias e a marcadores inflamatórios no sangue (BENEDETTI et al., 2021). Esses achados de neuroimagem refletem as complexas associações entre sintomas de saúde mental e cognição.

#### 1.9.2. Avaliação funcional cerebral com tomografia por emissão de pósitrons

Existem alguns relatos de alterações no metabolismo cerebral observadas em pacientes com diagnóstico confirmado de infecção por SARS-CoV-2. Foi identificado hipometabolismo com predomínio frontoparietal em exames de tomografia por emissão de pósitrons com fluorodesoxiglicose (*fluorodeoxyglucose positron emission tomography*, FDG-PET) após COVID-19, em média 31 dias após o início dos sintomas (HOSP et al., 2021). Houve forte correlação desse padrão com o desempenho cognitivo no MoCA (HOSP et al., 2021).

Um padrão de hipometabolismo frontoparietal em FDG-PET tem sido consistentemente relatado em pacientes com COVID-19 que apresentam sintomas neurológicos agudos (BLAZHENETS et al., 2021; HOSP et al., 2021; KAS et al., 2021; MARTINI et al., 2022). Dados transversais na fase crônica, bem como análises longitudinais, mostram que isso tende a se resolver ao longo do tempo, e havia um

hipometabolismo residual mínimo ou ausente após cerca de 6 meses (BLAZHENETS et al., 2021; MARTINI et al., 2022). Outras áreas que foram encontradas envolvidas incluem o tálamo, ínsula e lobo temporal medial, incluindo o giro para-hipocampal (GUEDJ et al., 2021; MORAND et al., 2022). O cerebelo, a ponte e o tronco cerebral mostraram tanto hipermetabolismo (BLAZHENETS et al., 2021; KAS et al., 2021; MARTINI et al., 2022) quanto hipometabolismo (GUEDJ et al., 2021; MORAND et al., 2022).

Os achados metabólicos cerebrais em sete pacientes pediátricos, com idade média de 12 anos e sintomas persistentes por mais de quatro semanas após o diagnóstico de COVID-19, foram confrontados com aqueles obtidos em pacientes adultos com COVID-19 Pós-Aguda. Os sintomas mais frequentemente relatados em crianças foram fadiga e comprometimento cognitivo, como dificuldades de memória e concentração. Apesar de uma gravidade inicial mais baixa na fase aguda da infecção, os pacientes pediátricos demonstraram, em média cinco meses depois, um padrão hipometabólico cerebral semelhante ao encontrado em pacientes adultos com COVID longa, envolvendo lobos temporais mediais (amígdala, uncus e giro para-hipocampal), ponte e cerebelo (MORAND et al., 2022). O envolvimento proeminente de uma rede frontoparietal na imagem de FDG-PET seria consistente com os prejuízos na atenção e na função executiva relatados nesses pacientes (TONIOLO et al., 2021).

### 1.9.3. Avaliação dos bulbos olfatórios e do sistema olfatório

A disfunção olfativa durante ou após a COVID-19 representa um marcador de doença neurológica e pode ser avaliada com imagem do nervo olfatório. A MRI pode ajudar a avaliar pacientes com anosmia e hiposmia, uma vez que permite a visualização detalhada e a medição das estruturas anatômicas olfatórias. No entanto, os estudos que descrevem as mudanças anatômicas baseadas em MRI nas estruturas olfatórias na COVID-19 são escassos e principalmente representados por relatos de casos (TAN et al., 2022).

No SNC, o bulbo olfatório é um ponto importante no circuito neural olfativo. A análise de imagens revelou diferenças significativas no volume dos bulbos olfatórios em pacientes com COVID-19 e perda de olfato em comparação com controles normais. Alguns pacientes apresentaram anormalidades estruturais nos bulbos olfatórios, como assimetria esquerda-direita, alterações na forma e anormalidades de sinal (CHIU et al., 2020; FÁTIMA ARAGÃO et al., 2020; KANDEMIRLI et al., 2021).

Esses achados são consistentes com a ideia de que o SARS-CoV-2 pode invadir a mucosa olfatória e ter acesso ao SNC, levando a alterações estruturais nos bulbos olfatórios (Meinhardt et al., 2020; Khan et al., 2021).

Estudos relataram que pacientes com COVID-19 e anosmia apresentaram volumes reduzidos nos bulbos olfatórios, indicando uma possível ligação entre alterações nos bulbos olfatórios e o desenvolvimento de anosmia (ALTUNISIK et al., 2021; TAN et al., 2022; THUNELL et al., 2022). Uma redução nos bulbos olfatórios foi descrita em 36 participantes que tiveram disfunção olfativa devido à COVID-19 em comparação com um grupo de controle 2 a 8 semanas após a infecção (ALTUNISIK et al., 2021) e em 196 indivíduos que tiveram COVID-19 em comparação com controles de 1 a 582 dias após o início da doença (CAPELLI et al., 2023). A associação entre a atrofia dos bulbos olfatórios e a gravidade da disfunção olfativa não foi avaliada nestes estudos. A base para a diminuição do volume do bulbo olfatório não é clara. Contudo, tal diminuição não precisa ser devida à invasão viral direta do bulbo olfatório. O dano às células receptoras do epitélio olfatório pode levar à diminuição do volume do bulbo olfatório, possivelmente devido à perda de fatores tróficos que resultam na diminuição do número de axônios das células receptoras que se conectam a ele.

Além disso, em um estudo de MRI, as medidas de conectividade estrutural e funcional foram significativamente aumentadas nos indivíduos previamente infectados pelo SARS-CoV-2 em comparação com controles. O maior comprometimento olfativo residual foi associado a um processamento mais segregado em regiões mais funcionalmente conectadas ao córtex piriforme anterior (ESPOSITO et al., 2022). Em outro estudo funcional, foi identificado aumento da conectividade cerebral entre o córtex orbitofrontal e o córtex de associação visual e giro fusiforme no grupo de anosmia após COVID-19 (WINGROVE et al., 2023). Pode-se levantar a hipótese de que a ausência de entrada olfativa para essas áreas parietais multissensoriais altera a constelação neuronal e promovem uma integração multissensorial mais eficiente da percepção visual e auditiva. De qualquer forma, o impacto nas conexões cerebrais da disfunção olfativa após COVID-19 é relativamente desconhecido, especialmente nas regiões sensoriais e relacionadas ao olfato.



## 2. JUSTIFICATIVA

Após mais de três anos, o mundo ainda se recupera da pandemia da COVID-19, e embora as pesquisas tenham inicialmente se concentrado nos aspectos agudos, tornou-se claro que existem consequências neurológicas a longo prazo. Muitos sobreviventes enfrentam sintomas neurológicos persistentes, gerando impactos socioeconômicos e pessoais significativos. Portanto, é crucial compreender as síndromes clínicas em evolução e os mecanismos subjacentes para implementar intervenções terapêuticas baseadas em evidências e atender às necessidades dos pacientes afetados pelos efeitos duradouros da COVID-19.

Vários mecanismos que contribuem para o desenvolvimento de manifestações neurológicas foram propostos: invasão neurotrópica do vírus, disfunção endotelial, hiperinflamação, hipercoagulabilidade, hipóxia e agravamento da doença. Ainda há muito a ser explorado para uma compreensão completa da patogenicidade do SARS-CoV-2 e de seus efeitos diretos e indiretos no sistema nervoso. As pesquisas em neuroimagem desempenham um papel crucial no entendimento das manifestações neurológicas da COVID-19, pois ajudam a visualizar e analisar as alterações no SNC e SNP em pacientes afetados pelo vírus. Algumas das técnicas de neuroimagem mais utilizadas incluem a ressonância magnética e a tomografia por emissão de pósitrons, que proporcionam informações detalhadas sobre a estrutura e a função do cérebro.

Considerando que há poucos estudos que avaliaram a microestrutura da substância branca, a espessura cortical, o volume das estruturas subcorticais e límbicas e o volume dos bulbos olfatórios após COVID-19, as técnicas quantitativas de MRI podem fornecer informações relevantes. Nesse sentido, as técnicas avançadas de d-MRI como AFD e FW podem ser ferramentas relevantes para investigar os tratos de substância branca e o sistema olfatório, o que pode permitir novos entendimentos sobre os danos neurológicos causados pela infecção por SARS-CoV-2, sobretudo nas disfunções cognitiva e olfativa relacionadas à COVID-19. Além disso, o estudo de conectividade estrutural a partir de d-MRI pode ser usado para explorar mudanças na rede de substância branca com base na teoria dos grafos. A relação entre o olfato e as métricas da rede cerebral é íntima. No entanto, ainda há necessidade de explorar mais as mudanças na rede de substância branca na hiposmia não neurodegenerativa. O uso da teoria dos grafos para entender as

mudanças na rede de substância branca pode ajudar a elucidar os mecanismos subjacentes da disfunção olfativa.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Geral**

Investigar alterações na espessura cortical, no volume da substância cinzenta, no volume dos bulbos olfatórios e anormalidades microestruturais na substância branca cerebral após COVID-19 em comparação com o grupo controle.

#### **3.2. Específicos**

- Avaliar o grau de fadiga e o desempenho cognitivo e olfativo no grupo COVID-19 em comparação com o grupo controle.
- Investigar se existe associação entre dados de d-MRI, fadiga, desempenho cognitivo e olfativo no grupo COVID-19.
- Investigar conectividade estrutural das regiões relacionadas ao sistema olfatório, a partir do tratograma de cérebro inteiro, no grupo com hiposmia persistente após COVID-19 em comparação com o grupo controle.
- Identificar se existe associação entre volume dos bulbos olfatórios e o desempenho olfativo no grupo COVID-19.
- Investigar se existe associação entre medidas de conectividade estrutural e o desempenho olfativo no grupo COVID-19.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília (Parecer: 4.206.706, CAAE: 31378820.1.2006.0030) (**Anexo A**). Todos os procedimentos seguem as diretrizes e os regulamentos atuais, como a Declaração de Helsinque. Os participantes assinaram um termo de consentimento.

### 4.2. Delineamento e contexto

Trata-se de estudo analítico prospectivo transversal observacional. Os participantes foram recrutados entre outubro de 2020 e maio de 2021 em Brasília, Brasil, de uma população de profissionais de saúde e pacientes atendidos no Hospital Universitário de Brasília, antes da implementação de campanhas de vacinação em massa, com estratégia de amostragem não probabilística. Durante o período de recrutamento, que corresponde aproximadamente à predominância das variantes alfa e gama no Brasil, foi realizado contato telefônico consecutivo com uma lista de 364 pacientes para convidá-los a participar do estudo. Esses pacientes foram diagnosticados com COVID-19 por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa da transcrição reversa em tempo real (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). No decorrer da pesquisa, houve um constante acompanhamento dos participantes, realizado por meio de comunicações via telefone, WhatsApp ou e-mail. Isso foi feito com o propósito de coletar informações, agendar avaliações presenciais e marcar exames de imagem.

Este estudo foi realizado como parte do Registro Brasileiro NeuroCOVID-19 (NEUROCOVBR STUDY GROUP, 2020). O estudo foi executado em centro único, coordenado na Universidade de Brasília, Faculdade de Medicina, localizada no Campus Darcy Ribeiro. Para sua execução, houve colaboração técnico-científica entre as seguintes instituições: Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital Santa Marta (ISMEP, Taguatinga, Distrito Federal), Instituto Brasileiro de Neuropsicologia e Ciências Cognitivas (IBNeuro, Brasília, Distrito Federal), Universidade Estadual de Campinas (Instituto Brasileiro de Neurociências e Neurotecnologia – BRAINN, Campinas, São Paulo) e Universidade de Sherbrooke (Laboratório de Imagem de Conectividade de Sherbrooke - SCIL, Canadá).

### 4.3. Participantes

O estudo envolveu um grupo de pacientes diagnosticados com COVID-19 e um grupo de participantes que não tinham a condição (grupo controle). Os critérios de inclusão para o grupo COVID-19 foram (a) diagnóstico de infecção por SARS-CoV-2 confirmado pela detecção de RNA viral por teste RT-qPCR de um swab nasofaríngeo, (b) pelo menos um sintoma relacionado a COVID-19 durante a fase aguda da infecção e (c) 18 a 60 anos de idade. Os pacientes foram avaliados pelo menos 4 semanas após o diagnóstico de COVID-19 (fase pós-aguda) (NALBANDIAN et al., 2021). O grupo controle foi recrutado da mesma população (pacientes ou profissionais de saúde do Hospital Universitário de Brasília) por meio de amostragem por conveniência, com pareamento por idade, sexo e escolaridade. Os indivíduos do grupo controle não foram previamente infectados com SARS-CoV-2 e tiveram um teste SARS-CoV IgG/IgM negativo.

Os critérios de exclusão para ambos os grupos foram (a) distúrbios estruturais cerebrais pré-existentes (acidente vascular cerebral, epilepsia, esclerose múltipla, neoplasia, hidrocefalia, traumatismo cranioencefálico, doença de Parkinson e demência), (b) doenças psiquiátricas graves, (c) internação hospitalar prévia com tratamento em unidade de terapia intensiva e necessidade de ventilação mecânica e (d) analfabetismo.

Cada participante assinou um termo de consentimento e passou por exames clínicos, cognitivos e de ressonância magnética. Todos os procedimentos foram realizados na mesma visita. Todos os procedimentos seguiram as regulamentações vigentes.

#### 4.3.1. Participantes com hiposmia persistente relacionada à COVID-19

Uma análise de subgrupo foi conduzida com pacientes do grupo COVID-19 que tiveram hiposmia subjetiva persistente relacionada à infecção por SARS-CoV-2. A comparação foi realizada com participantes do grupo controle que tinham função olfativa preservada. Cabe destacar que os pacientes com uma pontuação global no MoCA menor que 15 foram excluídos desta análise (CESAR et al., 2019; NASREDDINE et al., 2005).

#### 4.4. Variáveis demográficas, avaliação clínica e neuropsicológica

Os dados demográficos e clínicos foram coletados por meio de formulários eletrônicos (<https://pt.surveymonkey.com/r/PCR-COVID>) (**Anexo B**). Idade, escolaridade e sexo e uma lista de comorbidades foram coletadas durante a anamnese com o objetivo de identificar possíveis variáveis de confusão. Sintomas neurológicos, quimiossensoriais, respiratórios e constitucionais foram avaliados. Os participantes relataram sintomas que ocorreram durante as fases aguda e pós-aguda da COVID-19.

##### 4.4.1. Escala de fadiga

A Escala de Fadiga de Chalder (*Chalder Fatigue Scale*, CFQ-11) (CHALDER et al., 1993; JACKSON, 2015) foi aplicada em todos os participantes. A CFQ-11 é um questionário autoaplicável frequentemente usado em populações clínicas e não clínicas para avaliar a gravidade e extensão da fadiga. É dividido em duas dimensões: fadiga física (questões 1 a 7) e fadiga mental (questões 8 a 11). A CFQ-11 utiliza um formato de escala Likert e a pontuação global pode variar de 0 a 33 (CHALDER et al., 1993; JACKSON, 2015).

Com base em um ponto de corte predefinido no escore total da CFQ-11, igual ou superior a 16, os participantes foram categorizados em dois grupos distintos: aqueles sem fadiga e aqueles com fadiga aumentada (CELLA; CHALDER, 2010; NØSTDAHL et al., 2019).

##### 4.4.2. Teste olfativo

O teste olfativo de identificação Sniffin' Sticks (SS-16) foi utilizado para avaliar a habilidade dos participantes em identificar odores. É um teste olfativo psicofísico, desenvolvido por Burghardt® (Wedel, Alemanha) e adaptado à versão brasileira do SS-16 (SILVEIRA-MORIYAMA et al., 2008), composto por 16 canetas preenchidas com odorantes comuns e familiares (HUMMEL et al., 1997). As canetas medem 14 cm de comprimento e têm um diâmetro interno de 1,3 cm. Estas canetas têm uma tampa de 4 mL cheia de líquidos inodoros ou odoríferos dissolvidos em propilenoglicol. Para evitar uma possível contaminação cruzada viral entre indivíduos, empregamos o paradigma das "curvas de odor no papel". Nesse paradigma, um médico treinado realizava curvas em um pedaço de papel com canetas perfumadas. O participante foi

então solicitado a identificar o odor cheirado usando um paradigma de escolha forçada com quatro alternativas (**Quadro 2**). Cada estímulo foi separado por um intervalo de 20 a 30 segundos.

Quadro 2 - Tradução brasileira adaptada culturalmente para o teste olfativo de identificação Sniffin' Sticks (SS-16).

Item SS-16	Descritores de Odor	Item SS-16	Descritores de Odor
1	<b>laranja</b> , morango, amora, abacaxi	9	cebola, <b>alho</b> , repolho, cenoura
2	fumaça, <b>couro</b> , cola, grama	10	cigarro, vinho, <b>café</b> , fumaça
3	mel, chocolate, baunilha, <b>canela</b>	11	melão, laranja, pêssego, <b>maçã</b>
4	cebolinha, “pinho-sol”, <b>menta</b> , cebola	12	<b>cravo</b> , canela, pimenta, mostarda
5	coco, nozes, <b>banana</b> , cereja	13	pera, pêssego, ameixa, <b>abacaxi</b>
6	pêssego, <b>limão galego</b> , maçã, laranja lima	14	camomila, <b>rosa</b> , framboesa, cereja
7	<b>alcaçuz</b> , menta, cereja, bolacha	15	<b>anis</b> , mel, pinga, “pinho-sol”
8	mostarda, bala de menta, borracha, <b>solvente de tinta</b>	16	pão, queijo, <b>peixe</b> , presunto

Legenda: Os descritores de odor (resposta alvo e distratores) estão descritos em português brasileiro. As respostas corretas estão destacadas em negrito.

Usando um ponto de corte predefinido no escore total do SS-16 menor ou igual a 12, foi possível categorizar os participantes de maneira objetiva em hiposmia e normosmia. (HUMMEL et al., 2007).

#### 4.4.3. Avaliação Cognitiva de Montreal

Sob a supervisão de médicos treinados, todos os participantes realizaram o exame de triagem cognitiva MoCA (NASREDDINE et al., 2005). Este teste, que pode ser realizado com papel e caneta, é de aplicação rápida, levando até 10 minutos, e avalia um espectro de habilidades cognitivas, como habilidades visuoespaciais/executivas (0-5 pontos), nomeação (0-3 pontos), memória operacional (0-2 pontos), atenção (0-1 ponto), concentração/cálculo (0-3 pontos), repetição (0-2 pontos), fluência verbal (0-1 ponto), abstração (0-2 pontos), memória de curto prazo (0-5 pontos) e orientação temporal e espacial (6 pontos). Normas específicas para a população brasileira foram recentemente publicadas, levando em consideração estratificações por idade e nível de escolaridade (CESAR et al., 2019) (**Anexo C**).

#### 4.4.4. Avaliação Neuropsicológica Computadorizada Automatizada de Cambridge

A Avaliação Neuropsicológica Computadorizada Automatizada de Cambridge (CANTAB) foi aplicada usando *tablets* do tipo iPad e seguiu a seguinte sequência de subtestes: RTI, VRM, PAL, PRM, SWM e OTS, conforme descrito em estudos anteriores (ROBBINS et al., 1998; ROBBINS et al., 1994). Esta bateria avalia as funções executivas (*One Touch Stockings of Cambridge* - OTS), memória verbal (*Verbal Recognition Memory* - VRM), memória visual (*Paired Associates Learning* - PAL, *Pattern Recognition Memory* - PRM), memória de trabalho (*Spatial Working Memory*, SWM) e tempo de reação (*Simple and Five-choice Reaction time*, RTI).

Esses testes computadorizados são de fácil realização, têm padrões bem definidos e são independentes de fatores culturais. Além disso, existem dados normativos disponíveis internacionalmente que abrangem uma ampla faixa etária, de 4 a 90 anos. Eles são aplicados em um *tablet* com tela sensível ao toque. Uma das vantagens notáveis é a capacidade de ajustar a dificuldade dos testes, o que evita limitações no desempenho dos participantes. As principais variáveis cognitivas estão descritas na **Quadro 3**.

Quadro 3 - Principais medidas dos subtestes cognitivos da Avaliação Neuropsicológica Computadorizada Automatizada de Cambridge (CANTAB).

Abreviação	Nome da Medida Cognitiva	Descrição Resumida
<b>SWMBE</b>	Memória de Trabalho Espacial, erros entre tentativas	O número de vezes que um sujeito revisita erroneamente uma caixa onde um token já foi encontrado.
<b>SWMS</b>	Memória de Trabalho Espacial, estratégia	O número de vezes que um sujeito inicia um novo padrão de busca na mesma caixa em que começou anteriormente.
<b>OTSPSFC</b>	Meias de Toque Único de Cambridge, Problemas resolvidos na primeira escolha	O número total de tentativas avaliadas em que o sujeito escolheu a resposta correta em sua primeira tentativa.
<b>OTSMDLFC</b>	Meias de Toque Único de Cambridge, Média da latência para a primeira escolha	Média da latência, medida a partir do aparecimento das bolas nas meias até a primeira escolha da caixa, feita pelo sujeito.
<b>OTSMCC</b>	Meias de Toque Único de Cambridge, Média de escolhas até a correta	A média do número de seleções de caixa que o sujeito fez antes de escolher a caixa correta.
<b>OTSMLC</b>	Meias de Toque Único de Cambridge, Média da latência até a correta	Média da latência, medida a partir do aparecimento das bolas nas meias até a escolha da caixa correta, feita pelo sujeito.

<b>PALTEA</b>	Aprendizado de Pares Associados, Erros totais ajustados	O número de vezes que o sujeito escolheu a caixa errada para um estímulo nos problemas de avaliação, mais um ajuste para o número estimado de erros que teriam ocorrido em quaisquer problemas, tentativas e recordações.
<b>PALFAMS</b>	Aprendizado de Pares Associados, Pontuação de memória na primeira tentativa	O número de vezes que o sujeito escolhe a caixa correta na primeira tentativa para lembrar sua localização.
<b>PALMETS</b>	Aprendizado de Pares Associados, Média de erros até o sucesso	A média do número de tentativas para completar uma etapa de teste.
<b>PRMPCI</b>	Memória de Reconhecimento de Padrões, Porcentagem de respostas corretas, imediatas	Número de padrões selecionados corretamente pelo sujeito na condição imediata de "escolha forçada", expressa como porcentagem.
<b>PRMPCD</b>	Memória de Reconhecimento de Padrões, Porcentagem de respostas corretas, atrasadas	O número de padrões selecionados corretamente pelo sujeito na condição de "escolha forçada" atrasada, expressa como porcentagem.
<b>VRMIRTC</b>	Memória de Reconhecimento Verbal, Reconhecimento verbal imediato, respostas corretas totais	O número total de palavras-alvo reconhecidas corretamente na fase de reconhecimento imediato, mais o número total de palavras distratoras que o sujeito rejeita corretamente.
<b>VRMDRTC</b>	Memória de Reconhecimento Verbal, Reconhecimento verbal atrasado, respostas corretas totais	O número total de palavras-alvo reconhecidas corretamente na fase de reconhecimento atrasado, mais o número total de palavras distratoras que o sujeito rejeita corretamente.
<b>VRMFRDS</b>	Memória de Reconhecimento Verbal, Lembrança verbal livre, estímulos diferentes	O número total de estímulos diferentes que são corretamente lembrados pelo sujeito na fase de lembrança livre de palavras.
<b>RTISMDR T</b>	Tempo Médio de Reação de Escolha Única	Tempo médio para soltar o botão após a apresentação de um estímulo-alvo. Medido em milissegundos.
<b>RTISMDM T</b>	Tempo Médio de Movimento de Escolha Única	Tempo médio para soltar o botão e selecionar o estímulo-alvo após ele piscar na tela. Medido em milissegundos.
<b>RTIFMDRT</b>	Tempo Médio de Reação de Escolha de Cinco Opções	Tempo médio para soltar o botão após o estímulo-alvo piscar na tela. Medido em milissegundos.
<b>RTIFMDMT</b>	Tempo Médio de Movimento de Escolha de Cinco Opções	Tempo médio para soltar o botão e selecionar o estímulo-alvo após ele piscar na tela. Medido em milissegundos.

## 4.5. Imagem por ressonância magnética

### 4.5.1. Aquisição de MRI

As MRI foram realizadas em um equipamento Philips Achieva 3T (Best, Holanda), equipado com bobina SENSE de 8 canais, no Hospital Santa Marta, Distrito Federal. As seguintes sequências de MRI foram obtidas:



(1) Sequência ponderada em T1, tridimensional, eco de campo turbo (*turbo field echo*, TFE), sagital, com campo de visão (*field-of-view*, FOV) = 208 × 240 × 256 mm, resolução reconstruída de 1 × 1 × 1 mm, tempo de eco (TE) = mínimo eco completo, tempo de repetição (TR) = 2.300 ms, tempo de inversão (TI) = 900 ms, aquisição com aceleração de duas vezes;

(2) Sequência ponderada na difusão, axial, com FOV = 232 × 232 × 160 mm, resolução reconstruída de 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms, TR = 3.300 ms, 32 direções (b = 800 s/mm<sup>2</sup>);

(3) Sequência ponderada na difusão, axial, com FOV = 232 × 232 × 160 mm, resolução reconstruída de 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms; TR = 3.300 ms (b0 codificado em fase reversa);

(4) Sequência de inversão recuperação com atenuação de fluidos (*fluid attenuated inversion recovery*, FLAIR), tridimensional, sagital, com FOV = 256 × 256 × 160mm, resolução reconstruída de 1,2 × 1 × 1 mm, TE = 119 ms, TR = 4.800 ms, TI = 1.650 ms;

(5) Sequência ponderada em T2, coronal, com FOV = 264 × 204, resolução reconstruída de 0,25 × 0,25 × 1,5 mm, TR = 2.500 ms, TE = 80 ms; ângulo de giro = 90, na fossa craniana anterior com cobertura dos bulbos olfatórios.

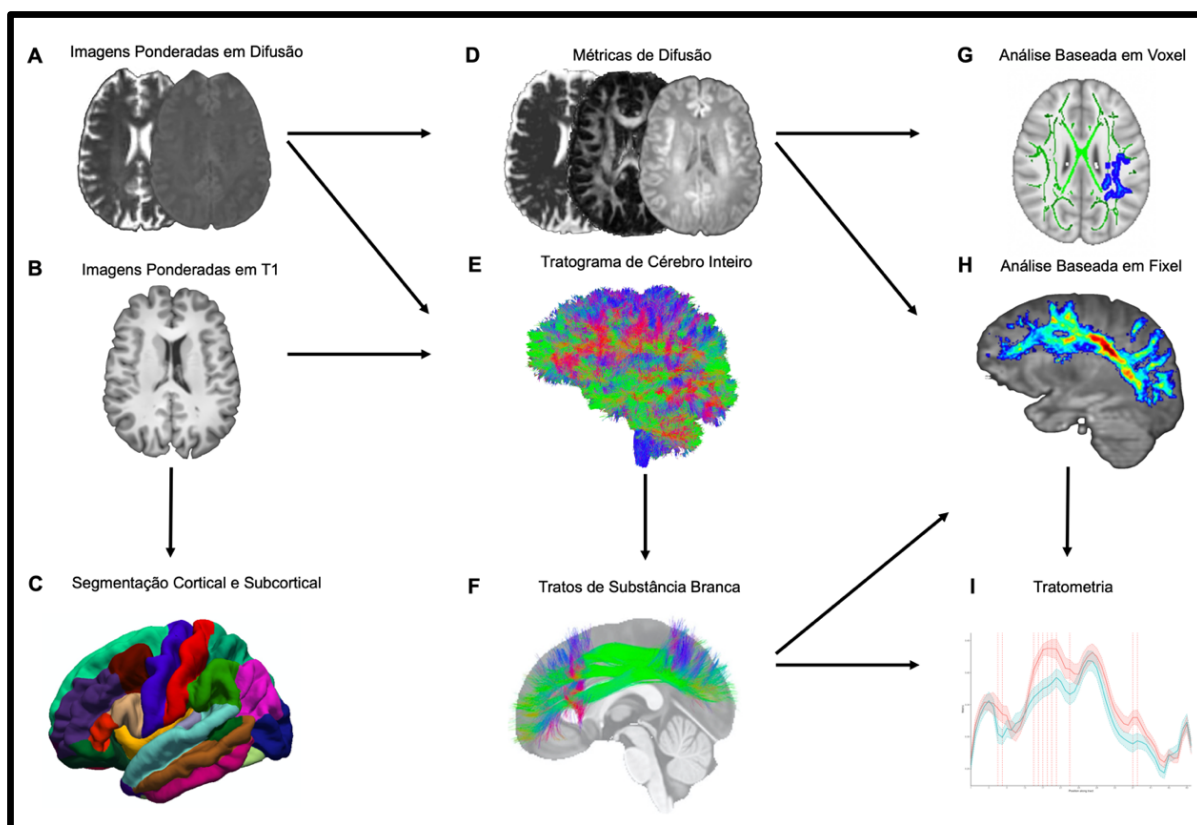
#### 4.5.2. Segmentação cortical e subcortical automatizada

O pacote FreeSurfer (versão 7.1) (FISCHL, 2012; MARTINOS CENTER, 2022) foi usado para calcular a espessura cortical e o volume dos núcleos profundos de substância cinzenta. A espessura cortical foi extraída medindo-se a distância entre a interface da substância branca-substância cinzenta e a superfície pial. Mapas de parcelamento cortical capazes de detectar diferenças submilimétricas entre grupos foram criados usando gradientes de intensidade espacial. Para suavizar os mapas corticais, foi aplicado um Kernel Gaussiano circularmente simétrico com largura total na metade do máximo (*full width at half maximum*) de 10 mm (**Figura 3**).

Os volumes das estruturas subcorticais e límbicas foram determinados usando procedimentos automatizados que atribuíam um rótulo neuroanatômico a cada voxel em um volume de MRI. Este procedimento é baseado em informações probabilísticas estimadas a partir de um conjunto de treinamento rotulado manualmente. Núcleo caudado, putâmen, globo pálido, hipocampo, núcleo accumbens e amígdala foram

incluídos na análise. A segmentação das sub-regiões da amígdala e subcampos do hipocampo foi realizada com um módulo especial no FreeSurfer. Foram obtidos os volumes totais do hipocampo e da amígdala bilaterais e seus subcampos/sub-regiões. Para evitar vieses causados por tamanhos de cabeça desiguais, os volumes obtidos foram normalizados para o volume intracraniano (VIC).

Figura 3 - Fluxograma de processamento de MRI (análise de tratometria). (A e B) Imagens brutas ponderadas em difusão e ponderadas em T1 são processadas pelo TractoFlow. (C) As imagens brutas ponderadas em T1 são processadas pelo pacote FreeSurfer para segmentação da substância cinzenta. (D) Medidas derivadas de d-MRI e índice de água livre são computadas. (E) A tratografia probabilística do cérebro inteiro é realizada usando um algoritmo de filtro de partículas anatomicamente restrito. (F) Extração dos tratos de substância branca por RecoBundlesX (por exemplo, fascículo longitudinal superior). (G) A análise baseada em voxel foi usada para investigar as métricas de difusão (índice de água livre, imagens de tensor de difusão corrigidas por água livre e densidade de fibra aparente baseada em voxel). (H) A densidade de fibra aparente específica à fibra (FD) é extraída em cada fixel (por exemplo, fascículo longitudinal superior). (I) Tratometria de cada feixe utilizando FD.



FONTE: Elaborado pelo autor.

#### 4.5.3. Processamento das d-MRI

TractoFlow (THEAUD et al., 2020) foi usado para analisar as imagens ponderadas na difusão e em T1. Como ferramenta automatizada para processamento de d-MRI, extrai medidas de DTI e CSD, de forma rápida e reprodutível. Anisotropia fracionada (*fractional anisotropy*, FA), difusividade média (*mean diffusivity*, MD),

difusividade radial (*radial diffusivity*, RD) e difusividade axial (*axial diffusivity*, AD) foram calculadas. Além disso, os valores de AFD baseada em voxel (AFD<sub>total</sub>) foram extraídos da função de distribuição de orientação da fibra. A tratografia probabilística do cérebro inteiro é realizada usando um algoritmo de filtro de partículas anatomicamente restrito. O processamento automatizado consiste em 23 etapas diferentes: 14 etapas para o processamento de d-MRI e 8 etapas para o processamento de imagem ponderada T1 (THEAUD et al., 2020). A AFD específica da fibra foi calculada para cada fixel, uma unidade de medida que descreve a orientação, densidade e integridade das fibras neuronais em um determinado ponto do cérebro. A AFD específica da fibra representa uma orientação específica da fibra, e será doravante denominado “densidade de fibra” (*fiber density*, FD). O sinal AFD em um fixel é proporcional ao volume de axônios alinhados naquela direção (RAFFELT et al., 2012) (**Figura 3**).

A análise de imagens de água livre (*free water*, FW) foi implementada seguindo os métodos descritos na literatura (PASTERNAK et al., 2009), utilizando a biblioteca SCILPY (versão 1.0) (SHERBROOKE CONNECTIVITY IMAGING LAB, 2022). Os mapas de FW em cada voxel foram reconstruídos usando um modelo de dois tensores, com valores variando de 0 a 1. Valores próximos a 0 indicam difusão de FW desprezível no espaço extracelular, enquanto 1 indica difusão de FW irrestrita (ou seja, água em um voxel se difundindo livremente). Enquanto o parâmetro FW quantifica o volume fracionário de água livre encontrado no espaço extracelular, o compartimento tecidual é ajustado a um tensor de difusão que responde pelo sinal remanescente após a remoção da água livre. Como resultado, ele gera medidas corrigidas por FW, que se espera que sejam mais sensíveis e específicas às alterações teciduais do que as medidas derivadas do modelo de tensor único. A anisotropia fracionada tecidual (FAt), MDt, RDt e ADt denotam os mapas DTI corrigidos por FW.

Ao separar o componente FW extracelular do componente “tecido”, este método proporciona maior precisão na detecção de alterações estruturais cerebrais e reduz a variabilidade no parâmetro relacionado ao tecido, em comparação com a métrica DTI (PASTERNAK et al., 2009).

#### 4.5.4. Análise de imagem de difusão baseada em voxel

O pacote TBSS (*Tract-Based Spatial Statistics*) do FSL (versão 6.0) (SMITH et al., 2006) foi implementado para comparar métricas de d-MRI entre os grupos controle e COVID-19. Primeiro, os mapas de FA de todos os sujeitos foram alinhados não linearmente ao mapa de FMRIB-58 FA do espaço *template* do Instituto de Neuroimagem de Montreal (*Montreal Neuroimaging Institute*, MNI). O esqueleto da média de FA representando o centro dos tratos WM de todos os sujeitos foi calculado seguindo o registro deformável. Os campos de deformação dos mapas FA foram usados para MD, RD, AD, FA<sub>t</sub>, MD<sub>t</sub>, AD<sub>t</sub>, RD<sub>t</sub>, FW e AFD<sub>total</sub>, e os mapas registrados foram projetados no esqueleto de FA (**Figura 3**)

#### 4.5.5. Segmentação de tratos de substância branca

Uma versão multiatlas e multiparamétrica do RecoBundles extraiu tratos de substância branca pré-selecionados (GARYFALLIDIS et al., 2018; RHEAULT, 2020). O RecoBundles reconhece tratos com base nas semelhanças entre *streamlines* de um sujeito e um modelo ou atlas. As *streamlines* são representações gráficas das trajetórias estimadas das fibras nervosas no cérebro com base nas d-MRI. A versão utilizada (RecobundlesX) é uma extensão na qual o algoritmo é repetido com diferentes parâmetros, seguido de fusão de rótulos. Essa ferramenta é baseada na semelhança de forma com um modelo construído a partir de regras de delimitação inspiradas em antecedentes anatômicos. Para todos os participantes, uma abordagem de tratografia específica do feixe foi usada para reconstruir o fórnix (“hard-to-track”) (RHEAULT et al., 2019). O fórnix foi segmentado manualmente usando um modelo de linhas e antecedentes anatômicos representando sua forma, posição e extremidades. Abaixo dos ventrículos, o rastreamento foi permitido na substância cinzenta para maximizar a probabilidade de reconstrução completa do fórnix, apesar do efeito de volume parcial. Concluída a extração do feixe, foi feita a avaliação da qualidade visual (para cada feixe e sujeito) para garantir a validade da segmentação. A abordagem foi realizada em espaço nativo e tem a vantagem de gerar tratos únicos para cada indivíduo (**Figura 3**).

#### 4.5.6. Análise de imagem de difusão baseada em trato

A quantificação das medidas de difusão em cada trato foi feita utilizando a biblioteca SCILPY (versão 1.0) (SHERBROOKE CONNECTIVITY IMAGING LAB, 2022). Os mapas DTI, FW, DTI corrigido por FW e FD foram incluídos na análise. Os valores médios foram calculados para todos os tratos de interesse.

Posteriormente, cada feixe foi dividido em 50 segmentos ao longo de seu comprimento para fornecer informações topológicas adicionais em relação a FD (COUSINEAU et al., 2017). Em primeiro lugar, os tratos de substância branca são processados independentemente e as *streamlines* espúrias são removidas usando QuickBundles hierárquicos (GARYFALLIDIS et al., 2018). Os centroides são calculados como uma *streamline* média do trato usando a métrica de distância mínima invertida. O trato é subamostrado em 50 partes equidistantes. Cada voxel é ponderado pela sua distância geodésica relativa ao ponto centroide mais próximo. Finalmente, um perfil do trato é extraído para combinação de mapa de FD e feixes. Este método foi escolhido porque as medidas de FD podem variar ao longo dos feixes estudados, dependendo da organização subjacente das fibras substância branca (YEATMAN et al., 2012). A tratometria fornece maior sensibilidade à microestrutura do trato, mapeando um conjunto de medidas sobre os feixes de substância branca. Realizamos a análise tratométrica apenas para FD porque esta métrica é subvoxel e robusta para cruzamento de fibras (**Figura 3**).

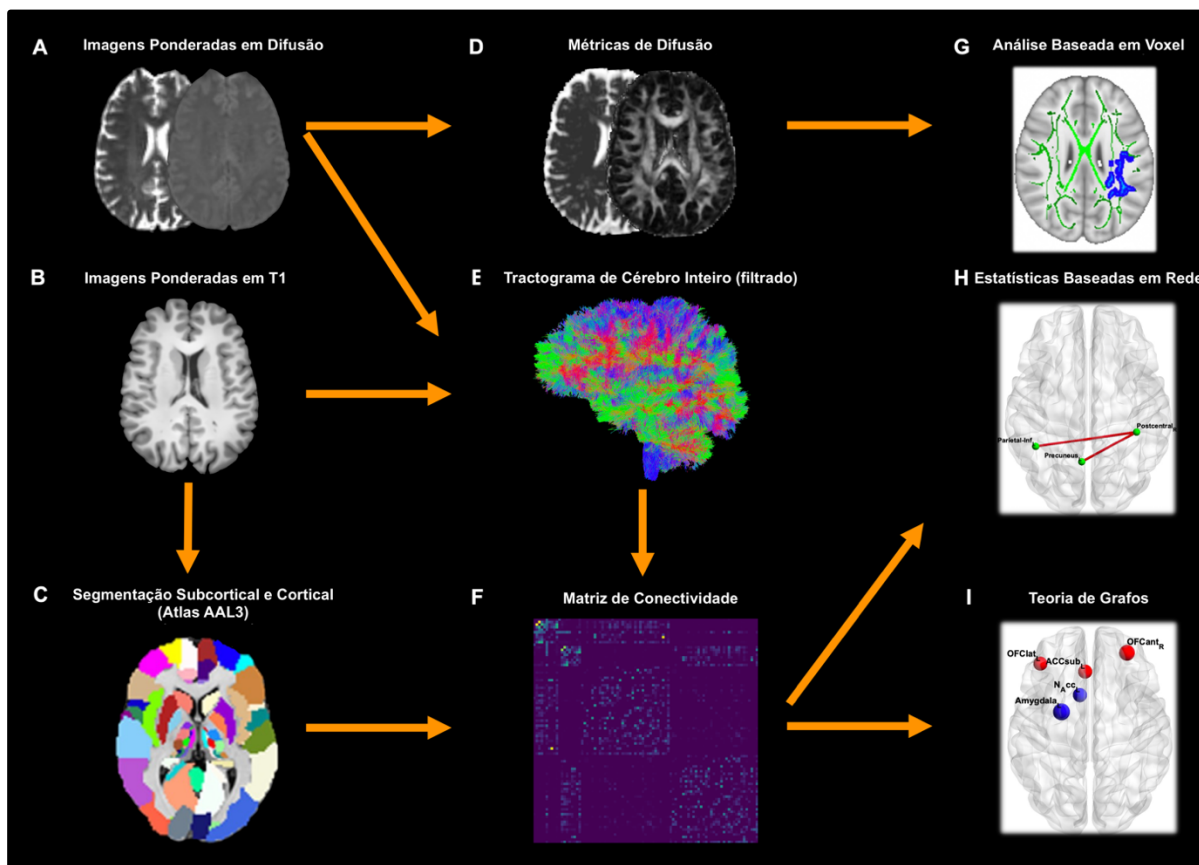
#### 4.5.7. Construção da rede

A saída do TractoFlow foi então utilizada por meio de etapas subsequentes para gerar conectomas estruturais usando a biblioteca SCILPY (versão 1.0) (SHERBROOKE CONNECTIVITY IMAGING LAB, 2022). A modelagem de otimização convexa para tratografia informada pela microestrutura 2 (COMMIT2) foi usado para filtrar o tratograma bruto, utilizando “ball & sticks”, e calcular os pesos COMMIT2 de cada *streamline* (DADUCCI et al., 2015; SCHIAVI et al., 2020). Esse método de filtragem remove conexões cerebrais falso-positivas e melhora significativamente a precisão dos conectomas estruturais resultantes, aumentando assim a confiabilidade das descobertas (ZHANG et al., 2022).

A rede cerebral é composta por nós e arestas. Para determinar os nós dentro da rede, selecionamos 171 regiões de substância cinzenta do cérebro do atlas

“automated anatomical labeling 3” (AAL3) (ROLLS et al., 2020). Cada região AAL3 no espaço MNI padrão foi retrotransformada para o espaço nativo da d-MRI do participante. O tratograma ponderado por COMMIT2 e as parcelas AAL3 foram utilizados para derivar matrizes de conectividade estrutural ponderadas por COMMIT2 (**Figura 4**). O peso COMMIT2 de uma *streamline* é uma medida que quantifica a contribuição para o sinal da d-MRI de cada *streamline* e é proporcional à área transversal das fibras biológicas ao longo do seu trajeto. Por sua vez, o peso COMMIT2 de uma conexão corresponde à soma dos pesos individuais atribuídos pelo COMMIT2 a cada *streamline* que conecta duas regiões da matriz e foi usado como um marcador da força de conectividade. Devido à sua capacidade de levar em consideração o viés de rastreamento relacionado a variações na largura do feixe, o peso COMMIT2 constitui um *proxy* mais biológico do que a contagem de *streamlines* frequentemente usada (YEH et al., 2021). A possibilidade de inserir informações prévias sobre a anatomia cerebral e sua organização, e não apenas sobre propriedades microestruturais, representa uma maneira poderosa e inovadora de abordar o problema de falso-positivos na tratografia e na conectividade estrutural do cérebro (DADUCCI et al., 2015; SCHIAVI et al., 2020). Foram calculadas matrizes ponderadas por COMMIT2 de  $171 \times 171$  para todo o cérebro (**Figura 4**).

Figura 4 - Fluxograma de processamento de MRI (análise de conectividade estrutural). (A e B) O pipeline TractoFlow processa imagens ponderadas em difusão e T1. (C) As imagens ponderadas em T1 são rotuladas em 171 regiões cerebrais do atlas AAL3. (D) São calculadas medidas derivadas de ressonância magnética de difusão. (E) A tractografia probabilística em todo o cérebro é realizada usando um algoritmo de filtro de partículas com restrição anatômica. (F) Extração da matriz de conectividade ponderada por COMMIT2. (G) Análise baseada em voxel investigou métricas de difusão (imagens de tensor de difusão). (H) Análise de estatísticas baseadas em rede. (I) Análise de teoria dos grafos: rede global e local.



FONTE: Elaborado pelo autor.

As projeções tridimensionais das conexões estruturais e dos nós foram visualizadas utilizando o BrainNet Viewer (versão 1.4) (BEIJING NORMAL UNIVERSITY, 2022) para a comparação de matrizes de peso COMMIT2 e para análises de teoria dos grafos (**Figura 4**).

#### 4.5.8. Estatísticas baseadas em rede

A análise NBS (*Network-Based Statistics*) foi realizada seguindo os métodos de Zalesky com o NBS Connectome (versão 1.2) (UNIVERSITY OF MELBOURNE, 2022) para determinar as diferentes conexões (ZALESKY; FORNITO; BULLMORE, 2010). NBS é um método estatístico baseado na teoria dos grafos e é frequentemente utilizado para explorar diferenças na conectividade estrutural na rede de substância

branca do cérebro. Tipicamente, a análise NBS é conduzida para identificar sub-redes compostas por pares de nós e conexões cuja força de conectividade estrutural varia significativamente entre grupos (**Figura 4**).

#### 4.5.9. Medidas de rede

O pacote Brain Connectivity Toolbox (RUBINOV; SPORNS, 2010) calculou medidas de rede cerebral para cada indivíduo. Para redes globais, foram analisadas as seguintes métricas: *betweenness centrality* (fração de todos os caminhos mais curtos na rede), *modularity* (medida de segregação da rede), *assortativity* (tendência de nós se conectarem com outros de força semelhante), *participation* (medida da diversidade de conexões intermodulares), *clustering coefficient* (fração de triângulos conectados ao redor de um nó), *mean strength* (média de todas as *nodal strengths*, onde a *nodal strength* é a soma dos pesos das ligações conectadas ao nó), *density* (fração de conexões presentes em relação às possíveis conexões), *characteristic path length* (média do comprimento do caminho mais curto entre todos os nós), *global efficiency* (média do inverso do comprimento do caminho mais curto na rede), *edge count* (contagem de conexões da rede) e *small-worldness* (razão da média do *clustering coefficient* pelo *characteristic path length*).

Analisamos medidas de rede regionais, calculadas para cada nó, incluindo: *betweenness centrality* (número de caminhos mais curtos que passam por um nó), *clustering* (fração de triângulos conectados ao redor de um nó), *edge count* (contagem de conexões em cada nó), *local efficiency* (média do inverso do comprimento do caminho mais curto na vizinhança de um nó), *nodal strength* (soma dos pesos das ligações conectadas ao nó), *path length* (comprimento do caminho mais curto entre os nós) e *participation* (medida da diversidade de conexões intermodulares de um nó).

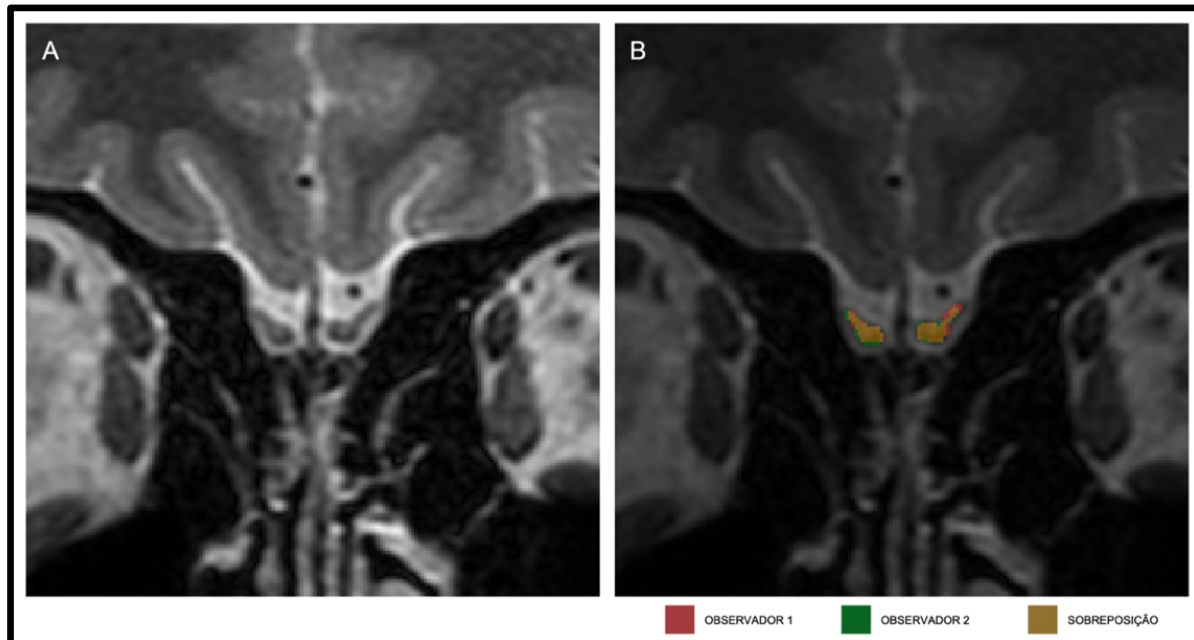
Medidas de rede locais foram calculadas para as regiões cerebrais relacionadas ao olfato (córtex olfatório, giro reto, giro orbital medial, giro orbital anterior, giro orbital posterior, giro orbital lateral, ínsula, hipocampo, giro parahipocampal, amígdala, núcleo caudado, putâmen, globo pálido, tálamo [núcleo medial dorsomedial e núcleo medial dorsolateral], córtex cingulado anterior [subgenuar, pregenuar e supracaloso], e núcleo accumbens) (HAN et al., 2019; SEUBERT et al., 2013).



#### 4.5.10. Segmentação manual dos bulbos olfatórios

Dois avaliadores independentes que desconheciam os dados clínicos e olfativos segmentaram manualmente os bulbos olfatórios, utilizando o programa ITK-SNAP (versão 3.8) (YUSHKEVICH et al., 2006). Os limites do bulbo olfatório no plano coronal foram determinados pelo LCR circundante, enquanto uma mudança abrupta no diâmetro definiu o limite posterior do bulbo olfatório na transição com o trato olfatório (PASCHEN et al., 2015). As medidas volumétricas dos bulbos olfatórios direito e esquerdo foram tomadas independentemente e depois somadas. Os valores médios estabelecidos pelos dois avaliadores foram utilizados em todas as análises subsequentes. A concordância entre observadores foi avaliada pelo coeficiente de correlação de Pearson e pelo coeficiente de similaridade de DICE (DSC) (**Figura 5**). O VIC foi utilizado para a normalização dos volumes dos bulbos olfatórios, a fim de eliminar possíveis vieses decorrentes de variações no tamanho da cabeça.

Figura 5 - Segmentação manual dos bulbos olfativos. (A) Imagem coronal ponderada em T2 de um participante. (B) Imagem coronal ponderada em T2 com segmentação dos dois avaliadores. Vermelho: Avaliador 1; Verde: Avaliador 2; Amarelo: Sobreposição das segmentações.



FONTE: Elaborado pelo autor.

#### 4.5.11. Controle de qualidade de MRI

Todas as MRI foram inspecionadas quanto a distorção geométrica grosseira significativa, movimento em massa ou artefatos de queda de sinal. Imagens

ponderadas em T1 e d-MRI foram analisadas usando Dmriqc-flow (versão 0.1) (SHERBROOKE CONNECTIVITY IMAGING LAB, 2022), um pacote Nextflow para controle de qualidade de d-MRI. A inspeção visual foi realizada em todas as segmentações corticais e subcorticais e tratos de substância branca para garantir a precisão.

## 4.6. Análise estatística

### 4.6.1. Avaliação demográfica, clínica e neuropsicológica

As características demográficas e clínicas dos grupos foram comparadas por meio de teste t de amostra independente para variáveis contínuas com distribuição normal, teste de Mann-Whitney para variáveis contínuas sem distribuição normal e teste  $\chi^2$  para variáveis categóricas. A normalidade foi avaliada com a inspeção visual das distribuições das variáveis e o teste de Shapiro-Wilk. A significância estatística foi estabelecida em valor de  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas no R (versão 4.1) (THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING, 2022).

### 4.6.2. Análise das segmentações da substância cinzenta

A análise da espessura cortical baseada no vértice de cada hemisfério cerebral foi calculada em um modelo linear generalizado (*generalized linear model*, GLM). O grupo COVID-19 foi comparado ao grupo controle usando o comando "mri glmfit" do FreeSurfer (FISCHL, 2012; MARTINOS CENTER, 2022). Simulações de Monte Carlo com um valor de p definido para 0,001 foram usadas para corrigir comparações múltiplas. Idade e sexo foram incluídos como covariáveis na análise.

GLM foi usado para analisar as diferenças no volume dos núcleos subcorticais de substância cinzenta, subcampos hipocámpais e núcleos das amígdalas entre os grupos COVID-19 e controle, usando idade, sexo e VIC como covariáveis. Todos os resultados foram corrigidos usando o método de taxa de descoberta falsa (*false discovery rate*, FDR) (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

### 4.6.3. Análise de imagem de difusão baseada em voxel

A análise baseada em voxel foi realizada por meio de um GLM com contrastes para testar as diferenças dos grupos COVID-19 e controle. O pacote TBSS (SMITH et

al., 2006) foi usado com teste de permutação não paramétrica (5.000 permutações) para corrigir comparações múltiplas e aprimorar *clusters* usando realce de aglomerado sem limiar (*threshold-free cluster enhancement*, TFCE). Idade e sexo foram usados como covariáveis. Os resultados foram considerados significativos em valor de  $p < 0,05$ , corrigido por TFCE para comparações múltiplas. O atlas “JHU white-matter tractography” foi usado para identificar regiões estatisticamente significativas (HUA et al., 2008).

#### 4.6.4. Análise de imagem de difusão baseada em trato

As comparações dos valores médios de FA, MD, RD, AD, FW, FAt, MDt, RDt, ADt e FD dos tratos de substância branca entre os grupos COVID-19 e controle foram realizadas com GLM, controlando por idade e sexo. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes e corrigidos para comparações múltiplas com FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995), considerando os 35 tratos testados.

Para uma análise mais aprofundada, cada trato foi dividido em 50 seções, e a diferença entre os dois grupos foi calculada com testes t para cada uma das subseções do feixe (COUSINEAU et al., 2017; YEATMAN et al., 2012). O procedimento visa identificar segmentos do trato que diferem significativamente entre os grupos COVID-19 e controle. Para aumentar a robustez estatística e levar em conta múltiplas comparações, cada teste t foi repetido 10.000 vezes usando permutações de cada uma das duas populações. Além disso, um limiar de significância corrigido foi calculado usando os valores t das 10.000 permutações (NICHOLS; HOLMES, 2002). Um teste t foi considerado estatisticamente significativo se o valor de p fosse menor que 0,05 e seus valores t absolutos excedessem o limite calculado. O objetivo desta análise foi garantir que as mudanças observadas fossem distribuídas uniformemente ao longo do feixe, pois o leque das fibras nas extremidades de um feixe poderia influenciar as medidas de difusão.

Em cada grupo, realizamos uma análise de correlação parcial entre as medidas médias do trato, a pontuação do CFQ-11 (fadiga total, física e mental), a pontuação global do MoCA e os resultados cognitivos dos subtestes do CANTAB, ajustando para idade, sexo, escolaridade e tempo entre o diagnóstico de COVID-19 e os procedimentos clínicos/imagem do estudo. Os dados sofreram uma transformação não paranormal e foram analisados pelo coeficiente de Pearson. A significância

estatística foi definida como valor de p bicaudal menor que 0,05, com correção de FDR para comparações múltiplas (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

#### 4.6.5. Estatísticas baseadas em rede

Diferenças entre grupos foram testadas em matrizes de conectividade estrutural para uma série de limiares primários (de  $t = 2,5$  a  $t = 3,5$ ), com idade e sexo como variáveis de interferência. Foram utilizadas 5.000 permutações, com a intensidade como medida do tamanho da rede e um limiar de significância estatística definido em  $p < 0,05$ .

#### 4.6.6. Métricas de rede

As diferenças entre grupos foram testadas com o teste de Mann-Whitney (*modularity*, *clustering* e *nodal strength*) ou testes t independentes (outras métricas globais de rede). GLM foi utilizado para analisar as diferenças entre os grupos nas métricas de rede local nas áreas cerebrais relacionadas ao olfato, usando idade e sexo como covariáveis. Todos os resultados foram corrigidos usando o método de FDR (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

Realizamos uma análise de correlação parcial entre medidas de rede global, pontuação no teste SS-16 e volumes totais normalizados dos bulbos olfatórios, ajustando para idade, sexo, educação, comorbidades (rinite alérgica e enxaqueca) e o tempo entre o diagnóstico de COVID-19 e os procedimentos clínicos/imagem do estudo. Os dados foram analisados utilizando o coeficiente de Spearman. A significância estatística foi definida como  $p < 0,05$  bilateral.

#### 4.6.7. Segmentação dos bulbos olfatórios

Os volumes dos bulbos olfatórios foram comparados usando um teste t para amostras independentes. O VIC corrigiu os volumes obtidos com a fórmula: (volume do bulbo olfatório / VIC) x 100.

Foi realizada uma análise de covariância (ANCOVA) para comparar o volume total dos bulbos olfativos normalizados entre os grupos, controlando variáveis como sexo, idade e rinite alérgica. Conforme necessário, valores de p significativos foram ajustados usando testes de Bonferroni post hoc ( $p < 0,05$ ).

A concordância entre observadores da segmentação dos bulbos olfatórios foi determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson e coeficiente de similaridade de DICE. O coeficiente de similaridade de DICE é um índice de similaridade de sobreposição que reflete a concordância de tamanho e localização e varia de 0 (sem sobreposição) a 1 (sobreposição completa) (**Figura 5**). Uma boa sobreposição ocorre quando o coeficiente de similaridade de DICE  $> 0,700$  (ZIJDENBOS et al., 1994).

#### 4.6.8. Cálculo do tamanho da amostra

O tamanho da amostra *a priori* foi determinado usando o software G\*Power (versão 3.1) (FAUL et al., 2007). Uma amostra de 84 participantes é necessária para detectar uma diferença entre duas médias independentes (Wilcoxon-Mann-Whitney) usando um alfa de 0,05, um tamanho de efeito médio de 0,65 e um poder de 0,8, com 50 participantes no grupo COVID-19 e 34 participantes no grupo controle. A amostra necessária para a análise de correlação de Pearson  $r$  (bicaudal) é 84, sendo 50 no grupo COVID-19 e 34 no grupo controle.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Estudo 1: Alterações microestruturais cerebrais e fadiga após COVID-19

Este artigo foi publicado no periódico *Frontiers in Neurology*, em conformidade com os termos da licença CC-BY 4.0 (BISPO et al., 2022).

Bispo DDC, Brandão PRP, Pereira DA, Maluf FB, Dias BA, Paranhos HR, von Glehn F, de Oliveira ACP, Regattieri NAT, Silva LS, Yasuda CL, Soares AASM, Descoteaux M. **Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19**. *Front Neurol*. 2022 Nov 10;13:1029302. doi: 10.3389/fneur.2022.1029302.


**OPEN ACCESS**
**EDITED BY**

Gwenaëlle Douaud,  
University of Oxford, United Kingdom

**REVIEWED BY**

Jonas Hosp,  
University of Freiburg Medical  
Center, Germany  
Ludovica Griffanti,  
University of Oxford, United Kingdom

**\*CORRESPONDENCE**

Diógenes Diego de Carvalho Bispo  
dbispo.neurorradio@gmail.com

<sup>†</sup>These authors have contributed  
equally to this work and share  
first authorship

<sup>‡</sup>These authors share senior authorship

**SPECIALTY SECTION**

This article was submitted to  
Applied Neuroimaging,  
a section of the journal  
Frontiers in Neurology

RECEIVED 27 August 2022

ACCEPTED 24 October 2022

PUBLISHED 10 November 2022

**CITATION**

Bispo DDC, Brandão PRP, Pereira DA,  
Maluf FB, Dias BA, Paranhos HR, von  
Glehn F, de Oliveira ACP,  
Regattieri NAT, Silva LS, Yasuda CL,  
Soares AASM and Descoteaux M (2022)  
Brain microstructural changes and  
fatigue after COVID-19.  
*Front. Neurol.* 13:1029302.  
doi: 10.3389/fneur.2022.1029302

**COPYRIGHT**

© 2022 Bispo, Brandão, Pereira, Maluf,  
Dias, Paranhos, von Glehn, de Oliveira,  
Regattieri, Silva, Yasuda, Soares and  
Descoteaux. This is an open-access  
article distributed under the terms of  
the [Creative Commons Attribution  
License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution  
or reproduction in other forums is  
permitted, provided the original  
author(s) and the copyright owner(s)  
are credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19

Diógenes Diego de Carvalho Bispo<sup>1,2,3\*†</sup>,  
Pedro Renato de Paula Brandão<sup>4,5†</sup>, Danilo Assis Pereira<sup>6</sup>,  
Fernando Bisinoto Maluf<sup>3</sup>, Bruna Arrais Dias<sup>3</sup>,  
Hugo Rafael Paranhos<sup>3</sup>, Felipe von Glehn<sup>2,5</sup>,  
Augusto César Penalva de Oliveira<sup>7</sup>,  
Neysa Aparecida Tinoco Regattieri<sup>2</sup>, Lucas Scardua Silva<sup>8</sup>,  
Clarissa Lin Yasuda<sup>8</sup>,  
Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares<sup>2‡</sup> and  
Maxime Descoteaux<sup>9‡</sup>

<sup>1</sup>Diagnostic Imaging Unit, Brasília University Hospital, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>3</sup>Department of Radiology, Hospital Santa Marta, Taguatinga, Brazil, <sup>4</sup>Neuroscience and Behavior Laboratory, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>5</sup>Hospital Sirio-Libanês, Brasília, Brazil, <sup>6</sup>Advanced Psychometry Laboratory, Brazilian Institute of Neuropsychology and Cognitive Sciences, Brasília, Brazil, <sup>7</sup>Department of Neurology, Instituto de Infectologia Emílio Ribas, São Paulo, Brazil, <sup>8</sup>Brazilian Institute of Neuroscience and Neurotechnology (BRAINN), University of Campinas, Campinas, Brazil, <sup>9</sup>Sherbrooke Connectivity Imaging Laboratory, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

**Background:** Fatigue and cognitive complaints are the most frequent persistent symptoms in patients after severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection. This study aimed to assess fatigue and neuropsychological performance and investigate changes in the thickness and volume of gray matter (GM) and microstructural abnormalities in the white matter (WM) in a group of patients with mild-to-moderate coronavirus disease 2019 (COVID-19).

**Methods:** We studied 56 COVID-19 patients and 37 matched controls using magnetic resonance imaging (MRI). Cognition was assessed using Montreal Cognitive Assessment and Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery, and fatigue was assessed using Chalder Fatigue Scale (CFQ-11). T1-weighted MRI was used to assess GM thickness and volume. Fiber-specific apparent fiber density (FD), free water index, and diffusion tensor imaging data were extracted using diffusion-weighted MRI (d-MRI). d-MRI data were correlated with clinical and cognitive measures using partial correlations and general linear modeling.

**Results:** COVID-19 patients had mild-to-moderate acute illness (95% non-hospitalized). The average period between real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction-based diagnosis and clinical/MRI assessments was 93.3 (±26.4) days. The COVID-19 group had higher total CFQ-11 scores than the control group ( $p < 0.001$ ). There were no differences in neuropsychological performance between groups. The COVID-19 group had lower FD in the association, projection, and commissural tracts, but no change in GM. The corona radiata, corticospinal tract,



corpus callosum, arcuate fasciculus, cingulate, fornix, inferior fronto-occipital fasciculus, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, and uncinate fasciculus were involved. CFQ-11 scores, performance in reaction time, and visual memory tests correlated with microstructural changes in patients with COVID-19.

**Conclusions:** Quantitative d-MRI detected changes in the WM microstructure of patients recovering from COVID-19. This study suggests a possible brain substrate underlying the symptoms caused by SARS-CoV-2 during medium- to long-term recovery.

#### KEYWORDS

brain, diffusion magnetic resonance imaging, fatigue, cognition, COVID-19

## Introduction

The sequelae of coronavirus disease 2019 (COVID-19) beyond the acute phase of infection are being increasingly understood as scientific research and clinical experience accumulate, and, in this sense, studies that include the identification and characterization of clinical, serological, and imaging of COVID-19 in the acute, subacute, and chronic phases of the disease are needed (1). People with post-COVID conditions can have a wide range of symptoms, lasting for more than 4 weeks, but commonly for months after infection. These symptoms must not be explained by an alternative diagnosis (2). Several symptoms, such as fatigue, myalgia, anosmia, dysgeusia, and cognitive impairment (difficulty concentrating and memory complaints) have been reported in post-COVID (3). Symptoms may appear following recovery from acute COVID-19, persist for an extended period, fluctuate, or relapse over time (1, 4).

Perceived fatigue following severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection is more pronounced than in the general population and does not depend on initial COVID-19 severity (5). Cognitive deficits seem to occur even in non-hospitalized individuals with mild acute symptoms (6). Decreased performance in attention and working memory has been reported (7), as well as in reasoning, problem-solving, spatial planning, processing speed (8), verbal fluency, and visuospatial construction (9). The nature and causes of fatigue and cognitive dysfunction across the COVID-19 severity spectrum remain, however, disputed.

Numerous hypotheses have been proposed to explain the mechanisms underlying post-COVID symptoms. Direct viral infection effects, systemic inflammation, neuroinflammation (due to cytokine-induced microglial activation), microvascular thrombosis, blood-brain barrier disruption, and even viral-induced neurodegeneration may play a role (10). In critical cases, hypoxic-ischemic changes are associated with infarcts, microhemorrhage, microglial activation, microglial nodules, and neuronophagia (11). However, hypoxic-ischemic changes

and microglial-induced damage may not occur in mild-to-moderately symptomatic patients with no hypoxia, a fact that encourages alternative biological explanations.

Post-COVID brain imaging characteristics were also examined. Tractometry and volume-based magnetic resonance imaging (MRI) measurements in patients 3 months after COVID-19 have shown changes in white matter (WM) microstructure metrics, especially in the frontal and limbic systems, in both mild and severe cases (12). In a large sample derived from the UK Biobank study, SARS-CoV-2 infection was associated with changes in brain structure (13). Significant longitudinal effects were identified: a more substantial reduction in the cortical thickness of the orbitofrontal and parahippocampal gyrus, as well as prominent changes in tissue damage markers in brain regions functionally linked to the primary olfactory cortex. Furthermore, stronger overall brain atrophy was observed in those infected with SARS-CoV-2 than in the control cohort examined at similar time intervals (13). With regard to nuclear medicine techniques, frontoparietal hypometabolism was identified in fluorodeoxyglucose-positron emission tomography examinations studying post-COVID, correlating with the Montreal Cognitive Assessment (MoCA) performance (14). Neuroimaging techniques, thus, seem to serve as surrogate biomarkers of post-COVID neurological abnormalities.

Diffusion-weighted MRI (d-MRI) generates three families of potentially useful metrics to investigate post-COVID structural brain damage. The first, voxel-wise diffusion tensor imaging (DTI) measures, relate to the main eigenvector and eigenvalue of the elliptical unidirectional tensor (15, 16). The second, free water (FW) imaging, investigates tissue changes by separating the contribution of freely diffusing extracellular water from the tissue component (17). In this two-compartment model, extracellular FW represents changes caused by neuroinflammation, atrophy, or edema. The third, apparent fiber density (AFD), derived from constrained spherical deconvolution (CSD) (18), represents an indirect measure of axon degeneration, reflecting an apparent number



of axons (19). AFD is computed in two distinct ways. AFD<sub>total</sub> represents the total number of axons in a voxel, integrating all the diffusion orientations. On the other hand, FD stands in for a fiber population within a single voxel, overcoming the “crossing-fibers” interpretation issue (20).

The current study assessed fatigue and general cognitive performance, examined changes in GM thickness and volume, and investigated WM microstructural abnormalities after COVID-19 compared to a control group using FW imaging, voxel-based analysis, and fixel-based analysis. Our secondary objective was to determine whether microstructural changes were associated with clinical and cognitive data.

## Materials and methods

### Participants

This cross-sectional prospective analytical study was conducted as part of the NeuroCOVID-19 Brazilian Registry (21). Participants were recruited between October 2020 and May 2021 in Brasilia, Brazil, from a population of health professionals and patients assisted at the Brasilia University Hospital, before the implementation of mass vaccination campaigns, with a non-probabilistic sampling strategy. During the recruitment period, a timeframe that corresponded approximately to alpha and gamma (P1) variants predominance in Brazil, we consecutively reached out by phone to a list of 364 patients who were diagnosed with COVID-19 by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) to invite them to participate in the study.

The inclusion criteria for the COVID-19 group (COV+) were (a) diagnosis of SARS-CoV-2 infection confirmed by detection of viral RNA by qRT-PCR testing of a nasopharyngeal swab, (b) at least one COVID-19-related symptom during the acute phase of infection, and (c) 18–60 years of age. Patients were evaluated at least 4 weeks after diagnosis of COVID-19 (2). The control group (COV-) was recruited from the same population (patients or health professionals from Brasilia University Hospital) through convenience sampling, matching for age, sex, and education level. Subjects in the COV- group were not previously infected with SARS-CoV-2 and had a negative SARS-CoV IgG/IgM test.

The exclusion criteria for both groups were (a) pre-existing brain structural disorders (stroke, epilepsy, multiple sclerosis, neoplasia, hydrocephalus, traumatic brain injury, Parkinson’s disease, and dementia), (b) severe psychiatric diseases, (c) previous hospital admission with treatment in an intensive care unit who required mechanical ventilation, and (d) illiteracy.

Each participant signed a consent form and underwent clinical, cognitive, and MRI examinations. All the procedures were performed on the same visit. This study was approved by the Local Ethics Committee of the University of Brasilia.

All procedures adhered to current regulations, such as the Helsinki Declaration.

### Clinical assessment

Demographic and clinical data were collected using an electronic form. Age, education, sex, and a comorbidity checklist were collected during anamnesis with the aim of identifying potential confusion variables. Current neurological, chemosensory, respiratory, and constitutional symptoms were evaluated. The participants reported symptoms that occurred during the acute and post-acute phases of COVID-19.

The Chalder Fatigue Scale (CFQ-11) was used to evaluate fatigue severity and extent (22, 23). This scale is often divided into two components: one that measures physical fatigue (questions 1–7) and one that measures mental fatigue (questions 8–11). Using a prespecified total CFQ-11 cut-off greater than or equal to 16, we dichotomized participants into no fatigue vs. increased fatigue (24, 25).

### Cognitive assessment

All participants underwent a cognitive screening examination, MoCA (26), followed by a comprehensive cognitive assessment using the Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) (27, 28). This battery assesses executive functions (One Touch Stockings of Cambridge), verbal memory (Verbal Recognition Memory), visual memory (Paired Associates Learning, Pattern Recognition Memory), working memory (Spatial Working Memory), and reaction time (simple and five-choice Reaction Time). [Supplementary Table 1](#) summarizes the key cognitive variables.

### MRI data acquisition

MRI was performed using a Philips Achieva 3T scanner (Best, Netherlands) equipped with an 8-channel SENSE coil. The following sequences were obtained: (a) Three dimensional (3D) T1-weighted sequence, turbo field echo, sagittal, with field of view (FOV) = 208 × 240 × 256 mm, reconstructed resolution of 1 × 1 × 1 mm, echo time (TE) = min full echo, repetition time (TR) = 2,300 ms, TI = 900 ms, two times accelerated acquisition; (b) Diffusion-weighted sequence, axial, with FOV 232 × 232 × 160 mm, reconstructed resolution of 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms; TR = 3,300 ms, 32 directions (b = 800 s/mm<sup>2</sup>); (c) Diffusion-weighted sequence, axial, with FOV 232 × 232 × 160 mm, reconstructed resolution of 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms; TR = 3,300 ms (reversed phase encoded b0); (d) 3D-fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) sequence, sagittal, with FOV 256 ×

256 × 160 mm, reconstructed resolution of 1.2 × 1 × 1 mm, TE = 119 ms, TR = 4,800 ms, TI = 1,650 ms.

## Automated cortical and subcortical segmentation

MRI data were processed using the FreeSurfer suite (version 7.1) (29) to estimate cortical thickness and deep GM nuclei volume. Cortical thickness was extracted by measuring the distance between the WM and GM boundary and the pial surface. Cortical parcellation maps capable of detecting submillimeter differences between the groups were created using spatial intensity gradients. To smoothen the cortical maps, a circularly symmetric Gaussian kernel with a full width at half maximum of 10 mm was applied.

The volumes of subcortical and limbic structures were measured using automated procedures that assigned a neuroanatomical label to each voxel in the MRI volume. This procedure is based on probabilistic information estimated from a manually labeled training set. The caudate, putamen, globus pallidum, hippocampus, nucleus accumbens, and amygdala were bilaterally segmented. To avoid biases related to unequal head size, the volumes were normalized to the intracranial volume.

## Diffusion-weighted MRI processing

TractoFlow (30) was used to analyze d-MRI and T1-weighted images (Figure 1). As an automated tool for processing d-MRI, it extracts DTI and CSD measures. The fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD), and axial diffusivity (AD) were calculated. In addition, voxel-wise AFD (AFDtotal) values were extracted from the fiber orientation distribution function. Whole brain probabilistic tractography is performed using an anatomically constrained particle filter algorithm. The standardized processing steps have been detailed elsewhere (30). Fiber-specific AFD was computed for each fixel, representing a particular fiber orientation, and will be hereafter referred to as “fiber density” (FD). The AFD signal in a fixel is proportional to the volume of axons aligned in that direction (20).

The FW imaging analysis followed the methods described in the literature, using the SCILPY library version 1.0.0 (17, 31). The FW maps at each voxel were reconstructed using a two-tensor model, with values ranging from 0 to 1. Values close to 0 indicate negligible FW diffusion in the extracellular space, whereas 1 indicates unrestricted FW diffusion (i.e., water in a voxel diffuses completely freely). While the FW parameter quantifies the fractional volume of free water found in the extracellular space, the tissue compartment is fitted to a diffusion tensor that accounts for the remaining signal after

the removal of free water. As a result, it generates FW-corrected measures, which are expected to be more sensitive and specific to tissue changes than single tensor model-derived measures. Tissue fractional anisotropy (FAt), mean diffusivity (MDt), radial diffusivity (RDt), and axial diffusivity (ADt) denote the FW-corrected DTI maps. By separating the extracellular FW component from the “tissue” component, this method provides greater accuracy in detecting brain structural changes and reduces the variability in the tissue-related parameter, compared to the DTI metric (17).

## Voxel-based diffusion imaging analysis (VBA)

The tract-based spatial statistics (TBSS) pipeline in FSL (version 6.0) (32) permitted the investigation of d-MRI metric contrasts between the COV+ and COV- groups. The FA maps were non-linearly aligned to the FMRIB-58 map from the Montreal Neuroimaging Institute template space. The mean FA skeleton was computed following the deformable registration. The deformation fields from the FA maps were used for MD, RD, AD, FAt, MDt, RDt, ADt, FW, and AFDtotal. The registered maps were projected onto the FA skeleton.

## Segmentation of WM tracts

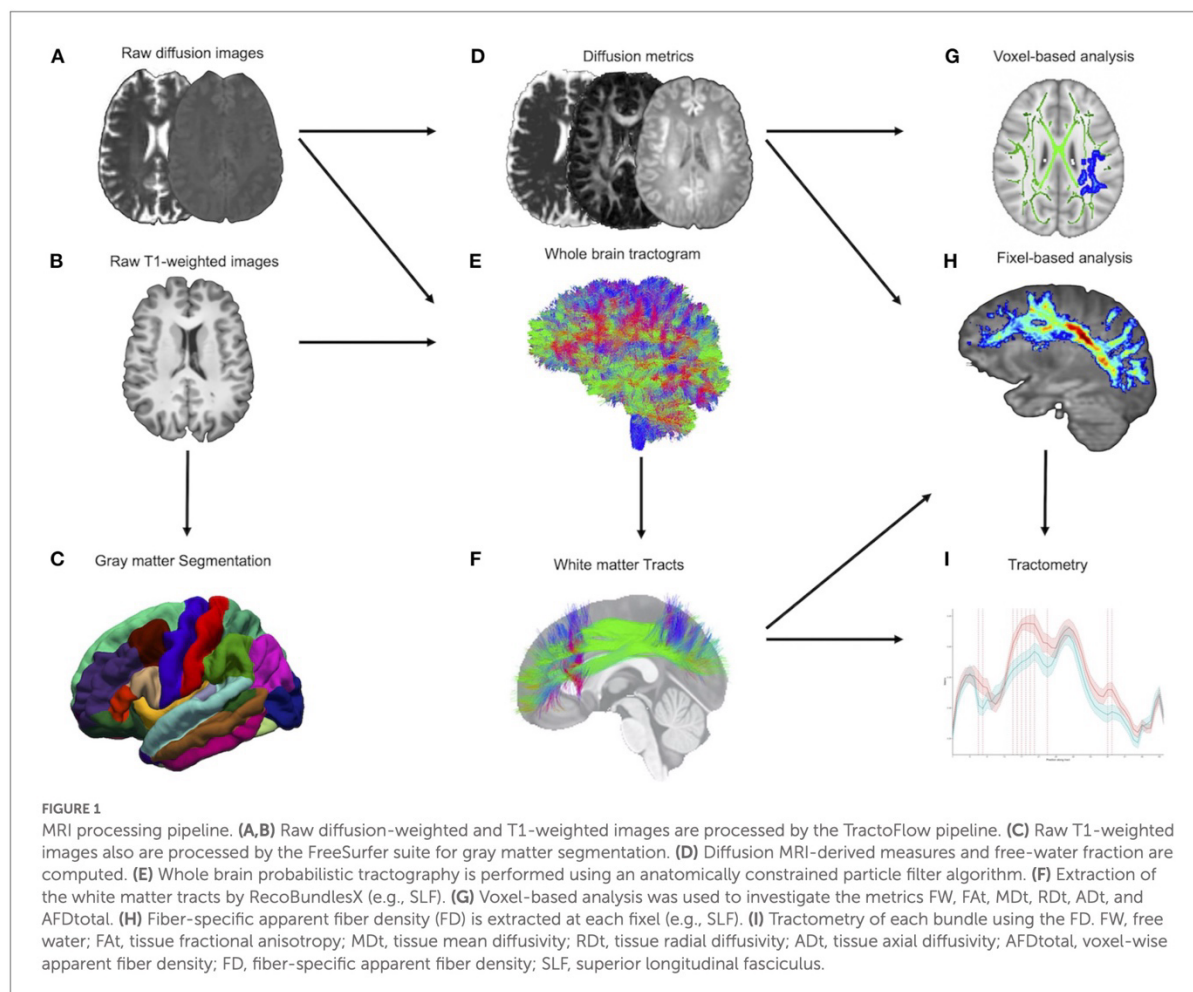
A multi-atlas and multi-parameter version of RecoBundles extracted preselected WM bundles from whole-brain tractography (33, 34). RecoBundles recognizes bundles based on the similarities between a subject’s streamline and a template or atlas. In RecobundlesX, the algorithm was repeated with different parameters, followed by label fusion. This tool is based on shape similarity to a template constructed from anatomical prior-inspired delineation rules. For both groups, a bundle-specific tractography approach was used to reconstruct the “hard-to-track” fornix pathway (35). The overall approach, entirely performed in native space, has the advantage of generating unique bundles for each individual (Figure 1).

## Tract-wise analysis

The quantification of diffusion measures in each tract was done using the SCILPY library version 1.0.0 (31). DTI, FW, FW-corrected DTI, and FD maps were included in the analysis. The mean values were calculated for all tracts of interest.

Subsequently, each bundle was divided into 50 segments along its length to provide additional topological insight regarding FD (36). Firstly, WM tracts are processed independently and spurious streamlines are removed using hierarchical QuickBundles (33). The centroids are computed





as a mean streamline of the pathway using the minimum-distance-flipped metric. The tract is subsampled into 50 equidistant parts. Each voxel is weighted by its relative geodesic distance to the closest centroid point. Finally, a tract profile is extracted for combination of FD map and pathways. This method was chosen because FD measures may vary throughout the studied bundles depending on the underlying WM fiber organization (37). Tractometry provides higher sensitivity to the pathway's microstructure by mapping a set of measures over the WM bundles. We performed the tractometric analysis only for FD because this metric is subvoxel and robust to crossing fibers.

## MRI quality control

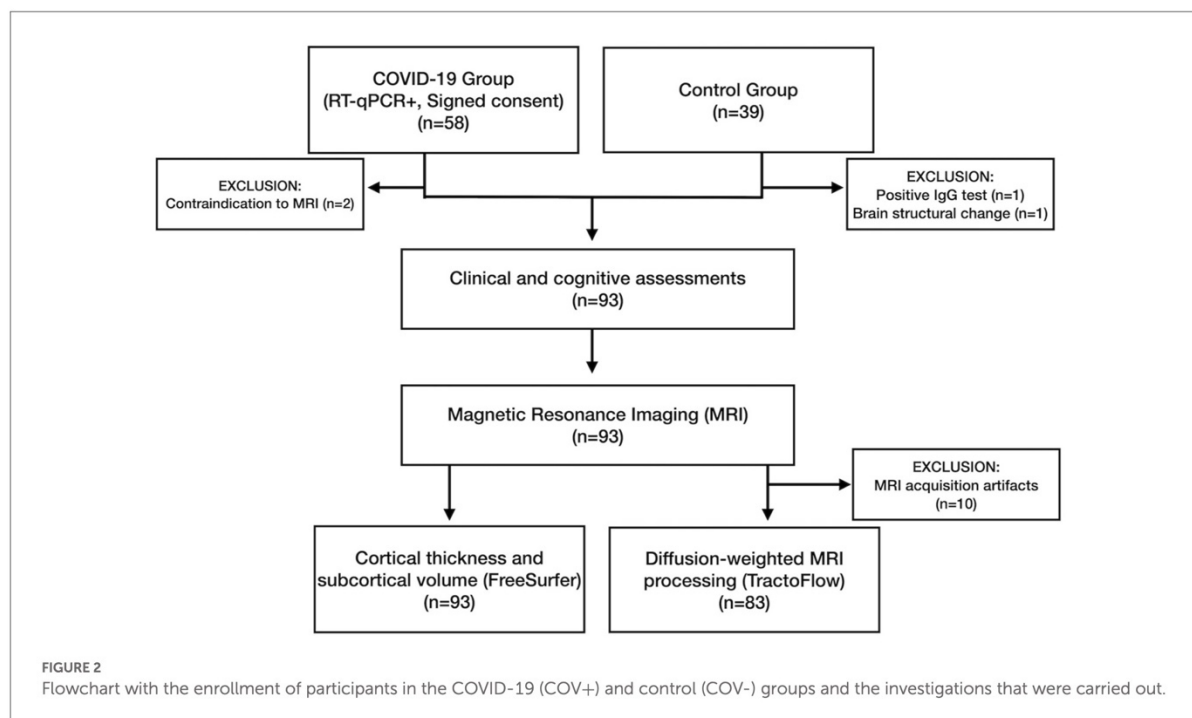
Every raw and processed MRI dataset was inspected for gross geometric distortion, bulk motion, or signal dropout artifacts. T1-weighted and d-MRI datasets were examined

using Dmriqc-flow (38) for d-MRI quality control. The cortical and subcortical segmentations and WM tracts were visually reviewed by a board-certified neuroradiologist to ensure accuracy.

## Statistical analysis

### Demographic, clinical, and cognitive assessments

The clinical characteristics were compared between the groups using independent-sample *t*-tests for normally distributed continuous variables, the Mann-Whitney test for non-normally distributed data, and  $\chi^2$  for categorical inputs. Normality was assessed by visual inspection of histograms and the Shapiro-Wilk test. Statistical significance was set at  $p < 0.05$ . Statistical analyses were performed using R, v4.1.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).



## FreeSurfer

Each hemisphere's vertex-wise cortical thickness was computed using generalized linear models (GLM). Patients were compared to controls employing FreeSurfer's "*mri\_glmfit*" (29). Monte Carlo simulations with a  $p$ -value set to 0.001 corrected for multiple comparisons. Age and sex were used as nuisance covariates. A GLM was used to analyze differences in the volume of GM subcortical nuclei between the two groups, using age, sex, and intracranial volume as covariates. All results were corrected using the *false discovery rate* (FDR) method.

## VBA

For VBA, GLM with contrast was performed to test for group differences. The TBSS framework (32) includes non-parametric permutation testing (5,000 permutations) to correct for multiple comparisons and *threshold-free cluster enhancement* (TFCE). Age and sex were used as nuisance covariates. Results were considered significant at  $p < 0.05$ , TFCE corrected for multiple comparisons. WM regions were named according to the Johns Hopkins University white-matter tractography atlas (39).

## Tract-wise analysis

Comparisons of tract-average FA, MD, RD, AD, FW, FAT, MDt, RDt, ADt, and FD values

between the groups were performed using GLM, adjusting for age and sex. FDR correction was performed for the 35 tracts tested using the Benjamini-Hochberg procedure.

Each tract was divided into 50 sections for further examination. Contrasts between groups were calculated with  $t$ -tests for each bundle subsection (36, 37). The procedure aimed to explore bundle segments that were contrasted between the COV+ and COV- groups. To increase the statistical robustness and account for multiple comparisons, each  $t$ -test was repeated with 10,000 permutations to generate a corrected significance threshold (40). A  $t$ -test was considered statistically significant if the  $p$ -value was  $< 0.05$ , and its  $t$ -absolute values exceeded the computed threshold. The purpose of this analysis was to ensure that the observed changes were distributed uniformly along the bundle, as fanning of the fibers at the extremities of a bundle could bias the diffusion measurements.

In each group, we performed a partial correlation analysis between tract-average measures, CFQ-11 scores (total, physical, and mental fatigue), MoCA, and CANTAB cognitive outcomes, adjusting for age, sex, education, and time between COVID-19 diagnosis and study clinical/imaging procedures. Data underwent a non-parametric transformation and were analyzed using Pearson's coefficient. Statistical significance was defined as a two-tailed  $p$ -value  $< 0.05$ , with FDR correction for multiple comparisons.

TABLE 1 Demographic and clinical features (COV+ and COV- groups).

Demographic and clinical characteristics	COVID-19 (COV+)	Control (COV-)	Statistic
	(n = 56, 60%)	(n = 37, 40%)	
Age	37.2 ± 9.4 (20, 57)	40.2 ± 11.8 (22, 60)	U = 885; p = 0.237 <sup>a</sup>
Sex			χ <sup>2</sup> = 0.22; p = 0.638 <sup>b</sup>
Male, n (%)	20 (36.0%)	15 (41.0%)	
Female, n (%)	36 (64.0%)	22 (59.0%)	
Years of formal education	15.3 ± 3.3 (11, 24)	15.0 ± 3.3 (8, 21)	U = 1010; p = 0.840 <sup>a</sup>
Self-reported comorbidities n (%)			
Hypertension	5 (8.9%)	3 (8.1%)	χ <sup>2</sup> = 0.02; p = 0.890 <sup>b</sup>
Diabetes mellitus	5 (8.9%)	3 (8.1%)	χ <sup>2</sup> = 0.02; p = 0.890 <sup>b</sup>
Obesity	1 (1.8%)	3 (8.1%)	χ <sup>2</sup> = 2.16; p = 0.141 <sup>b</sup>
Asthma/COPD	2 (3.6%)	2 (5.4%)	χ <sup>2</sup> = 0.18; p = 0.670 <sup>b</sup>
Allergic rhinosinusitis	15 (27.0%)	10 (27.0%)	χ <sup>2</sup> = 0.00; p = 0.980 <sup>b</sup>
Thyroid disorder	3 (5.4%)	1 (2.7%)	χ <sup>2</sup> = 0.38; p = 0.537 <sup>b</sup>
Mood disorder	4 (7.1%)	2 (5.4%)	χ <sup>2</sup> = 0.11; p = 0.739 <sup>b</sup>
Migraine	14 (25.0%)	7 (19.0%)	χ <sup>2</sup> = 0.47; p = 0.492 <sup>b</sup>
Chalder fatigue scale (CFQ-11)			
Total score CFQ-11	16.3 ± 7.5 (0, 29)	9.2 ± 7.4 (0, 26)	t = 4.502; p = <0.001 <sup>c</sup>
Cut-off ≥ 16 n (%)	33 (58.9%)	8 (21.6%)	χ <sup>2</sup> = 12.58; p = <0.001 <sup>b</sup>
Physical fatigue	10.4 ± 5.2 (0, 19)	5.3 ± 4.5 (0, 15)	t = 4.840; p = <0.001 <sup>c</sup>
Mental fatigue	5.9 ± 3.2 (0, 11)	3.8 ± 3.3 (0, 11)	U = 669; p = 0.004 <sup>a</sup>
Average time between positive qRT-PCR and clinical assessment/MRI (days)	93.3 ± 26.4 (31, 167)	-	-
Acute phase treatment scenario n (%)			
Inpatient	3 (5.2%)		
Outpatient	53 (94.6%)		
Oxygen supplementation n (%)			
Non-invasive ventilation or high flow mask	2 (3.6%)		
Low flow nasal catheter	3 (5.4%)		
None	51 (91.0%)		

CFQ-11, Chalder Fatigue Scale; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; qRT-PCR, real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction; MRI, magnetic resonance imaging.

Data are shown as mean ± standard deviation (minimum, maximum) or n (%).

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test, <sup>b</sup>Chi-square test, <sup>c</sup>independent-sample t-test.

## Results

### Demographic and clinical characteristics

Initially, we recruited 97 participants (Figure 2). In the COV+ group, two participants were excluded because of MRI contraindications. Two participants from the COV- group were excluded: one due to a positive SARS-CoV-2 IgG test result and another because of a brain structural change on MRI.

Ninety-three participants underwent clinical examinations, cognitive tests, and MRI: 56 in the COV+ group and 37 in the COV- group. All the procedures for each patient were performed on the same visit. The groups did not differ in age ( $p = 0.237$ ), sex ( $p = 0.638$ ), education ( $p = 0.840$ ), or comorbidity profiles (Table 1). The average time between

COVID-19 diagnosis and study clinical/imaging procedures was 93.3 (±26.4) days, ranging from 31 to 167 days. Most patients (95%) did not require hospitalization. None of the patients required mechanical ventilation.

All COV+ patients had at least two COVID-19-related symptoms during the acute phase of infection. The main acute-phase symptoms were headache (80.4%), hyposmia (80.4%), myalgia (73.2%), dysgeusia (67.9%), fatigue (60.7%), hyporexia (53.6%), fever (50.0%), dry cough (46.4%), sore throat (44.6%), nasal discharge (44.6%), and dyspnea (39.3%).

The prevalence of post-acute COVID-19 symptoms was also estimated. Of 56 COVID-19 patients, 52 (92.8%) had at least one post-COVID symptom. Hyposmia occurred in 71.4%, fatigue in 51.8%, headache in 44.6%, sustained attention complaints in 39.3%, memory complaints in 37.6%, dysgeusia in 33.9%,



TABLE 2 Cognitive function comparison between COV+ and COV- groups.

Cognitive measure	COVID-19 (COV+)	Control (COV-)	Statistic
	( <i>n</i> = 56, 60%)	( <i>n</i> = 37, 40%)	
<b>Spatial working memory</b>			
SWMBE (between-errors)	15 (5, 22)	12 (4, 17)	U = 909; <i>p</i> = 0.320 <sup>a</sup>
SWMS (strategy use)	8.5 (7, 10)	8 (7, 9)	U = 984; <i>p</i> = 0.683 <sup>a</sup>
<b>One touch stockings of Cambridge</b>			
OTSPSFC (number of attempts)	10 (8.8, 12)	11 (9, 12)	U = 1035; <i>p</i> = 0.997 <sup>a</sup>
OTSMDFC (average latency, ms)	12,770 (8,819, 15,913)	12,247 (9,347, 15,530)	U = 1021; 0.909 <sup>a</sup>
OTSMCC (average of choices)	1.50 (1.20, 1.80)	1.47 (1.27, 1.87)	U = 1019; 0.897 <sup>a</sup>
OTSMCLC (average latency, ms)	27,908 (18,372, 35,436)	23,745 (20,138, 29,896)	U = 941; <i>p</i> = 0.458 <sup>a</sup>
<b>Paired associates learning</b>			
PALTEA (total error adjusted)	8 (5, 17)	12 (7, 21)	U = 892; 0.258 <sup>a</sup>
PALFAMS (first attempt memory score)	13.12 (4.23)	12.27 (3.88)	<i>t</i> = 0.985; <i>p</i> = 0.327 <sup>b</sup>
PALMETS (number of attempts)	2.0 (0.4, 2.0)	2.0 (1.0, 3.0)	U = 823; 0.085 <sup>a</sup>
<b>Pattern recognition memory</b>			
PRMPCI (% correct, immediate)	95.8 (83.3, 100.0)	100.0 (91.7, 100.0)	U = 946; <i>p</i> = 0.446 <sup>a</sup>
PRMPCD (% correct, delayed)	91.7 (75.0, 91.7)	91.7 (83.3, 100.0)	U = 997; <i>p</i> = 0.756 <sup>a</sup>
<b>Verbal recognition memory</b>			
VRMIRTC (immediate, total correct)	31 (28, 33)	30 (28, 32)	U = 961; <i>p</i> = 0.557 <sup>a</sup>
VRMDRTC (delayed, total correct)	32 (30, 34)	31 (30, 32)	U = 887; <i>p</i> = 0.241 <sup>a</sup>
VRMFRDS (free recall distinct stimuli)	6.5 (5.0, 8.0)	6.0 (4.0, 8.0)	U = 900; <i>p</i> = 0.284 <sup>a</sup>
<b>Reaction time</b>			
RTISMDRT (single choice reaction time, ms)	328 (311, 360)	328 (307, 344)	U = 914; <i>p</i> = 0.338 <sup>a</sup>
RTISMDMT (single choice mov. time, ms)	219.73 (64.61)	219.35 (55.28)	<i>t</i> = 0.029; <i>p</i> = 0.977 <sup>b</sup>
RTIFMDRT (five choice reaction time, ms)	383 (360, 429)	380 (354, 418)	U = 924; 0.379 <sup>a</sup>
RTIFMDMT (five choice mov. time, ms)	261.80 (75.10)	249.58 (29.29)	<i>t</i> = 0.833; <i>p</i> = 0.407 <sup>b</sup>
<b>MoCA</b>			
Global score	25 (22, 27)	25 (22, 28)	U = 1031; <i>p</i> = 0.969 <sup>a</sup>

MoCA, Montreal Cognitive Assessment; OTS, One Touch Stockings of Cambridge; PAL, Paired Associates Learning; PRM, Pattern Recognition Memory; RTI, Reaction time; SD, standard deviation; SWM, Spatial Working Memory; VRM, Verbal Recognition Memory; ms, milliseconds; mov., movement.

PALFAMS, RTISMDMT, and RTIFMDMT are shown as mean (standard deviation).

The other data are shown as median (interquartile range).

<sup>a</sup>Mann-Whitney U test, <sup>b</sup>Independent-sample t-test.

daytime sleepiness in 28.6%, dyspnea in 17.9%, and difficulty in daily activities in 14.3%. The COV+ group scored higher on the total CFQ-11 scale (*p* < 0.001), physical fatigue (*p* < 0.001), and mental fatigue (*p* = 0.004) (Table 1).

All participants underwent cognitive assessments and MRI. Ten participants were excluded from the d-MRI analysis because of head motion artifacts (Figure 2).

## Cognitive assessment

The COV+ and COV- groups did not differ with respect to the MoCA global score. There were no differences in CANTAB neurocognitive performance between the groups (Table 2).

## Cortical thickness and subcortical structures volume

The vertex-wise cortical thickness did not differ between the groups. The caudate, putamen, pallidum, thalamus, accumbens, hippocampus, and amygdala volumes did not differ (all *p* > 0.120).

## VBA

### COV+ vs. COV- group comparison

To explore AFD total between-group contrasts, whole-brain TBSS analysis was employed, adjusting for age and sex effects. The COV+ group had lower AFDtotal values than the

COV- group across 4,515 voxels ( $p < 0.05$ , TFCE-corrected; [Figure 3](#); [Supplementary Table 2](#)). The affected tracts included the left anterior thalamic radiation, corticospinal tract, cingulum (cingulate gyrus), inferior fronto-occipital fasciculus, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, and superior longitudinal fasciculus (temporal part). No between-group differences were observed for FA, MD, RD, AD, FAT, MDt, RDt, ADt, and FW using TBSS.

## Tract-wise analysis

### COV+ vs. COV- group comparison

In the tract-average analysis, the COV+ group had reduced FD in the left arcuate fasciculus and superior longitudinal fasciculus compared with the COV- group after adjusting for multiple comparisons ([Supplementary Table 3](#)). Reduced ADt in the right arcuate fasciculus and increased RDt in the left superior longitudinal fasciculus were observed in the COV+ group ([Supplementary Table 4](#)). No between-group differences were observed for FA, MD, RD, AD, FAT, MDt, and FW.

In along-tract statistics (tractometry), decreased FD was found in bundle sections within the arcuate fasciculus, cingulum, fornix, inferior fronto-occipital fasciculus, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, uncinata fasciculus, corona radiata, corticospinal tract, and corpus callosum (posterior genu and rostral body) in the COV+ group as compared with the controls ([Figure 4](#); [Supplementary Figure 1](#); [Supplementary Table 5](#)). Only results with a  $p$ -value less than 0.05 and a  $t$ -value greater than the significance threshold were reported. Most significant regions had at least 2 or 3 significant direct neighbors as well.

### Fiber density and FW-corrected DTI relationship with fatigue

In the COV+ group, tract-average FD values were negatively associated with total CFQ-11 score in the right corona radiata ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.008$ ), left corona radiata ( $r = -0.64$ ,  $p < 0.001$ ), right corticospinal tract ( $r = -0.57$ ,  $p = 0.001$ ), left corticospinal tract ( $r = -0.54$ ,  $p = 0.002$ ), posterior mid-body of the corpus callosum ( $r = -0.47$ ,  $p = 0.008$ ), and the middle cerebellar peduncle ( $r = -0.40$ ,  $p = 0.041$ ). The tract-average FAT measurements in the corona radiata, corticospinal tract, and corpus callosum were negatively correlated with the total CFQ-11 score. The tract-average ADt measurements in the corona radiata, corticospinal tract, and superior longitudinal right fasciculus were negatively correlated with the total CFQ-11 score ([Figure 5](#); [Supplementary Figure 2](#)).

In the COV- group, tract-average FD values were negatively associated with physical fatigue in the corona radiata, corticospinal tract, corpus callosum, and the middle cerebellar peduncle. The mental fatigue and FD values were not correlated

([Supplementary Figure 2](#)). The CFQ-11 scores (total, physical, and mental) and d-MRI metrics were not correlated in the COV- group.

## Free water imaging relationship with cognitive performance

In an exploratory manner, we performed partial correlations to investigate the association between d-MRI measures and CANTAB results. Tract-average FW values in the right fornix were associated with visual memory measures - PALTEA (Total errors adjusted,  $r = 0.53$ ,  $p = 0.022$ ) and PALFAMS (First attempt memory score,  $r = -0.53$ ,  $p = 0.022$ ) in the COV+ group ([Supplementary Figure 3](#)). An association of right fornix microstructural measures with visual memory was also identified for MDt, RDt, and ADt ([Supplementary Figures 4–8](#)).

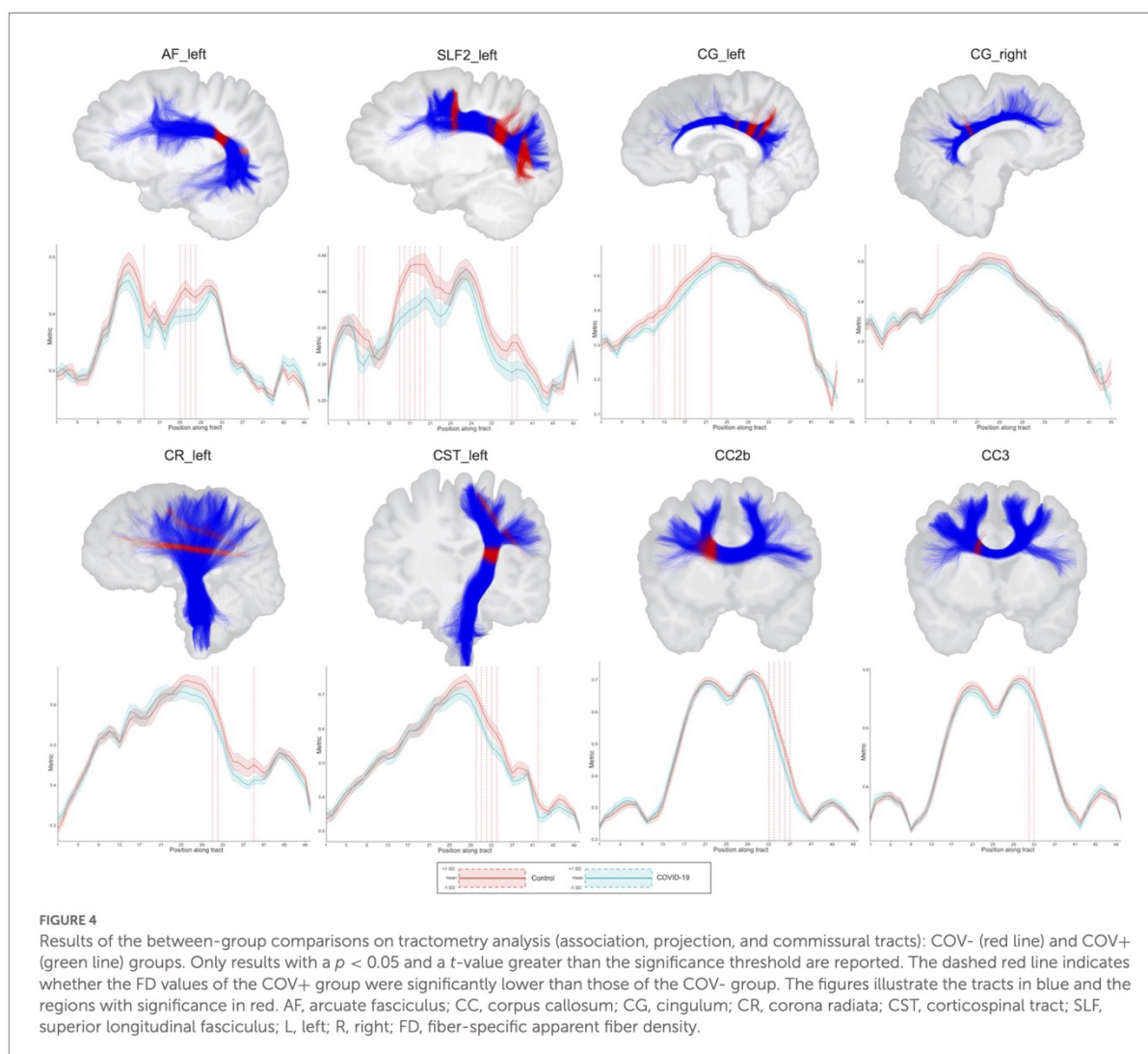
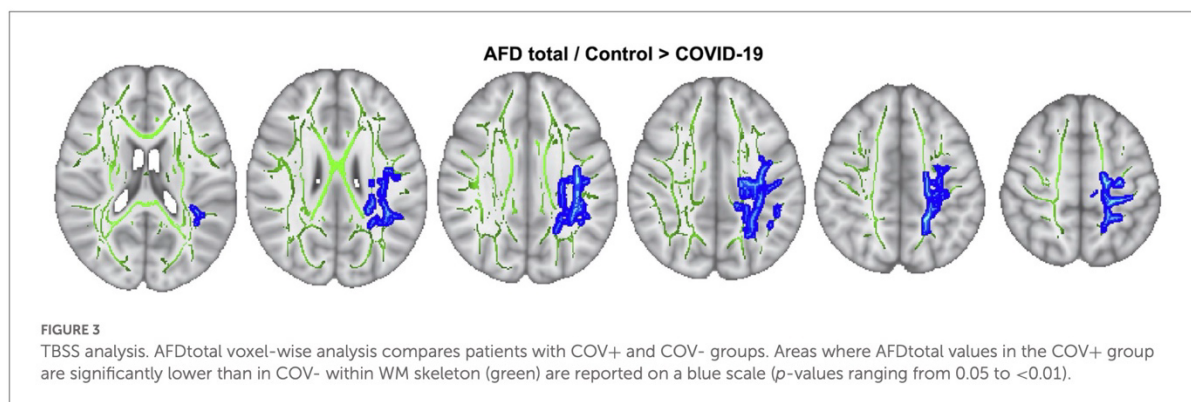
In the COV+ group, tract-average FW, FAT, and RDt values correlated with processing speed (single-choice reaction and movement time - RTISMDRT and RTISMDMT, and five-choice reaction time, RTIFMDRT). Tract-average d-MRI measures of the arcuate fasciculus, corpus callosum, cingulum, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, and fornix were associated with these processing speed measures ([Supplementary Figures 4–8](#)). WM measures and MoCA were not associated.

MoCA, CANTAB subtests, and d-MRI metrics did not correlate in the COV- group.

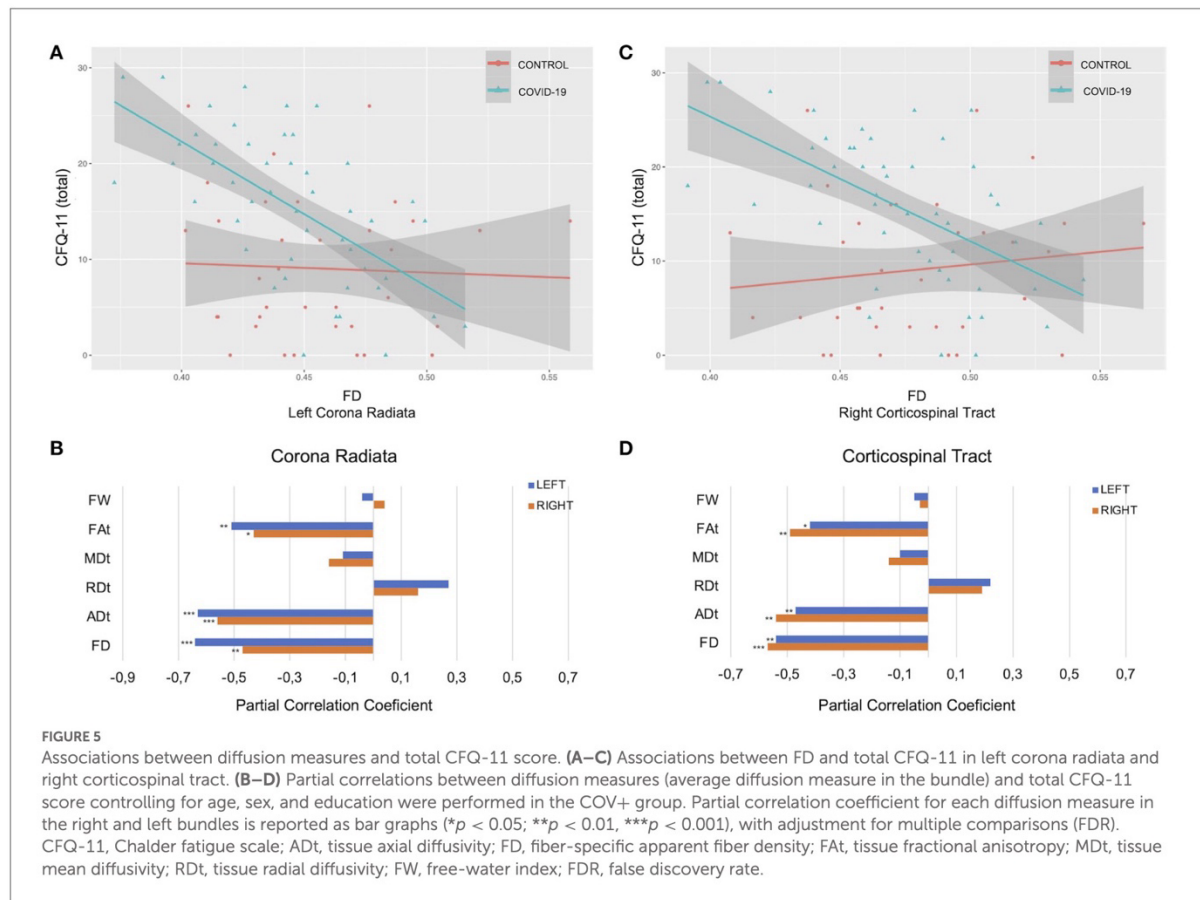
## Discussion

Our study showed that patients with COVID-19 had microstructural changes in the WM at a mean follow-up of 3 months. Compared to the control group, the COV+ subjects had decreased fiber density in the association, projection, and commissural WM tracts but no significant change in GM (cortical thickness or subcortical and limbic volumes). In the COV+ group, brain microstructural changes correlated with fatigue severity, performance in reaction time, and visual memory tests. Thus, the study provides evidence for possible brain substrates underlying symptoms caused by SARS-CoV-2 during medium-to long-term recovery in a predominantly non-hospitalized sample.

While DTI is the most frequently used d-MRI model for assessing WM integrity, it cannot resolve complex fiber geometries within the brain, which affects the quantification of related tissues. AFD, on the other hand, is a proxy for axonal degeneration because it reflects the apparent number of axons and is robust to crossing fibers (20). The FD for the fiber population within a single voxel was calculated using a fixel-based approach (41). We identified WM microstructural changes in the COV+ group: a reduction in FD in several bundles, such as the arcuate fasciculus, cingulum, fornix, inferior







fronto-occipital fasciculus, inferior longitudinal fasciculus, superior longitudinal fasciculus, uncinata fasciculus, corona radiata, corticospinal tract, and corpus callosum, in comparison to the COV- group. Reduced FD suggests that intra-axonal volume reduction of specific fiber populations (e.g., axonal loss) might be a contributing factor to the pathological substrate for post-COVID symptoms and deserves further exploration. One caveat is that our MRI protocol is in the clinical range (single-shell, with low  $b$ -values of  $800 \text{ m/s}^2$ ). Thus, the interpretation of these findings must be cautious because the correlation between axon volumes and FD might not be as straightforward as if the MRI had a multi-shell DTI acquisition and high  $b$ -values (e.g.,  $3,000 \text{ m/s}^2$ ).

There are limited publications on post-COVID brain microstructural changes. In studies performing DTI, increased FA was found in corona radiata, external capsule, and superior fronto-occipital fasciculus 3 months after SARS-CoV-2 infection in hospitalized patients (42), and decreased volume, length, and FA were found in association, projection, commissural, and limbic bundles in patients with mild-to-severe symptoms after COVID-19 pneumonia convalescence (12). Our study identified relevant changes in FD but did not replicate some of these

previously described DTI abnormalities. The profile of non-hospitalized patients with mild to moderate conditions in our study may explain the differences between the results of the DTI measurements with those of previous studies. However, FW-corrected DTI measurements are more sensitive to detect changes in some tracts (arcuate and superior longitudinal fascicles). In a recent study, multicompartiment diffusion microstructure imaging in inpatients with subacute COVID-19 with neurological symptoms revealed widespread volume shifts compatible with vasogenic edema, affecting various white matter tracts (43). Redistribution with decreasing intra-axonal and extra-axonal volumes and increasing free water/CSF fraction was observed at a mean follow-up of 30 days (43). In our study, we observed a reduction in white matter FD, without an increase in FW (edema). Our study's average recruitment time of 3 months may affect the evaluation of FW. In addition, in a sample of primarily hospitalized patients, reduced axonal densities have been detected in patients after recovery from COVID-19, 1 year after infection (44). To our knowledge, there is no serial d-MRI study following up on a non-hospitalized sample of patients with milder COVID-19 forms. Such a study is essential to validate and assess the persistence of WM changes in post-COVID.

Fatigue is well-documented in the post-COVID condition, even in non-hospitalized cases (45). In our study, the COV+ group had higher fatigue intensity than the control group. There was a negative correlation between fatigue intensity and axonal integrity measures (FD, FAT, and ADt) in the projection bundles, cerebellar tracts, and corpus callosum. These correlations were stronger in the corticospinal tract and corona radiata, especially for total and physical fatigue. These results are comparable to patients with chronic fatigue syndrome (CFS). Patients with CFS have WM microstructural changes in the ascending and descending tracts of the brainstem and the superior longitudinal fasciculus (46). The studies on CFS point to a reduced WM volume (47–49), impairments in myelination (49), reduced conduction (46), and abnormal functional connectivity linking the brainstem and other brain regions (50, 51). The prolonged motor conduction velocity (indicative of motor disturbances) may be attributed to insufficient myelination of tracts from the motor cortex in CFS (52). A hypothetical fatigue mechanism may involve abnormal motor system function and also dopaminergic dysfunction in the basal ganglia (53–55). Patients with fatigue and cognitive difficulties following mild COVID-19 have altered excitability and neurotransmission within the motor cortex and deficits in executive functions and attention (56). In addition, fatigue induced by multiple sclerosis (MS) associated with MD values (without correlation with FA) across several WM tracts bilaterally (corona radiata, corticospinal tracts, and cerebellar peduncles), suggesting that MS inflammatory component could produce symptoms of fatigue by inducing functional alterations in the brain networks (57). Taken together, these data give insights into the mechanisms of post-infectious fatigue, which remains a poorly understood topic (10).

A study including >80,000 participants (>12,000 patients with suspected COVID-19) identified a small but significant impairment in the global cognitive composite score for those infected with COVID-19 (8). Negative effects on cognitive performance were more substantial for those with respiratory difficulties, hospitalized, and placed on a ventilator. Our study found no difference in the MoCA global score and CANTAB cognitive performance between the COV+ and COV- groups. A milder COVID severity might explain this lack of effect on sensitive electronic cognitive tests in our cohort. An alternative explanation for the negative result is decreased statistical power due to the modest sample size.

The FW index, an indirect marker of neuroinflammation, has previously been investigated in the context of neurodegenerative conditions (58), mental disorders (59), and infectious diseases (60). In the COVID-19 group, the FW increase (in several WM tracts) was associated with attention/psychomotor speed and visual memory impairment. In a recent study, the magnitude of FW increase was tightly associated with cognitive impairment, expressed by low MoCA

performance, in patients with neurological symptoms (43). We speculate that neuroinflammation contributes to the pathophysiology of post-COVID cognitive symptoms. Giving support for that hypothesis, higher systemic inflammatory markers levels during acute COVID-19 have correlated with brain microstructural changes (61). Neurons, oligodendrocytes, and other glial cells may have impaired physiological functions during SARS-CoV-2 inflammatory insult, leading to a disturbance of brain homeostasis (62). Microglial dysfunction, disorders of neuronal plasticity, synaptic function, myelination, and the blood–brain barrier maintenance could have a role in impairing cognitive function, bringing short- and long-term neuropsychiatric consequences (63).

The present study had some limitations. This was a cross-sectional study using non-probabilistic sampling, thus limiting the generalizability of the results. The patients were evaluated only once during the post-acute phase. The subjects were not serially evaluated at two distinct time points, a caveat that precludes inferences about the temporal dynamics of WM abnormalities. The diffusion parameters chosen (e.g., low b-values) may limit the analysis of CSD metrics but, on the other hand, may better reflect the context of a clinical protocol.

In summary, WM microstructure changes were detected by d-MRI in patients in the COVID-19 post-acute phase, providing new insights into the neurological damage directly or indirectly caused by SARS-CoV-2 infection. Further follow-up of these patients throughout the recovery process will contribute to understanding the pathophysiology of neurological damage and the possible sequelae generated by COVID-19.

## Data availability statement

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

## Ethics statement

The studies involving human participants were reviewed and approved by Research Ethics Committee of the University of Brasilia (Certificate of Ethical Appreciation Presentation - CAAE 31378820.1.2006.0030). The patients/participants provided their written informed consent to participate in this study.

## Author contributions

DB, PB, DP, FG, and AS: study design. DB, PB, DP, CY, and MD: analysis and interpretation of data. DB, PB, and DP: drafting of the manuscript. DB,



PB, DP, FM, BD, HP, FG, AO, NR, LS, CY, AS, and MD: critical revision of the manuscript. All authors contributed in the approval of the final version for submission.

## Funding

The Research Support Foundation of the Federal District (FAP-DF) provided partial funding for this study under grant number 193001612/2016. LS was supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) Foundation under grant number 88887.505625/2020-00.

## Acknowledgments

The authors thank the patients and controls for their participation in the study. We would like to thank the staff of Hospital Santa Marta for their assistance in collecting the MRI data. We also thank the Sherbrooke Connectivity Imaging Laboratory team for their assistance, guidance, and cooperation in the MRI data processing. The manuscript's content has been previously available online in a preprint on the medRxiv platform (64).

## References

- Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med.* (2021) 27:601–15. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. COVID-19. Long COVID or Post-COVID Conditions. Available online at: <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/long-term-effects/index.html> (accessed June 27, 2022).
- Groff D, Sun A, Ssentongo AE, Ba DM, Parsons N, Poudel GR, et al. Short-term and long-term rates of postacute sequelae of SARS-CoV-2 infection: a systematic review. *JAMA Netw Open.* (2021) 4:1–17. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.28568
- Soriano JB, Murthy S, Marshall JC, Relan P, Diaz JV. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. *Lancet Infect Dis.* (2021) 703. doi: 10.1016/s1473-3099(21)00703-9
- Townsend L, Dyer AH, Jones K, Dunne J, Mooney A, Gaffney F, et al. Persistent fatigue following SARS-CoV-2 infection is common and independent of severity of initial infection. *PLoS ONE.* (2020) 15:e0240784. doi: 10.1371/journal.pone.0240784
- Becker JH, Lin JJ, Doernberg M, Stone K, Navis A, Festa JR, et al. Assessment of cognitive function in patients after COVID-19 infection. *JAMA Netw Open.* (2021) 4:8–11. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.30645
- Graham EL, Clark JR, Orban ZS, Lim PH, Szymanski AL, Taylor C, et al. Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non-hospitalized Covid-19 “long haulers.” *Ann Clin Transl Neurol.* (2021) 8:1073–85. doi: 10.1002/acn3.51350
- Hampshire A, Trendler W, Chamberlain SR, Jolly AE, Grant JE, Patrick F, et al. Cognitive deficits in people who have recovered from COVID-19. *EClinicalMedicine.* (2021) 39:101044. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101044
- Matos AD, Dahy FE, de Moura JV, Marcusso RM, Gomes AB, Carvalho FM, et al. Subacute cognitive impairment in individuals with mild and moderate COVID-19: a case series. *Front Neurol.* (2021) 12:1–8. doi: 10.3389/fneur.2021.678924
- Spudich S, Nath A. Nervous system consequences of COVID-19. *Science.* (2022) 375:267–9. doi: 10.1126/science.abm2052
- Thakur KT, Miller EH, Glendinning MD. COVID-19 neuropathology at Columbia University Irving medical center/New York

## Conflict of interest

Author MD was employed by Imeka Solutions Inc.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

## Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fneur.2022.1029302/full#supplementary-material>

- Presbyterian hospital. *Brain.* (2021) 144:2696–708. doi: 10.1093/brain/awab148
- Qin Y, Wu J, Chen T, Li J, Zhang G, Wu D, et al. Long-term microstructure and cerebral blood flow changes in patients recovered from COVID-19 without neurological manifestations. *J Clin Invest.* (2021) 131:7329. doi: 10.1172/JCI147329
  - Douaud G, Lee S, Alfaro-Almagro F, Arthofer C, Wang C, McCarthy P, et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature.* (2022) 604:697–707. doi: 10.1038/s41586-022-04569-5
  - Hosp JA, Dressing A, Blazhenets G, Bormann T, Rau A, Schwabenland M, et al. Cognitive impairment and altered cerebral glucose metabolism in the subacute stage of COVID-19. *Brain.* (2021) 144:1263–76. doi: 10.1093/brain/awab009
  - Basser PJ, Mattiello J, LeBihan D, MR. diffusion tensor spectroscopy and imaging. *Biophys J.* (1994) 66:259–67. doi: 10.1016/S0006-3495(94)80775-1
  - Pierpaoli C, Jezzard P, Basser PJ, Barnett A, Di Chiro G. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. *Radiology.* (1996) 201:637–48. doi: 10.1148/radiology.201.3.8939209
  - Pasternak O, Sochen N, Gur Y, Intrator N, Assaf Y. Free water elimination and mapping from diffusion MRI. *Magn Reson Med.* (2009) 62:717–30. doi: 10.1002/mrm.22055
  - Tournier J-D, Calamante F, Connelly A. Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. *Neuroimage.* (2007) 35:1459–72. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.02.016
  - Raffelt DA, Tournier JD, Smith RE, Vaughan DN, Jackson G, Ridgway GR, et al. Investigating white matter fibre density and morphology using fixel-based analysis. *Neuroimage.* (2017) 144(Pt A):58–73. doi: 10.1016/j.neuroimage.2016.09.029
  - Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T, Watts L, Wessely S, Wright D, et al. Apparent Fibre Density: a novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. *Neuroimage.* (2012) 59:3976–94. doi: 10.1016/j.neuroimage.2011.10.045
  - NeuroCOVID-19. *Brazilian Registry NeuroCovBr.* Available online at: <https://www.neurocovbr.com/>. (accessed February 1, 2022).

22. Jackson C. The Chalder fatigue scale (CFQ 11). *Occup Med.* (2015) 65:86. doi: 10.1093/occmed/kqu168
23. Chalder T, Berelowitz G, Pawlikowska T, Watts L, Wessely S, Wright D, et al. Development of a fatigue scale. *J Psychosom Res.* (1993) 37:147–53. doi: 10.1016/0022-3999(93)90081-p
24. Nøst Dahl T, Bernklev T, Fredheim OM, Paddison JS, Raeder J. Defining the cut-off point of clinically significant postoperative fatigue in three common fatigue scales. *Qual Life Res an Int J Qual Life Asp Treat care Rehabil.* (2019) 28:991–1003. doi: 10.1007/s11136-018-2068-0
25. Cella M, Chalder T. Measuring fatigue in clinical and community settings. *J Psychosom Res.* (2010) 69:17–22. doi: 10.1016/j.jpsychores.2009.10.007
26. Nasreddine ZS, Phillips NA, Bédirian V, Charbonneau S, Whitehead V, Collin I, et al. The Montreal cognitive assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. *J Am Geriatr Soc.* (2005) 53:695–9. doi: 10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x
27. Robbins TW, James M, Owen AM, Sahakian BJ, McInnes L, Rabbitt P. Cambridge neuropsychological test automated battery (CANTAB): a factor analytic study of a large sample of normal elderly volunteers. *Dementia.* (1994) 5:266–81. doi: 10.1159/000106735
28. Robbins TW, James M, Owen AM, Sahakian BJ, Lawrence AD, McInnes L, et al. A study of performance on tests from the CANTAB battery sensitive to frontal lobe dysfunction in a large sample of normal volunteers: implications for theories of executive functioning and cognitive aging. *Cambridge neuropsychological test automated. Batt J Int Neuropsychol Soc.* (1998) 4:474–90. doi: 10.1017/s1355617798455073
29. FreeSurfer Software Suite for Brain MRI Analysis. Athinoula A. Martinos Center for Biomedical Imaging. Available online at: <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>. (accessed February 1, 2022).
30. Theaud G, Houde J-C, Boré A, Rheault F, Morency F, Descoteaux M. TractoFlow: a robust, efficient and reproducible diffusion mri pipeline leveraging nextflow and singularity. *Neuroimage.* (2020) 218:116889. doi: 10.1016/j.neuroimage.2020.116889
31. Scilpy. Sherbrooke Connectivity Imaging Lab. Available online at: <https://github.com/scilus/scilpy>. (accessed February 1, 2022).
32. Smith SM, Jenkinson M, Johansen-Berg H, Rueckert D, Nichols TE, Mackay CE, et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage.* (2006) 31:1487–505. doi: 10.1016/j.neuroimage.2006.02.024
33. Garyfallidis E, Côté MA, Rheault F, Sidhu J, Hau J, Petit L, et al. Recognition of white matter bundles using local and global streamline-based registration and clustering. *Neuroimage.* (2018) 170:283–95. doi: 10.1016/j.neuroimage.2017.07.015
34. Rheault F. Analyse et reconstruction de faisceaux de la matière blanche. 2020. Available online at: <https://savoirs.usherbrooke.ca/handle/11143/17255>
35. Rheault F, St-Onge E, Sidhu J, Maier-Hein K, Tzourio-Mazoyer N, Petit L, et al. Bundle-specific tractography with incorporated anatomical and orientational priors. *Neuroimage.* (2019) 186:382–98. doi: 10.1016/j.neuroimage.2018.11.018
36. Cousineau M, Jodoin PM, Garyfallidis E, Côté MA, Morency FC, Rozanski V, et al. A test-retest study on Parkinson's PPMI dataset yields statistically significant white matter fascicles. *NeuroImage Clin.* (2017) 16:222–33. doi: 10.1016/j.nicl.2017.07.020
37. Yeatman JD, Dougherty RF, Myall NJ, Wandell BA, Feldman HM. Tract profiles of white matter properties: automating fiber-tract quantification. *PLoS ONE.* (2012) 7:e49790. doi: 10.1371/journal.pone.0049790
38. A Nextflow pipeline for diffusion MRI quality check (dmriqc\_flow). Sherbrooke Connectivity Imaging Lab. Available online at: [https://github.com/scilus/dmriqc\\_flow](https://github.com/scilus/dmriqc_flow). (accessed February 1, 2022).
39. Hua K, Zhang J, Wakana S. Tract probability maps in stereotaxic spaces: analyses of white matter anatomy and tract-specific quantification. *Neuroimage.* (2008) 39:336–47. doi: 10.1016/j.neuroimage.2007.07.053
40. Nichols TE, Holmes AP. Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: a primer with examples. *Hum Brain Mapp.* (2002) 15:1–25. doi: 10.1002/hbm.1058
41. Raffelt DA, Smith RE, Ridgway GR, Tournier JD, Vaughan DN, Rose S, et al. Connectivity-based fixel enhancement: whole-brain statistical analysis of diffusion MRI measures in the presence of crossing fibres. *Neuroimage.* (2015) 117:40–55. doi: 10.1016/j.neuroimage.2015.05.039
42. Tu Y, Zhang Y, Li Y, Zhao Q, Bi Y, Lu X, et al. Cerebral microstructural changes in COVID-19 patients – An MRI-based 3-month follow-up study: a brief title: cerebral changes in COVID-19. *EclinicalMedicine.* (2020) 25:100484. doi: 10.1016/j.eclinm.2020.100484
43. Rau A, Schroeter N, Blazhenets G, Dressing A, Walter LI, Kellner E, et al. Widespread white matter oedema in subacute COVID-19 patients with neurological symptoms. *Brain June.* (2022). doi: 10.1093/brain/awac045
44. Huang S, Zhou Z, Yang D, Zhao W, Zeng M, Xie X, et al. Persistent white matter changes in recovered COVID-19 patients at the 1-year follow-up. *Brain December.* (2021) 3:435. doi: 10.1093/brain/awab435
45. El Sayed S, Shokry D, Gomaa SM. Post-COVID-19 fatigue and anhedonia: A cross-sectional study and their correlation to post-recovery period. *Neuropsychopharmacol reports.* (2021) 41:50–5. doi: 10.1002/npr2.12154
46. Thapaliya K, Marshall-Gradisnik S, Staines D, Barnden L. Diffusion tensor imaging reveals neuronal microstructural changes in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome. *Eur J Neurosci.* (2021) 54:6214–28. doi: 10.1111/ejn.15413
47. Finkelmeyer A, He J, Maclachlan L, Watson S, Gallagher P, Newton JL, et al. Grey and white matter differences in Chronic Fatigue Syndrome - A voxel-based morphometry study. *NeuroImage Clin.* (2018) 17:24–30. doi: 10.1016/j.nicl.2017.09.024
48. Barnden LR, Crouch B, Kwiatek R, Burnet R, Mernone A, Chryssidis S, et al. A brain MRI study of chronic fatigue syndrome: evidence of brainstem dysfunction and altered homeostasis. *NMR Biomed.* (2011) 24:1302–12. doi: 10.1002/nbbreakm.1692
49. Barnden LR, Crouch B, Kwiatek R, Burnet R, Del Fante P. Evidence in chronic fatigue syndrome for severity-dependent upregulation of prefrontal myelination that is independent of anxiety and depression. *NMR Biomed.* (2015) 28:404–13. doi: 10.1002/nbm.3261
50. Barnden LR, Shan ZY, Staines DR, Marshall-Gradisnik S, Finegan K, Ireland T, et al. Intra brainstem connectivity is impaired in chronic fatigue syndrome. *NeuroImage Clin.* (2019) 24:102045. doi: 10.1016/j.nicl.2019.102045
51. Boissoneault J, Letzen J, Lai S, Robinson ME, Staud R. Static and dynamic functional connectivity in patients with chronic fatigue syndrome: use of arterial spin labelling fMRI. *Clin Physiol Funct Imaging.* (2018) 38:128–37. doi: 10.1111/cpf.12393
52. Hilgers A, Frank J, Bolte P. Prolongation of central motor conduction time in chronic fatigue syndrome. *J Chronic Fatigue Syndr.* (1998) 4:23–32. doi: 10.1300/J092v04n02\_03
53. Nakagawa S, Takeuchi H, Taki Y. Basal ganglia correlates of fatigue in young adults. *Sci Rep.* (2016) 6:21386. doi: 10.1038/srep21386
54. Nelson T, Zhang LX, Guo H, Nacul L, Song X. Brainstem abnormalities in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: a scoping review and evaluation of magnetic resonance imaging findings. *Front Neurol.* (2021) 12:769511. doi: 10.3389/fneur.2021.769511
55. Putra HA, Park K, Yamashita F, Mizuno K, Watanabe Y. Regional gray matter volume correlates to physical and mental fatigue in healthy middle-aged adults. *Neuroimage: Reports.* (2022) 2:100128. doi: 10.1016/j.ynimr.2022.1break00128
56. Orтели P, Ferrazzoli D, Sebastianelli L, Maestri R, Dezi S, Spampinato D, et al. Altered motor cortex physiology and dysexecutive syndrome in patients with fatigue and cognitive difficulties after mild COVID-19. *Eur J Neurol February.* (2022) 54:15278. doi: 10.1111/ene.15278
57. Dumont M, Roy M, Jodoin PM, Morency FC, Houde JC, Xie Z, et al. The neural basis of fatigue in multiple sclerosis: a multimodal MRI approach. *Neurol Clin Pract.* (2018) 8:492–500. doi: 10.1212/CPJ.0000000000000545
58. Dumont M, Roy M, Jodoin PM, Morency FC, Houde JC, Xie Z, et al. Free water in white matter differentiates MCI and AD from control subjects. *Front Aging Neurosci.* (2019) 11:270. doi: 10.3389/fnagi.2019.00270
59. Hegde RR, Kelly S, Lutz O, Guimond S, Karayumak SC, Mike L, et al. Association of white matter microstructure and extracellular free-water with cognitive performance in the early course of schizophrenia. *Psychiatry Res Neuroimaging.* (2020) 305:111159. doi: 10.1016/j.pscychres.2020.111159
60. Uddin MN, Faiyaz A, Wang L, Zhuang Y, Murray KD, Descoteaux M, et al. A longitudinal analysis of brain extracellular free water in HIV infected individuals. *Sci Rep.* (2021) 11:8273. doi: 10.1038/s41598-021-87801-y
61. Benedetti F, Palladini M, Paolini M, Melloni E, Vai B, De Lorenzo R, et al. Brain correlates of depression, post-traumatic distress, and inflammatory biomarkers in COVID-19 survivors: a multimodal magnetic resonance imaging study. *Brain, Behav Immun - Heal.* (2021) 18:100387. doi: 10.1016/j.bbih.2021.100387
62. Tremblay M-E, Madore C, Bordeleau M, Tian L, Verkhatsky A. Neuropathobiology of COVID-19: the role for Glia. *Front Cell Neurosci.* (2020) 14:592214. doi: 10.3389/fncel.2020.592214
63. Dabrowska E, Galińska-Skok B, Waszkiewicz N. Depressive and neurocognitive disorders in the context of the inflammatory background of COVID-19. *Life.* (2021) 11:1056. doi: 10.3390/life11101056
64. Bispo DDC, Brandão PRP, Pereira DA, Maluf FB, Dias BA, Paranhos HR, et al. Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19. *medRxiv [Preprint].* (2022). doi: 10.1101/2022.08.20.22279023



## *Supplementary Material*

### 1 Supplementary Figures and Tables

#### 1.1 Supplementary Tables

**Supplementary Table 1.** Key cognitive outcome measures

Cognitive measure name	Abbreviation	Brief description
Spatial working memory, between-errors total	SWMBE	The number of times a subject incorrectly revisits a box in which a token had already been found.
Spatial working memory, strategy	SWMS	The number of times a subject starts a new search pattern from the same box they started with earlier.
One-Touch Stockings of Cambridge, Problems solved on the first choice	OTSPSFC	The total number of assessed trials where the subject chose the correct answer on their first attempt.
One-Touch Stockings of Cambridge, The average latency for the first choice	OTSMDLFC	Average latency, measured from the appearance of the stocking balls to the first box choice, was taken by the subject.
One-Touch Stockings of Cambridge, Average of choices to correct	OTSMCC	The average number of box selections that the subject took before choosing the correct box.
One-Touch Stockings of Cambridge, Average latency to correct	OTSMLC	Average latency, measured from the appearance of the stocking balls to the choice of the correct box, was taken by the subject.
Paired Associates Learning, Adjusted total errors	PALTEA	The number of times the subject chose the wrong box for a stimulus in assessment problems plus an adjustment to the estimated number of errors they would have made in any problems, trials, and recalls.
Paired Associates Learning, Memory score on the first attempt	PALFAMS	The number of times the subject chooses the correct box on the first attempt to remember its location.
Paired Associates Learning, Mean errors to success	PALMETS	The average number of attempts to complete a test stage
Pattern Recognition Memory, the percentage of correct answers, immediate	PRMPCI	Number of patterns correctly selected by the subject in the immediate "forced-choice" condition, expressed as a percentage
Pattern Recognition Memory, the percentage of correct answers, delayed	PRMPCD	The number of patterns correctly selected by the subject in the delayed "forced-choice" condition expressed as a percentage.
Verbal Recognition Memory, Immediate verbal recognition, total correct answers	VRMIRTC	Total target words correctly recognized in the immediate recognition phase, plus the total number of distracting words that the subject correctly rejects.
Verbal Recognition Memory, Delayed verbal recognition, total correct answers	VRMDRTC	The total number of target words correctly recognized in the delayed recognition phase, plus the total number of distracting words that the subject correctly rejects.
Verbal Recognition Memory, Free verbal recall, different stimuli	VRMFRDS	Total number of different stimuli that are correctly remembered by the subject in the phase of free word list recall
Single-choice median reaction time	RTISMDRT	Median time taken to release the button after presenting a target stimulus. Measured in milliseconds
Single-choice median movement time	RTISMDMT	Median time taken to release the button and select the target stimulus after it flashes yellow on the screen. It is measured in milliseconds.
Five-choice median reaction time	RTIFMDRT	Median time taken to release the button after the target stimulus flashes yellow on the screen. Measured in milliseconds
Five-choice median movement time	RTIFMDMT	Median time taken to release the button and select the target stimulus after it flashes yellow on the screen. It is measured in milliseconds.

**Supplementary Table 2.** TBSS results significantly reduced AFDtotal in the COV+ group compared to the COV- group. The anatomical locations were determined by referring to the JHU white-matter tractography atlas. The value after each region indicates the percentage probability of the cluster belonging to the given atlas label.

Cluster	White matter tract	p-value	Voxels	MNI (x y z) (mm)		
corrected p-value < 0.05						
AFDtotal / COV- > COV+						
1	Anterior thalamic radiation L:0.3928 Corticospinal tract L:4.5856 Cingulum (cingulate gyrus) L:0.0829 Inferior fronto-occipital fasciculus L:0.0108 Inferior longitudinal fasciculus L:0.0775 Superior longitudinal fasciculus L:12.4739 Superior longitudinal fasciculus (temporal part) L:4.3892	0.026	4,515	-35	-19	34

Abbreviations: TBSS, tract-based spatial statistics; MNI, Montreal Neurological Institute; L, an abbreviation for the left hemisphere, R, abbreviation for the right hemisphere; AFDtotal, voxel-wise apparent fiber density.

**Supplementary Table 3.** Comparison of tract-average FW, FAt, and FD measures between control and COVID-19 groups, adjusting for multiple comparisons (FDR). Age and sex were included as covariates.

Tract	N	FW			FAt			FD		
		statistic	p-value	adj p	statistic	p-value	adj p	statistic	p-value	adj p
<i>Association Tracts</i>										
AF (L)	83	1.3404	0.1840	ns	-1.4041	0.1642	ns	-2.7668	0.0070	<b>0.0176</b>
AF (R)	83	0.0777	0.9382	ns	-1.4549	0.1497	ns	-1.1706	0.2453	ns
CG (L)	83	0.4322	0.6668	ns	-1.1128	0.2692	ns	-2.0862	0.0402	ns
CG (R)	83	0.6208	0.5365	ns	-0.4699	0.6397	ns	-1.2945	0.1993	ns
FX (L)	83	-1.2586	0.2119	ns	0.2182	0.8279	ns	0.0838	0.9334	ns
FX (R)	83	-1.0000	0.2883	ns	-0.3594	0.7203	ns	-0.8627	0.3909	ns
IFOF (L)	83	0.2981	0.7664	ns	-0.5843	0.5607	ns	-1.1916	0.2370	ns
IFOF (R)	83	-1.0898	0.2791	ns	-0.5276	0.5992	ns	-0.8180	0.4158	ns
ILF (L)	83	0.4894	0.6259	ns	-0.3538	0.7245	ns	-0.8028	0.4245	ns
ILF (R)	83	-1.2750	0.2060	ns	-0.3735	0.7098	ns	0.7067	0.4818	ns
SLF1 (L)	82	0.7935	0.4299	ns	-0.2917	0.7713	ns	-1.1157	0.2680	ns
SLF1 (R)	82	0.1050	0.9167	ns	-0.0680	0.9460	ns	-1.0808	0.2831	ns
SLF2 (L)	83	0.7492	0.4560	ns	-1.9440	0.0555	ns	-4.1441	0.0001	<b>0.0003</b>
SLF2 (R)	83	0.3672	0.7145	ns	-0.5532	0.5817	ns	-0.9890	0.3257	ns
SLF3 (L)	83	1.3674	0.1754	ns	-1.2180	0.2268	ns	-2.4932	0.0147	<b>0.0338</b>
SLF3 (R)	83	0.0050	0.9960	ns	-0.6692	0.5053	ns	-1.1172	0.2673	ns
UF (L)	83	1.1968	0.2350	ns	-0.8132	0.4185	ns	-0.9967	0.3219	ns
UF (R)	83	0.8023	0.4248	ns	-0.6405	0.5237	ns	-2.0819	0.0406	ns
<i>Projection Tracts</i>										
CR (L)	83	1.0810	0.2830	ns	-1.7953	0.0764	ns	-1.7566	0.0829	ns
CR (R)	83	0.6288	0.5313	ns	-0.9705	0.3348	ns	-0.9170	0.3619	ns
CST (L)	83	0.6414	0.5231	ns	-1.7264	0.0882	ns	-1.7133	0.0906	ns
CST (R)	83	1.1909	0.2373	ns	-0.6567	0.5133	ns	-0.7963	0.4282	ns
OR (L)	83	0.4395	0.6615	ns	-1.1504	0.2534	ns	-1.5422	0.1270	ns
OR (R)	83	-1.4913	0.1399	ns	-1.1942	0.2360	ns	-0.2631	0.7932	ns
<i>Corpus Callosum</i>										
Rostrum	83	-0.0750	0.9404	ns	-0.7661	0.4459	ns	-1.2245	0.2244	ns
Genu (A)	83	0.0628	0.9501	ns	-0.4008	0.6896	ns	-0.6928	0.4905	ns
Genu (P)	83	0.2716	0.7867	ns	-0.3049	0.7613	ns	-0.5060	0.6143	ns
Rostral Body	83	0.4940	0.6226	ns	-0.3849	0.7014	ns	-1.0515	0.2962	ns
Mid-Body (A)	83	0.8628	0.3909	ns	-0.8193	0.4151	ns	-1.3758	0.1728	ns
Mid-Body (P)	83	1.7139	0.0905	ns	-1.1160	0.2678	ns	-1.8233	0.0720	ns
Isthmus	83	0.6921	0.4909	ns	-0.1809	0.8569	ns	-0.9417	0.3492	ns
Splenium	83	0.8067	0.4223	ns	-2.0815	0.0406	ns	-1.8938	0.0619	ns
<i>Cerebellar Tracts</i>										
MCP	83	-0.5661	0.5729	ns	-1.6840	0.0961	ns	0.7375	0.4630	ns
SCP (L)	83	-0.3679	0.7139	ns	-0.7190	0.4742	ns	0.0006	0.9995	ns
SCP (R)	83	0.1060	0.9158	ns	0.2269	0.8211	ns	0.6936	0.4900	ns

Abbreviations: AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; A, anterior; P, posterior; L, left; R, right; FW, free-water; FAt, tissue fractional anisotropy; FD, fiber-specific apparent fiber density; ns, not significant; adj, adjusted. Significant p values at a threshold of  $p < 0.05$  are indicated in bold font.

**Supplementary Table 4.** Comparison of tract-average MDt, RDt, and ADt measures between control and COVID-19 groups, adjusting for multiple comparisons (FDR). Age and sex were included as covariates.

Tract	N	MDt			RDt			ADt		
		statistic	p-value	adj p	statistic	p-value	adj p	statistic	p-value	adj p
<i>Association Tracts</i>										
AF (L)	83	2.1929	0.0313	ns	2.0792	0.0408	ns	1.5321	0.1295	ns
AF (R)	83	-0.8679	0.3881	ns	0.2660	0.7909	ns	-2.6631	0.0094	<b>0.0285</b>
CG (L)	83	1.3288	0.1878	ns	1.4035	0.1644	ns	0.2878	0.7742	ns
CG (R)	83	0.0564	0.9552	ns	0.2337	0.8158	ns	-0.2846	0.7767	ns
FX (L)	83	-1.8241	0.0719	ns	-1.6269	0.1077	ns	-1.8417	0.0693	ns
FX (R)	83	-0.7085	0.4807	ns	-0.7633	0.4475	ns	-0.6263	0.5329	ns
IFOF (L)	83	0.6257	0.5333	ns	0.7522	0.4541	ns	-0.1598	0.8734	ns
IFOF (R)	83	-1.1838	0.2401	ns	-0.2003	0.8418	ns	-1.9240	0.0580	ns
ILF (L)	83	0.6882	0.4934	ns	0.4707	0.6391	ns	0.5611	0.5763	ns
ILF (R)	83	-1.1994	0.2340	ns	-0.5102	0.6113	ns	-1.4912	0.1399	ns
SLF1 (L)	82	1.6094	0.1116	ns	1.0080	0.3166	ns	1.8319	0.0708	ns
SLF1 (R)	82	-0.1877	0.8516	ns	-0.2141	0.8310	ns	-0.0399	0.9683	ns
SLF2 (L)	83	2.0859	0.0402	ns	2.3632	0.0206	<b>0.0430</b>	0.8378	0.4047	ns
SLF2 (R)	83	-0.6642	0.5085	ns	-0.0191	0.9848	ns	-1.4407	0.1536	ns
SLF3 (L)	83	2.1166	0.0374	ns	1.9132	0.0593	ns	1.6985	0.0933	ns
SLF3 (R)	83	-0.8427	0.4019	ns	-0.0810	0.9357	ns	-1.9718	0.0521	ns
UF (L)	83	1.1821	0.2407	ns	1.1402	0.2577	ns	0.4096	0.6832	ns
UF (R)	83	0.0332	0.9736	ns	0.5227	0.6027	ns	-0.8499	0.3979	ns
<i>Projection Tracts</i>										
L CR	83	1.4985	0.1380	ns	1.9211	0.0583	ns	0.0287	0.9772	ns
R CR	83	-0.5312	0.5968	ns	0.3399	0.7348	ns	-1.3631	0.1767	ns
L CST	83	1.0825	0.2823	ns	1.6493	0.1031	ns	-0.1215	0.9036	ns
R CST	83	-0.3254	0.7458	ns	0.2484	0.8045	ns	-0.8342	0.4067	ns
L OR	83	1.0443	0.2996	ns	1.1044	0.2728	ns	0.3050	0.7612	ns
R OR	83	-0.8172	0.4163	ns	0.1995	0.8424	ns	-1.9637	0.0531	ns
<i>Corpus Callosum</i>										
Rostrum	83	-0.0924	0.9266	ns	0.5232	0.6023	ns	-0.9860	0.3271	ns
Genu (A)	83	-0.0339	0.9730	ns	0.4381	0.6625	ns	-0.6113	0.5428	ns
Genu (P)	83	0.4856	0.6286	ns	0.6013	0.5494	ns	-0.0025	0.9980	ns
Rostral Body	83	0.4179	0.6771	ns	0.5382	0.5920	ns	-0.0482	0.9617	ns
Mid-body (A)	83	0.4803	0.6323	ns	0.7926	0.4304	ns	-0.2377	0.8128	ns
Mid-body (P)	83	1.4107	0.1623	ns	1.4722	0.1449	ns	0.5678	0.5717	ns
Isthmus	83	1.2853	0.2024	ns	0.6038	0.5477	ns	1.3354	0.1856	ns
Splenium	83	1.0173	0.3121	ns	1.8827	0.0634	ns	-0.6168	0.5391	ns
<i>Cerebellar Tracts</i>										
MCP	83	0.1954	0.8456	ns	1.1784	0.2422	ns	-1.0125	0.3144	ns
L SCP	83	-0.1880	0.8514	ns	0.7507	0.4551	ns	-0.6707	0.5043	ns
R SCP	83	-0.1208	0.9041	ns	-0.0771	0.9387	ns	-0.0611	0.9514	ns

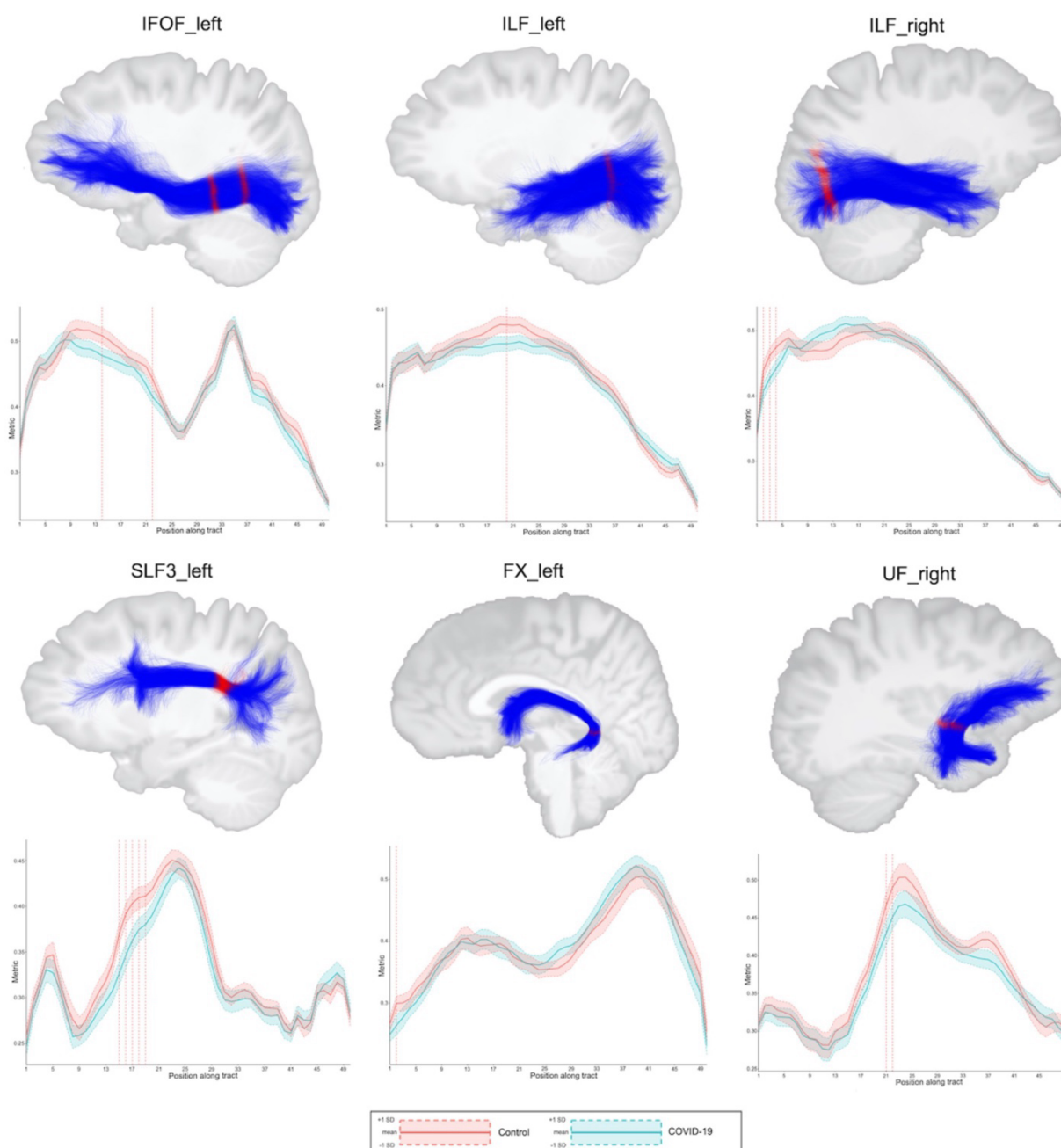
Abbreviations: AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; A, anterior; P, posterior; L, left; R, right; MDt, tissue mean diffusivity; RDt, tissue radial diffusivity; ADt, tissue axial diffusivity; ns, not significant; adj, adjusted. Significant p values at a threshold of  $p < 0.05$  are indicated in bold font.



**Supplementary Table 5.** Tract profiles showing significant between-group differences. The t- and p-values, and the corrected significance threshold computed from permutations (threshold) are shown. The difference is significant when the p-value is lower than 0.05, and the t-value in absolute value is greater than the significance threshold. It is a significant increase in control group versus COVID-19 when the t-value is positive, and a significant decrease when it is negative.

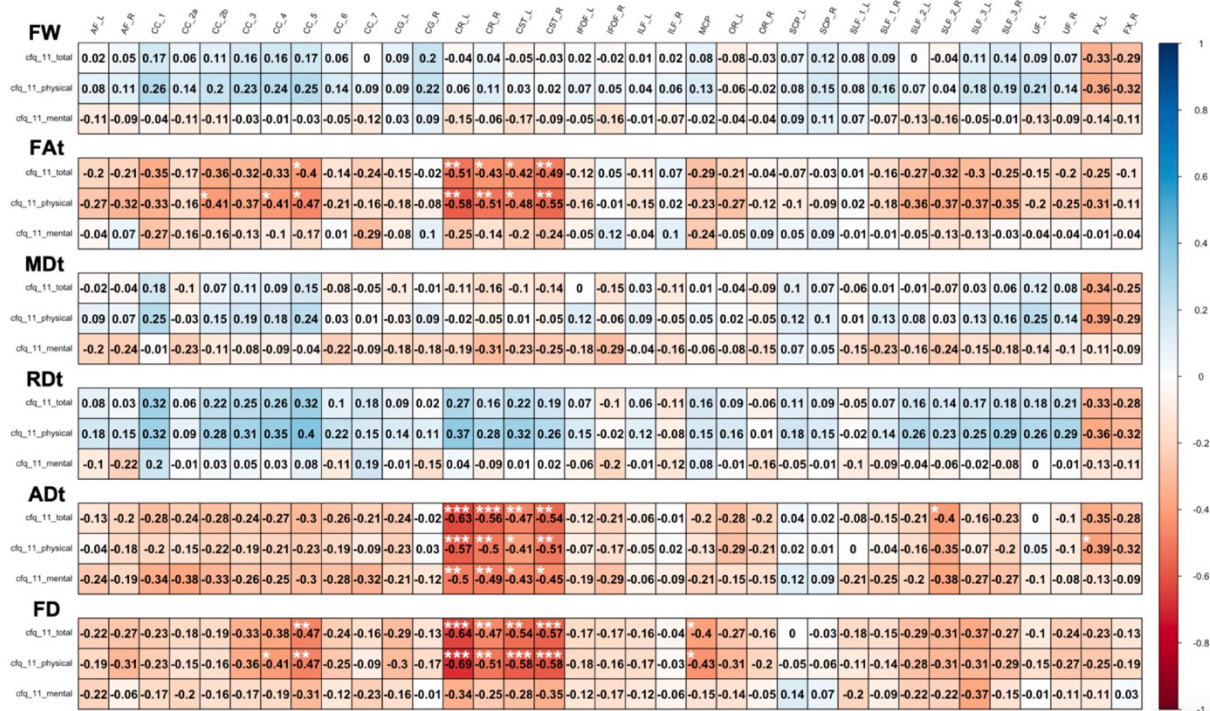
**[The table is in a separate file]**

## 1.2 Supplementary Figures



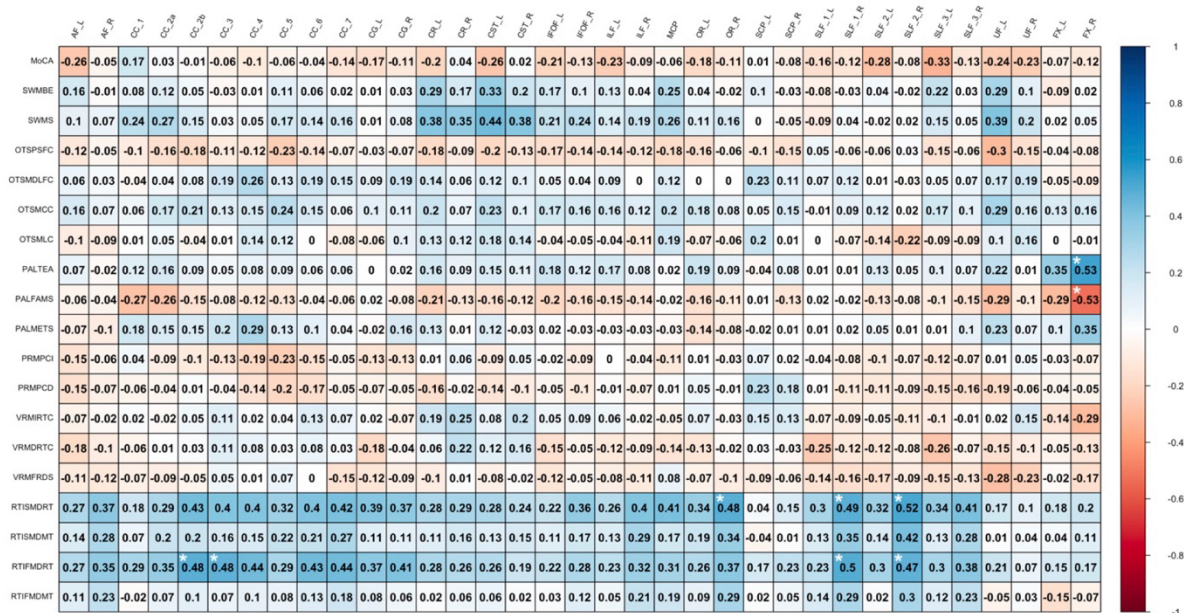
**Supplementary Figure 1.** Results of the between-group comparisons on tractometry analysis (association tracts): control (red line) and COVID-19 (green line) groups. Only results with a  $p < 0.05$  and a  $t$ -value greater than the significance threshold are reported. The dashed red line indicates whether the FD values of the COVID-19 group were significantly lower than those of the control group.

Abbreviations: FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; FD, fiber-specific apparent fiber density. The figures illustrate the tracts in blue and the regions with significance in red.



**Supplementary Figure 2.** Heat map showing the partial correlation amongst diffusion measures and CFQ-11 (total, physical, and mental) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05, \*\* < 0.01, \*\*\* < 0.001).

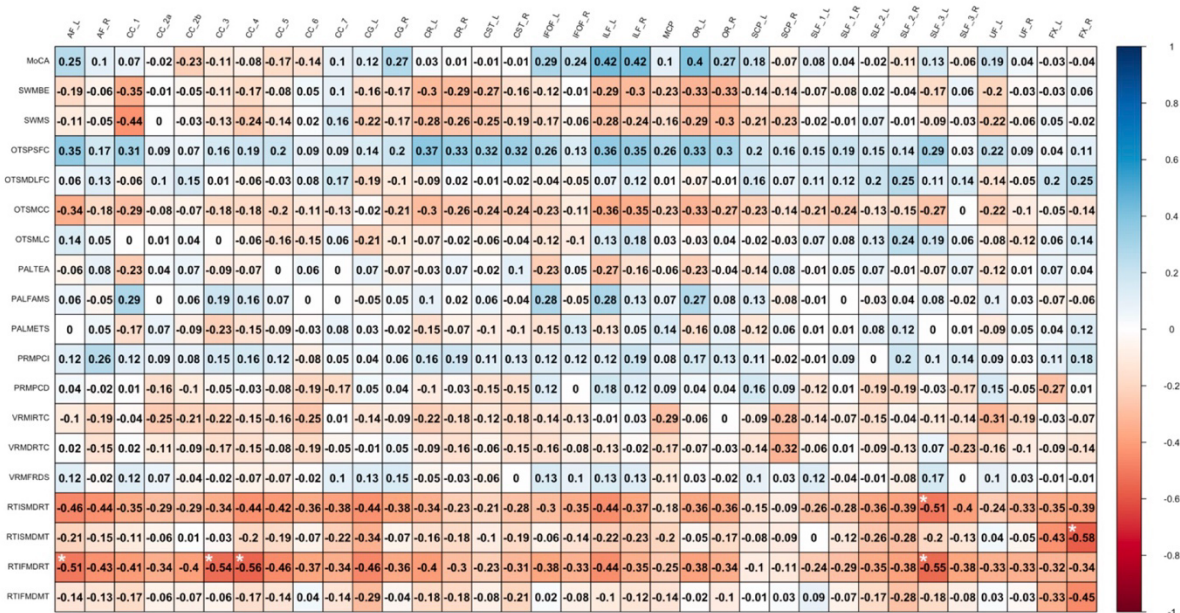
Abbreviations: CFQ-11, Chalder Fatigue Scale; ADt, tissue axial diffusivity; FD, fiber-specific apparent fiber density; FAT, tissue fractional anisotropy; MDt, tissue mean diffusivity; RDt, tissue radial diffusivity; FW, free-water index; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.



**Supplementary Figure 3.** Heat map showing the partial correlation amongst FW and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

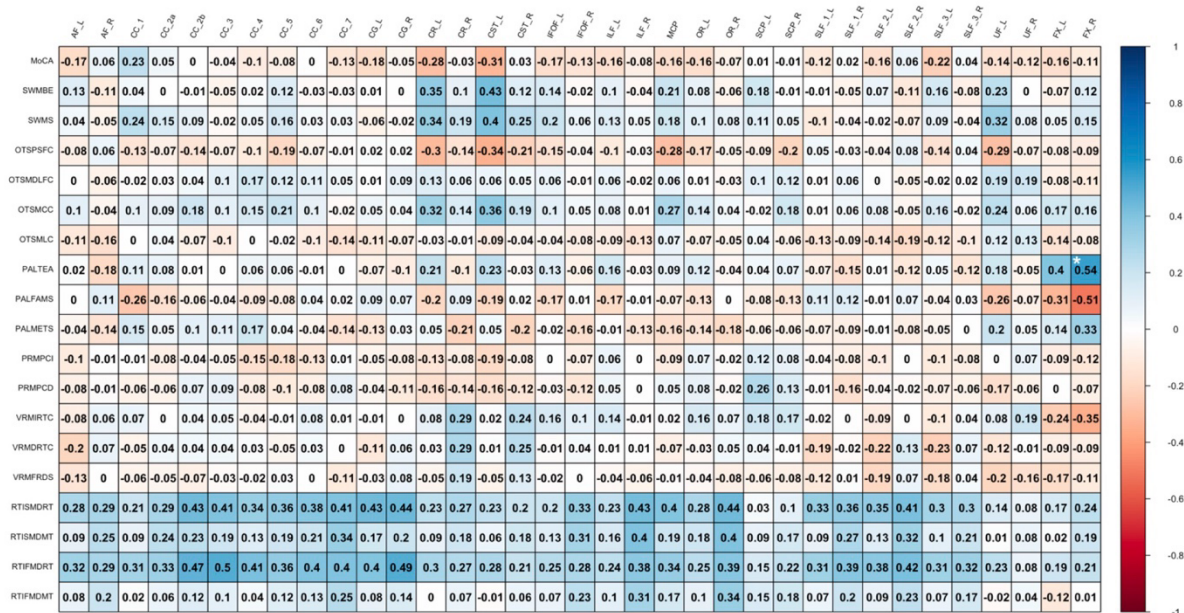
Abbreviations: FW, free-water index; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.





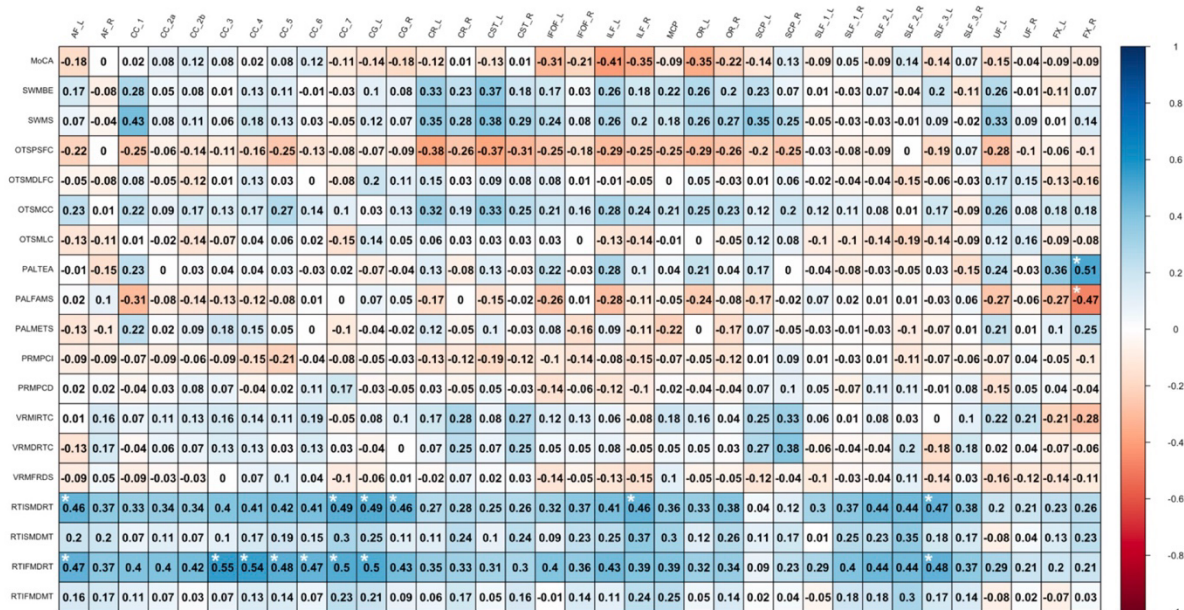
**Supplementary Figure 4.** Heat map showing the partial correlation amongst FAt and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

Abbreviations: FAt, tissue fractional anisotropy; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.



**Supplementary Figure 5.** Heat map showing the partial correlation amongst MDt and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

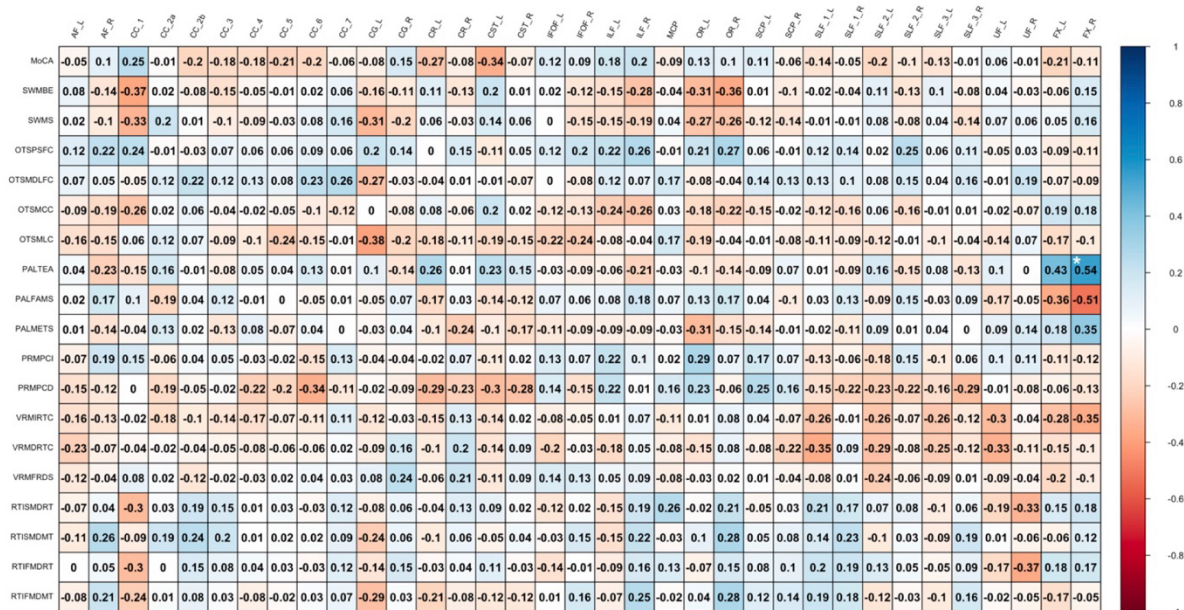
Abbreviations: MDt, tissue mean diffusivity; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.



**Supplementary Figure 6.** Heat map showing the partial correlation amongst RDt and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

Abbreviations: RDt, tissue radial diffusivity; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.

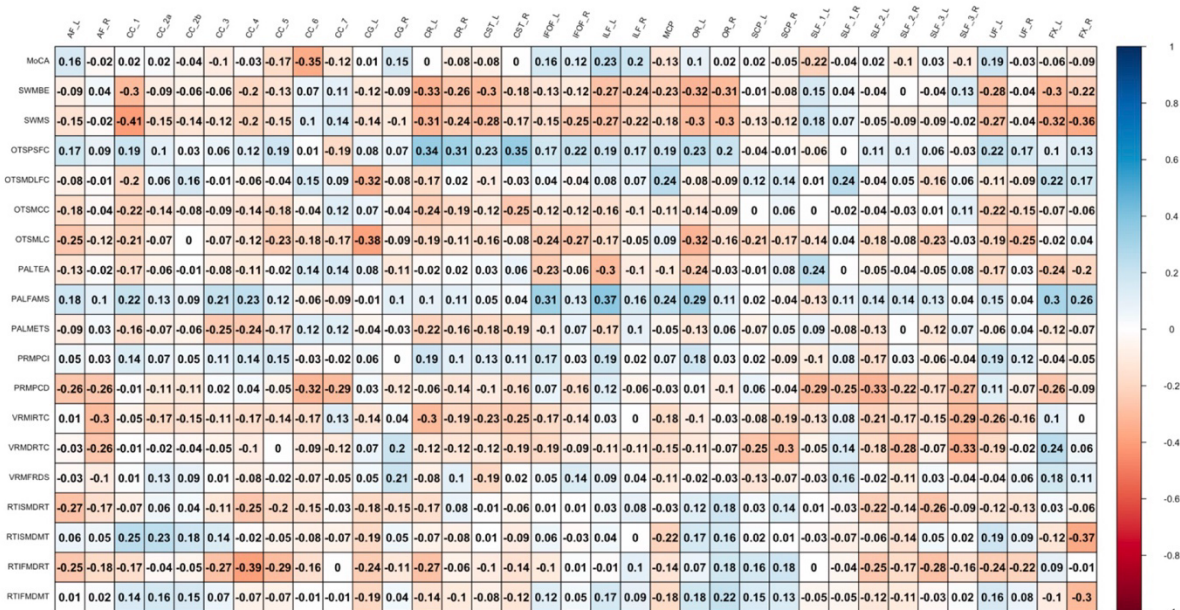




**Supplementary Figure 7.** Heat map showing the partial correlation amongst ADt and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

Abbreviations: ADt, tissue axial diffusivity; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.





**Supplementary Figure 8.** Heat map showing the partial correlation amongst FD and cognitive measures (MoCA and CANTAB outcomes) in the COV+ group, controlling for covariates, with adjustment for multiple comparisons (FDR). Results with statistical significance are highlighted (\* < 0.05).

Abbreviations: FD, fiber-specific apparent fiber density; AF, arcuate fasciculus; CG, cingulum; FX, fornix; IFOF, inferior frontal occipital fasciculus; ILF, inferior longitudinal fasciculus; SLF, superior longitudinal fasciculus; UF, uncinate fasciculus; CR, corona radiata; CST, corticospinal tract; OR, optic radiation; SCP, superior cerebellar peduncle; MCP, middle cerebellar peduncle; CC, corpus callosum; L, left; R, right.

## 5.2. Estudo 2: Conectividade estrutural alterada na disfunção olfativa após COVID-19 leve

Este artigo foi publicado no periódico *Scientific Reports*, em conformidade com os termos da licença CC-BY 4.0 (BISPO et al., 2023).

Bispo DDC, Brandão PRP, Pereira DA, Maluf FB, Dias BA, Paranhos HR, von Glehn F, de Oliveira ACP, Soares AASM, Descoteaux M, Regattieri NAT. **Altered structural connectivity in olfactory dysfunction after mild COVID-19 using probabilistic tractography**. *Sci Rep*. 2023 Aug 9;13(1):12886. doi: 10.1038/s41598-023-40115-7.



# OPEN Altered structural connectivity in olfactory dysfunction after mild COVID-19 using probabilistic tractography

Diógenes Diego de Carvalho Bispo<sup>1,2,3,10✉</sup>, Pedro Renato de Paula Brandão<sup>4,5,10</sup>, Danilo Assis Pereira<sup>6</sup>, Fernando Bisinoto Maluf<sup>3</sup>, Bruna Arrais Dias<sup>3</sup>, Hugo Rafael Paranhos<sup>3</sup>, Felipe von Glehn<sup>2,5</sup>, Augusto César Penalva de Oliveira<sup>7</sup>, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares<sup>2</sup>, Maxime Descoteaux<sup>8,9,11</sup> & Neysa Aparecida Tinoco Regattieri<sup>2,11</sup>

We aimed to investigate changes in olfactory bulb volume and brain network in the white matter (WM) in patients with persistent olfactory dysfunction (OD) following COVID-19. A cross-sectional study evaluated 38 participants with OD after mild COVID-19 and 24 controls, including Sniffin' Sticks identification test (SS-16), MoCA, and brain magnetic resonance imaging. Network-Based Statistics (NBS) and graph theoretical analysis were used to explore the WM. The COVID-19 group had reduced olfactory bulb volume compared to controls. In NBS, COVID-19 patients showed increased structural connectivity in a subnetwork comprising parietal brain regions. Regarding global network topological properties, patients exhibited lower global and local efficiency and higher assortativity than controls. Concerning local network topological properties, patients had reduced local efficiency (left lateral orbital gyrus and pallidum), increased clustering (left lateral orbital gyrus), increased nodal strength (right anterior orbital gyrus), and reduced nodal strength (left amygdala). SS-16 test score was negatively correlated with clustering of whole-brain WM in the COVID-19 group. Thus, patients with OD after COVID-19 had relevant WM network dysfunction with increased connectivity in the parietal sensory cortex. Reduced integration and increased segregation are observed within olfactory-related brain areas might be due to compensatory plasticity mechanisms devoted to recovering olfactory function.

Since its discovery in Wuhan, China, in late 2019, coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2), has resulted in more than 600 million infected and 6 million deaths<sup>1</sup> and put unprecedented pressure on social, economic and health systems around the world<sup>2</sup>. While initial research on COVID-19 has focused on acute illnesses, it lately has become clear that long-term consequences occur<sup>3</sup>. Many survivors of acute infection have persistent and disabling neurological symptoms, which can have socioeconomic and personal consequences. It is, therefore, imperative that there is a thorough understanding of evolving clinical syndromes and underlying pathophysiological mechanisms, allowing rational therapeutic interventions to be implemented quickly<sup>2</sup>.

Olfactory dysfunction has variable severity, including anosmia, hyposmia, and parosmia, and affects 30–70% of patients with COVID-19<sup>4</sup>. It occurs early in the course of infection, with no direct association with disease

<sup>1</sup>Diagnostic Imaging Unit, Brasilia University Hospital, University of Brasilia, Darcy Ribeiro Campus, Asa Norte, Brasilia, Distrito Federal, Brazil. <sup>2</sup>Faculty of Medicine, University of Brasilia, Brasilia, Distrito Federal, Brazil. <sup>3</sup>Department of Radiology, Hospital Santa Marta, Taguatinga, Distrito Federal, Brazil. <sup>4</sup>Neuroscience and Behavior Lab, University of Brasilia, Brasilia, Distrito Federal, Brazil. <sup>5</sup>Hospital Sírio-Libanês, Brasilia, Distrito Federal, Brazil. <sup>6</sup>Advanced Psychometry Laboratory, Brazilian Institute of Neuropsychology and Cognitive Sciences, Brasilia, Distrito Federal, Brazil. <sup>7</sup>Department of Neurology, Instituto de Infectologia Emilio Ribas, São Paulo, Brazil. <sup>8</sup>Sherbrooke Connectivity Imaging Lab, University of Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada. <sup>9</sup>Imeka Solutions Inc, Sherbrooke, QC, Canada. <sup>10</sup>These authors contributed equally: Diógenes Diego de Carvalho Bispo and Pedro Renato de Paula Brandão. <sup>11</sup>These authors jointly supervised this work: Maxime Descoteaux and Neysa Aparecida Tinoco Regattieri. ✉email: dbispo.neuroradio@gmail.com



severity or viral burden<sup>5</sup>. In one study, hyposmia was the first clinically presenting symptom in around 12% of patients<sup>6</sup>. In most cases, recovery is spontaneous within 3 to 4 weeks<sup>5,7</sup>. However, some patients develop persistent olfactory impairment up to 12 months after infection, suggesting that the damage to the olfactory system may be severe or permanent<sup>5</sup>.

Several hypotheses were proposed to explain the underlying mechanism for olfactory dysfunction in COVID-19<sup>8,9</sup>. The most notable theory regarding COVID-related hyposmia is the direct infection of olfactory receptor neurons by SARS-CoV-2 through the nasal mucosa. However, there is conflicting evidence on whether SARS-CoV-2 can indeed infect these neurons<sup>10</sup>. Angiotensin-converting enzyme 2 receptors—the target molecules for SARS-CoV-2, are not expressed in neural cells but by non-neuronal support cells in the olfactory epithelium. The lack of direct neuronal damage could justify the rapid recovery of olfactory function in most patients<sup>11</sup>. Despite this, SARS-CoV-2 infection seems to generate axonal pathology and microvasculopathy in the olfactory bulbs and tracts in those with olfactory alterations, due to local inflammation<sup>12</sup>.

Olfactory dysfunction during or after COVID-19 represents a marker of neurological disease and can be assessed with olfactory nerve imaging. Magnetic resonance imaging (MRI) can help evaluate patients with anosmia and hyposmia because it allows for elaborate visualization and measurement of the olfactory anatomical structures. Yet, studies that describe MRI-based anatomical changes in olfactory structures in COVID-19 are sparse and mainly represented by case reports. Despite this, a reduction in olfactory bulbs was described in 36 participants who had COVID-19 olfactory dysfunction compared to a control group 2 to 8 weeks after infection<sup>13</sup>, and in 196 subjects who had COVID-19 compared to controls 1 to 582 days after disease onset<sup>14</sup>. The association between olfactory bulb atrophy and severity of the olfactory dysfunction was not evaluated in these studies. Furthermore, the impact on brain connections is relatively unknown, especially in sensory and olfactory-related regions.

Diffusion-weighted magnetic resonance imaging (dMRI)-derived tractography is an advanced technique that may be used to investigate the mechanisms underlying anosmia by reconstructing major brain fiber pathways. This method allows for the mapping of white matter (WM) pathways through voxel-wise fiber orientations. It enables the reconstruction of structural connectivity matrices, generating networks that represent parts or the whole brain's anatomical organization, with streamlines serving as proxies for WM fiber bundles<sup>15</sup>. The Convex Optimization Modeling for Microstructure Informed Tractography 2 (COMMIT2) framework is used to remove false positive brain connections by assigning to each streamline its contribution to the dMRI signal, while imposing an anatomical regularization encouraging streamlines to group together as bundles in the connectivity matrix<sup>16,17</sup>. This filtering method significantly improves the accuracy of the resulting structural connectomes, thereby enhancing the reliability of the findings<sup>18</sup>.

Graph analysis is used to explore changes in the WM network based on graph theory<sup>18</sup>. After defining the nodes and edges (connections between regions), graph theory metrics represent distinct aspects of global or local network connectivity. A small-world architecture, for instance, indicates that the minimum path length between any pair of nodes is approximately equivalent to a comparable random network, but the network nodes have greater local interconnectivity or cliquishness than a random network<sup>15</sup>. The relationship between olfaction and brain network metrics is intimate. Studies have shown that hyposmia in aging and neurodegeneration relates to WM disconnection using graph analysis methods<sup>19,20</sup>, whereas individuals with the highest olfactory abilities, such as *sommeliers*, exhibit increased functional network connectivity and higher small-world topology than controls<sup>21</sup>. However, there is still a need for further exploration of WM network changes in non-neurodegenerative hyposmia. The use of graph theory in understanding changes in the WM network may help elucidate the underlying mechanisms of olfactory dysfunction.

The current study used a cross-sectional design to examine changes in the olfactory bulb volume and investigate brain networks in patients after COVID-19 compared to a control group. Our secondary objective was to determine whether there was an association between olfactory bulb volume, structural connectivity measures, and olfactory performance.

## Results

**Demographic and clinical characteristics.** In this study, we recruited a total of 67 individuals, out of which three participants from the COVID-19 group (COV+) were excluded. Two of the exclusions were due to MRI contraindications, while the third exclusion was due to a Montreal Cognitive Assessment (MoCA) score of less than 15. In addition, two participants from the control group (COV-) were excluded from the study. One exclusion was due to a positive SARS-CoV-2 IgG test result, while the other exclusion was due to the detection of a brain structural change on MRI. These exclusions were necessary to ensure the integrity and validity of the data obtained from the study population.

Clinical examinations, cognitive tests, and MRI were administered to a total of 62 participants, comprising 38 in the COV+ group and 24 in the COV- group. The groups did not exhibit any significant differences in age ( $p = 0.520$ ), sex ( $p = 0.550$ ), education ( $p = 0.555$ ), or comorbidity profiles (Table 1). The average time between COVID-19 diagnosis and study's clinical/imaging procedures was 91.7 ( $\pm 26.0$ ) days, with a range of 31 to 167 days. No subjects in the COV+ group required hospitalization during the acute phase or thereafter.

There was a significant difference between the two groups in the Sniffin' Sticks smell identification test (SS-16) score ( $p < 0.001$ ). In the COV+ group, 50% of patients were hyposmic (SS-16 test score below 12)<sup>22</sup>. None of the subjects in the COV- group had hyposmia. MoCA scores did not differ between groups ( $p = 0.663$ ) (Table 1).

**Assessment of the olfactory bulbs.** The olfactory bulbs of 53 participants (33 in the COV+ group and 20 in the COV- group) were manually segmented. Nine participants were excluded due to movement or magnetic susceptibility artifacts, usually due to metallic material in the oral cavity. In the assessment of interobserver

Demographic and clinical characteristics	COVID-19 (COV +)	Control (COV-)	Statistic
	(n = 38, 61%)	(n = 24, 39%)	
Age	36.4 ± 9.5 (20, 56)	39.3 ± 12.9 (22, 60)	U = 411; p = 0.520 <sup>1</sup>
Sex			
Male, n (%)	10 (26.3%)	8 (33.3%)	$\chi^2 = 0.35$ ; p = 0.550 <sup>2</sup>
Female, n (%)	28 (73.7%)	16 (66.7%)	
Years of formal education	15.1 ± 3.2 (11, 24)	15.5 ± 3.0 (11, 20)	U = 415; p = 0.555 <sup>1</sup>
Comorbidities, n (%)			
Hypertension	3 (7.9%)	0 (0.0%)	$\chi^2 = 0.199$ ; p = 0.160 <sup>2</sup>
Diabetes mellitus	2 (5.3%)	1 (4.2%)	$\chi^2 = 0.04$ ; p = 0.840 <sup>2</sup>
Obesity	1 (2.6%)	1 (4.2%)	$\chi^2 = 0.11$ ; p = 0.740 <sup>2</sup>
Asthma/COPD	2 (5.3%)	2 (8.3%)	$\chi^2 = 0.23$ ; p = 0.630 <sup>2</sup>
Allergic rhinosinusitis	11 (28.9%)	8 (33.3%)	$\chi^2 = 0.13$ ; p = 0.720 <sup>2</sup>
Thyroid disorder	2 (5.3%)	1 (4.2%)	$\chi^2 = 0.04$ ; p = 0.840 <sup>2</sup>
Mood disorder	4 (10.5%)	2 (8.3%)	$\chi^2 = 0.08$ ; p = 0.780 <sup>2</sup>
Migraine	12 (31.6%)	7 (29.2%)	$\chi^2 = 0.04$ ; p = 0.840 <sup>2</sup>
Sniffin' Sticks identification test (SS-16)	11.4 ± 2.1 (6, 15)	13.6 ± 1.1 (12, 16)	U = 177; p < 0.001 <sup>1</sup>
Montreal Cognitive Assessment (MoCA)	24.9 ± 3.2 (17, 30)	25.2 ± 3.4 (17, 30)	U = 426; p = 0.663 <sup>1</sup>

**Table 1.** Demographic and clinical features (COV + and COV – groups). COPD chronic obstructive pulmonary disease. Data are shown as mean ± standard deviation (minimum, maximum) or n (%). <sup>1</sup>Mann–Whitney U test. <sup>2</sup>Chi-square test.

agreement for manual segmentation of the olfactory bulbs, Pearson's correlation coefficients were  $r = 0.877$  for the right olfactory bulb and  $r = 0.900$  for the left olfactory bulb (two-tailed,  $p < 0.001$ ). The mean and standard deviation of the Dice similarity coefficient (DSC) for right and left olfactory bulbs were  $0.815 \pm 0.0354$  and  $0.794 \pm 0.0483$ , respectively, indicating a good agreement between examiners.

The volume of the right ( $t = -4.19$ ,  $p < 0.001$ ), left ( $t = -4.42$ ,  $p < 0.001$ ), and both ( $t = -4.42$ ,  $p < 0.001$ ) olfactory bulbs was significantly reduced in the COV + group when compared to the COV – group (Table 2). This reduction in the normalized total olfactory bulb volume remained even after controlling for the sex, age, and allergic rhinosinusitis ( $F = 17.19$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 1A). In the COV + group, there was no difference in normalized total olfactory bulb volume between participants with  $SS-16 < 12$  and  $SS-16 \geq 12$  ( $p = 1.000$ , Bonferroni correction). The normalized total olfactory bulb volume was smaller in these COV + subgroups compared to the COV – group (Fig. 1B).

A positive correlation was found between total olfactory bulb volume and SS-16 test performance in the study sample ( $n = 53$ ) ( $\rho = 0.281$ ,  $p = 0.014$ ). In the control group, there was a positive association between the volume of the olfactory bulbs and the SS-16 test score ( $\rho = 0.706$ ,  $p = 0.003$ ) (Fig. 1C). In the COV + group, there was no association between the volume of the olfactory bulbs and the total score of the SS-16 test score ( $\rho = 0.009$ ,  $p = 0.964$ ) (Fig. 1D).

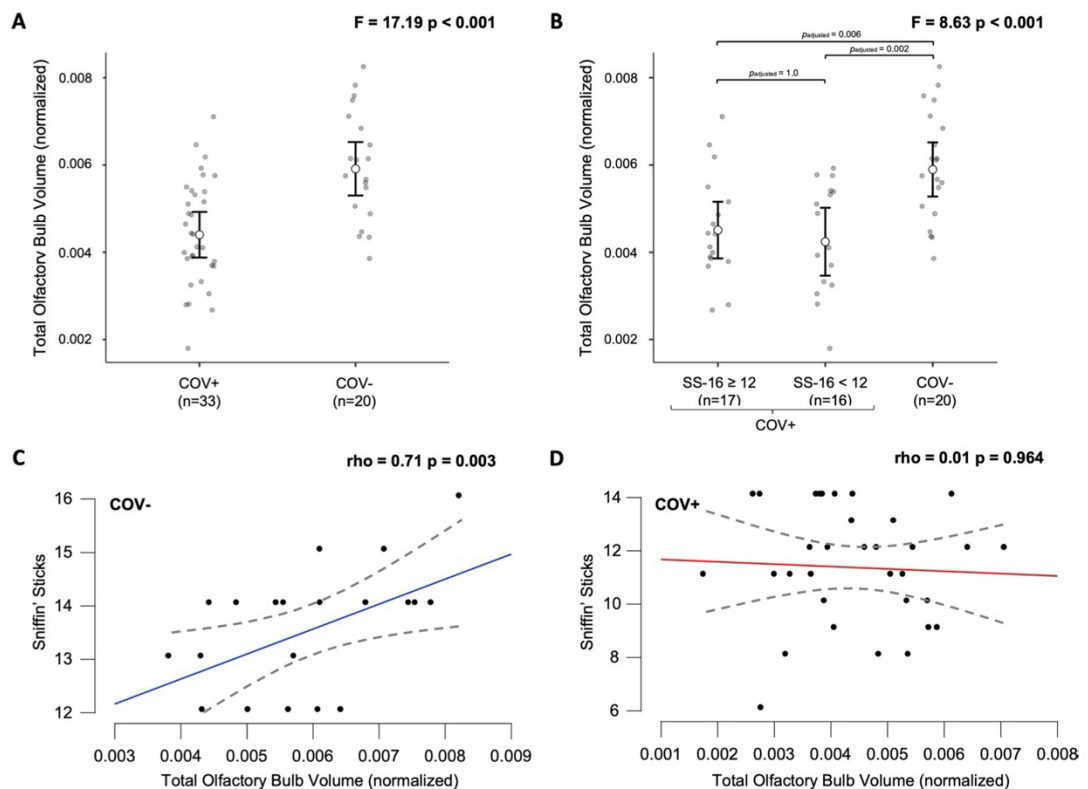
**Voxel-based diffusion imaging analysis.** No between-group differences were observed for fractional anisotropy (FA), mean diffusivity (MD), radial diffusivity (RD), and axial diffusivity (AD) using Tract-based Spatial Statistics (TBSS), controlling for age and sex ( $p > 0.05$ ).

**Network-based statistics (NBS).** Using a whole-brain exploratory analysis, NBS identified significant differences in structural connectivity between the COV + and COV – groups. Compared to the control group, COVID-19 patients exhibited significantly higher structural connectivity in a subnetwork composed of three brain regions (one on the right side and two on the left side) and two interhemispheric connections (threshold value  $t = 3.0$ ,  $p < 0.05$ ) (Fig. 2, Supplementary Table S1).

Measure	COVID-19 (COV +)	Control (COV-)	Statistic <sup>1</sup>	Adj p <sup>2</sup>
	(n = 33, 62%)	(n = 20, 38%)		
Right olfactory bulb volume (mm <sup>3</sup> )	32.2 (9.5)	43.2 (8.8)	$t = -4.19$ ; $p < 0.001$	$p < 0.001$
Left olfactory bulb volume (mm <sup>3</sup> )	31.0 (9.4)	43.1 (10.2)	$t = -4.19$ ; $p < 0.001$	$p < 0.001$
Total olfactory bulb volume (mm <sup>3</sup> )	63.2 (18.4)	86.3 (18.4)	$t = -4.42$ ; $p < 0.001$	$p < 0.001$

**Table 2.** Comparison of the olfactory bulb volume between COV + and COV – groups. All data are shown as mean (standard deviation). <sup>1</sup>Independent sample t-test. <sup>2</sup>Adjusted p value for FDR.





**Figure 1.** (A) Comparison of the normalized total olfactory bulb volume between the COV– and COV + groups using ANCOVA. (B) Comparison of the normalized total olfactory bulb volume among the COV–, COV + with SS-16  $\geq$  12 and COV + with SS-16 < 12 subgroups using ANCOVA. (C) Association between normalized total olfactory bulb volume and SS-16 test score in the COV– group. (D) Association between normalized total olfactory bulb volume and SS-16 test score in the COV + group. SS-16 Sniffin' Sticks smell identification test, ANCOVA analysis of covariance. \*ANCOVA with covariates including sex, age, and allergic rhinosinusitis.

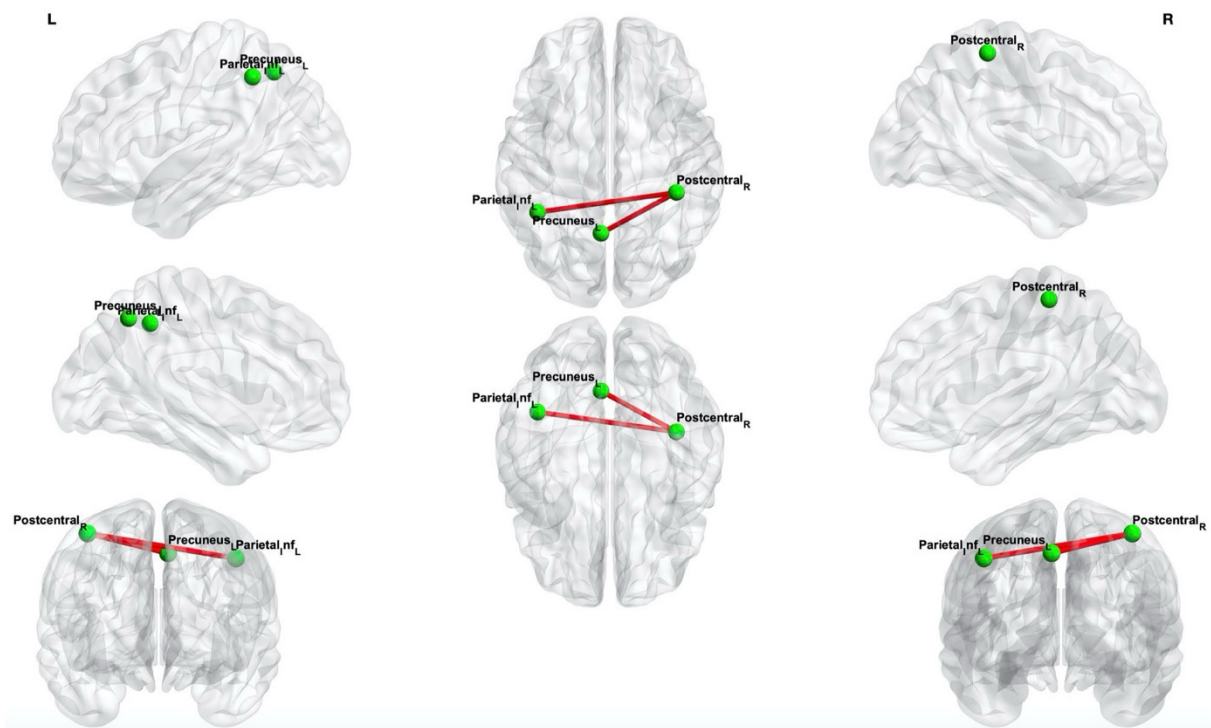
**Graph theory analysis: global network.** COV + group showed lower global efficiency ( $p = 0.019$ ) and local efficiency ( $p = 0.047$ ) and higher assortativity ( $p = 0.027$ ) than COV– group. No significant differences were found in other global network metrics ( $p > 0.05$ ) (Table 3). Both groups had  $\sigma > 1$ , which means they satisfied the criteria of a small-world (Table 3). In the COV + group, there was an association between the clustering and the SS-16 test score ( $\rho = -0.457$ ,  $p = 0.019$ ), controlling for sex, age, education, comorbidities, and time between COVID-19 diagnosis and study clinical/imaging procedures. No association was identified between global network measures and the SS-16 test score in the COV– group.

**Graph theory analysis: local network.** Compared with controls, patients exhibited reduced local efficiency (left lateral orbital gyrus and pallidum), increased clustering (left lateral orbital gyrus), increased nodal strength (right anterior orbital gyrus), and reduced nodal strength (left amygdala) after adjusting for multiple comparisons (Table 4, Supplementary Fig. S1).

## Discussion

Our study findings reveal that patients with persistent subjective hyposmia following COVID-19 infection exhibited a 25% reduction in olfactory bulb volume at a mean follow-up of three months. In comparison to controls, SARS-CoV-2 infected hyposmic subjects demonstrated significant aberrations in the WM network, but no changes TBSS. The NBS analysis identified a subnetwork in the parietal sensory areas with increased connectivity. The global and local network topological properties demonstrated reduced integration and increased segregation, including olfactory-related brain areas (pallidum, amygdala, and orbitofrontal gyrus). Moreover, the SS-16 test score was negatively correlated with clustering in the COVID-19 group. Therefore, we hypothesize that changes in connectivity in the parietal sensory regions and olfaction-related brain areas may be due to compensatory plasticity mechanisms aimed at restoring olfactory function.

Unlike other upper respiratory infections, COVID-19 olfactory dysfunction is not associated with nasal discharge and conductive obstruction of the olfactory cleft, suggesting a neurological origin<sup>23</sup>. SARS-CoV-2 does not infect the sensory neurons, and sustentacular cells are the primary target of this virus in the olfactory mucosa<sup>10,24–27</sup>. Several studies have also reported changes in olfactory bulb volume, olfactory cleft volume,



**Figure 2.** Whole-brain network-based statistics results. The connectivity analysis with threshold value  $t = 3.0$  showed a subnetwork with greater connectivity in the COV+ group compared to the COV- group (red edges). Significance was thresholded at  $p < 0.05$ . Permutations = 5000. *Inf* inferior, *R* right, *L* left.

Measure	COVID-19 (COV+)	Control (COV-)	Statistic	Cohen's d
	(n = 32, 59%)	(n = 22, 41%)		
Betweenness centrality	0.00760 (0.00027)	0.00765 (0.00023)	$t = -0.695$ ; $p = 0.490^1$	–
Modularity	0.588 (0.577, 0.591)	0.585 (0.580, 0.590)	$U = 327$ ; $p = 0.669^2$	–
Assortativity	0.01751 (0.0181)	0.00696 (0.0147)	$t = 2.271$ ; $p = 0.027^{1*}$	0.629
Participation	0.248 (0.0111)	0.247 (0.0115)	$t = 0.532$ ; $p = 0.597^1$	–
Clustering	1.18 (1.14, 1.25)	1.14 (1.09, 1.19)	$U = 263$ ; $p = 0.120^1$	–
Nodal strength	91.1 (86.5, 92.0)	89.7 (88.4, 91.3)	$U = 329$ ; $p = 0.694^2$	–
Local efficiency	49.8 (2.36)	51.2 (2.86)	$t = -2.031$ ; $p = 0.047^{1*}$	-0.562
Global efficiency	39.1 (1.96)	40.6 (2.55)	$t = -2.413$ ; $p = 0.019^{1*}$	-0.668
Density	0.147 (0.006)	0.150 (0.007)	$t = -1.808$ ; $p = 0.076^1$	–
Path length	97.4 (3.77)	98.7 (5.23)	$t = -1.046$ ; $p = 0.300^1$	–
Edge count	2.40 (0.0422)	2.40 (0.0421)	$t = -0.268$ ; $p = 0.790^1$	–
Omega	-0.0266 (0.0244)	-0.0205 (0.0202)	$t = -0.966$ ; $p = 0.339^1$	–
Sigma	1.47 (0.0491)	1.45 (0.0703)	$t = 1.281$ ; $p = 0.206^1$	–

**Table 3.** Comparison of global network metrics between the COV+ and COV-. Modularity, clustering, and nodal strength are shown as median (interquartile range). The other variables are shown as mean (standard deviation). <sup>1</sup>Independent sample t-test. <sup>2</sup>Mann-Whitney U test. \* $p < 0.05$ .

olfactory sulcus depth, and olfactory nerve morphology<sup>28</sup>. In our study, the COVID-19 olfactory bulb volume was significantly smaller than that of the control group, even after accounting for head size.

In the control group, olfactory bulb volume showed a significant positive correlation with olfactory function, even after controlling for confounding variables, which is consistent with prior research<sup>29</sup>. However, this correlation was not observed in patients with COVID-19. There are several hypotheses that could explain this absence of correlation. Firstly, many individuals who experienced anosmia or hyposmia during the acute phase of COVID-19 eventually recovered their olfactory function<sup>5</sup>. This restoration could be due to the rapid regeneration of the supporting cells in the olfactory nerve from stem cells<sup>30</sup>. In addition, there is evidence that SARS-CoV-2

Tract	N	Right Hemisphere			Left Hemisphere		
		statistic	p-value	adj p	statistic	p-value	adj p
Betweenness centrality							
Lateral orbital gyrus	54	0.482	0.632	ns	- 2.314	0.025	ns
Insula	54	- 0.826	0.412	ns	- 2.100	0.041	ns
Anterior cingulate cortex (supra)	54	0.916	0.364	ns	- 2.044	0.046	ns
Clustering							
Lateral orbital gyrus	54	- 0.102	0.919	ns	3.344	0.002	<b>0.006</b>
Insula	54	2.213	0.031	ns	- 0.518	0.607	ns
Edge count							
Anterior cingulate cortex (pre)	54	2.061	0.044	ns	- 2.576	0.013	<b>0.049</b>
Local efficiency							
Lateral orbital gyrus	54	- 0.664	0.510	ns	- 2.824	0.007	<b>0.025</b>
Hippocampus	54	- 1.024	0.311	ns	- 2.139	0.037	ns
Putamen	54	- 1.287	0.204	ns	- 2.063	0.044	ns
Pallidum	54	- 1.398	0.168	ns	- 2.532	0.014	<b>0.049</b>
Anterior cingulate cortex (supra)	54	- 1.861	0.069	ns	- 2.187	0.033	ns
Nodal strength							
Anterior orbital gyrus	54	2.477	0.017	<b>0.037</b>	1.781	0.081	ns
Lateral orbital gyrus	54	- 0.784	0.436	ns	2.070	0.044	ns
Amygdala	54	0.555	0.581	ns	- 2.703	0.009	<b>0.028</b>
Anterior cingulate cortex (sub)	54	0.713	0.479	ns	2.096	0.041	ns
Nucleus accumbens	54	- 1.639	0.107	ns	- 2.106	0.040	ns
Path length							
Anterior cingulate cortex (pre)	54	- 0.182	0.856	ns	- 2.241	0.029	ns
Participation							
Insula	54	0.536	0.594	ns	- 2.507	0.015	ns

**Table 4.** Comparison of local network metrics between the control and COVID-19 groups, adjusting for multiple comparisons (FDR). Age and sex were included as covariates. *Supra* supracallosal, *sub* subgenual, *pre* pregenual, *ns* not significant, *adj* adjusted. Significant p values < 0.05 are indicated in bold font.

can affect WM and gray matter (GM), even in subjects with mild symptoms without hospitalization, which can impact higher processing in brain regions related to the olfactory system<sup>31–33</sup>.

Reduced global and local efficiency was observed in COV + group, including the olfactory-related regions, compared to the COV – group indicating potential disruption in brain network connectivity. Consistent with these findings, a longitudinal imaging study using UK Biobank data revealed a significant detrimental effect of SARS-CoV-2, mainly on the limbic and olfactory cortical system, as well as changes in diffusion measures in regions functionally connected to the piriform cortex, olfactory tubercle, and anterior olfactory nucleus. Moreover, in that study, participants infected with SARS-CoV-2 showed a more pronounced reduction of grey matter thickness in the left parahippocampal gyrus and lateral orbitofrontal cortex<sup>31</sup>. In other studies, WM microstructural alterations were also observed in the brain during the subacute, post-acute, and chronic phases of COVID-19<sup>32–34</sup>, with the potential to disrupt brain network connectivity.

Cerebral plasticity after a sensory loss has been well documented in respect of visual and auditory loss, but less is known about the effects of olfactory input loss on the adult brain. Previous research has demonstrated that acquired anosmia alters GM volume or density in olfactory-related areas, such as the piriform cortex and the orbitofrontal cortex, as well as in non-olfactory-related areas, such as the prefrontal cortex. The higher assortativity in the COV + group suggests that the network nodes are more interconnected with nodes that have comparable properties, which may reflect a compensatory mechanism in response to the disruption of brain network connectivity caused by COVID-19. Our study also showed increased structural connectivity in the posterior parietal cortex, involving multisensory areas such as the postcentral gyrus, inferior parietal gyri, and precuneus, in whole-brain analysis. In a functional study, elevated brain connectivity between the orbitofrontal cortex and the visual association cortex and fusiform gyrus in the COVID-19 anosmia group was identified<sup>14</sup>. One could hypothesize that the absence of olfactory input to these parietal multisensory areas alters the neuronal constellation and promotes a more efficient multisensory-based integration of visual and auditory perception in anosmic individuals<sup>35</sup>.

A recent study on patients with olfactory dysfunction following COVID-19 revealed an increased functional intranetwork connectivity within the default mode network, as well as greater internetwork connectivity between the olfactory and default mode networks. This suggests that the compensatory mechanism of greater intranetwork functional connectivity may help to address the deficits in olfactory processing and overall well-being in COVID-19 patients<sup>36</sup>. In another study, structural and functional connectivity metrics were significantly increased in individuals previously infected with SARS-CoV-2. Greater residual olfactory impairment was associated with



more segregated processing in regions functionally connected to the anterior piriform cortex<sup>37</sup>. Similarly, we evidenced an increase in segregation in the orbitofrontal cortex and identified a negative correlation between clustering of whole-brain WM and the olfactory test in the COVID-19 group, which was not observed in the control group.

The present study has some limitations that should be acknowledged. Firstly, this was a cross-sectional study with a non-probabilistic sample, which may limit the generalizability of the findings. Additionally, patients were evaluated only once during the post-acute phase, and there was no serial evaluation at different time points, precluding inferences about the temporal dynamics of abnormalities in the olfactory bulbs and WM. Furthermore, the diffusion parameters selected (e.g., low *b*-values) may have limited the quantitative diffusion analysis, although they better reflect the clinical protocol context.

In summary, our study highlights the presence of reduced olfactory bulb volume and WM structural network disruption in patients with persistent hyposmia after COVID-19. Our findings suggest that compensatory mechanisms in the parietal sensory and olfactory-related areas may help alleviate the deficiency in olfactory processing in COVID-19 patients. While larger brain connectivity studies are needed to confirm these observations, longitudinal analyses are particularly important to assess the long-term neurological consequences of COVID-19. Further research is also required to explore the potential impact of olfactory dysfunction on quality of life and daily functioning.

## Methods

**Participants.** This cross-sectional prospective analytical study was conducted as part of the Neuro-COVID-19 Brazilian Registry (NeuroCovBr, <https://www.neurocovbr.com/>)<sup>38</sup>, between October 2020 and May 2021 in Brasilia, Brazil. Participants were recruited with a non-probabilistic sampling strategy from a population of health professionals and patients assisted at the Brasilia University Hospital before the implementation of mass vaccination campaigns. We consecutively contacted a list of 364 patients diagnosed with COVID-19 by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) to invite them to the study.

The inclusion criteria for the COVID-19 group (COV+) were: (a) diagnosis of SARS-CoV-2 infection confirmed by detection of viral RNA by qRT-PCR testing of a nasopharyngeal swab, without requiring hospitalization during infection, (b) COVID-19-related persistent subjective hyposmia, and (c) age between 18 and 60 years old. Patients were evaluated at least four weeks after the diagnosis of COVID-19 to ensure that the acute phase had already passed. The control group (COV-) was recruited from the same population (patients or health professionals from Brasilia University Hospital) using convenience sampling, with age, sex, and education level matched to the COV+ group. Subjects in the COV- group had not been previously infected with SARS-CoV-2, had a negative SARS-CoV IgG/IgM test, and had no olfactory dysfunction.

The exclusion criteria for both groups included (a) pre-existing brain structural disorders (e.g., stroke, epilepsy, multiple sclerosis, neoplasia, hydrocephalus, traumatic brain injury, Parkinson's disease, and dementia), (b) severe psychiatric diseases, (c) MoCA global score of less than 15<sup>39</sup>, (d) MRI contraindications, and (e) illiteracy.

This study was approved by the local ethics committee at the University of Brasilia and adhered to current regulations, such as the Helsinki Declaration. All participants provided written informed consent and underwent clinical, cognitive, and MRI examinations during the same visit.

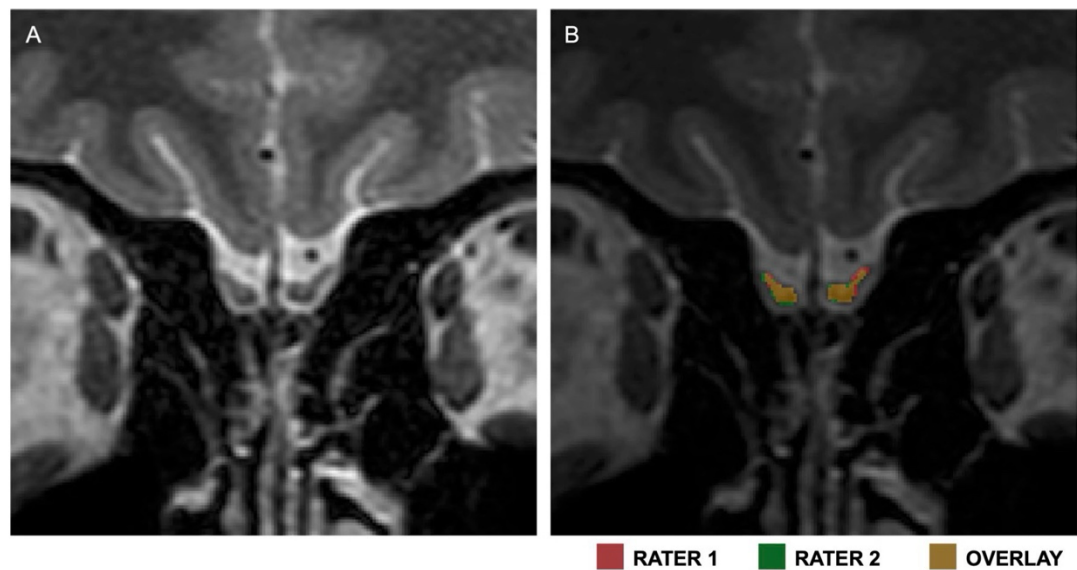
**Clinical assessment.** Demographic and clinical data were collected using electronic forms, including evaluation of neurological, chemosensory, respiratory, and constitutional symptoms. In addition, demographic variables such as age, education, sex, and a list of self-reported comorbidities were obtained.

The Sniffin' Sticks smell identification test (SS-16) was used to evaluate participants' ability to identify odors. This psychophysical test was developed by Burghardt\* (Wedel, Germany) and previously adapted to Brazilian Portuguese<sup>26,27</sup>. The test comprises 16 pens containing common and recognizable odors. The length of each pen is 14 cm (approximately 5.51 in), with an internal diameter of 1.3 cm (about 0.51 in) and a 4 mL cap containing odorless or odorous liquids dissolved in propylene glycol. The participant had to identify the odor using a four-option forced-choice paradigm.

All participants also responded to a cognitive test, MoCA, to screen for cognitive impairment<sup>39,40</sup>. It is a brief 30-point test that assesses attention, executive functions, memory, language, visuoconstructional skills, conceptual thinking, and calculations.

**MRI data acquisition.** The MRI was performed using a Philips Achieva 3 T scanner (Best, Netherlands) equipped with an 8-channel SENSE coil. The following MRI sequences were obtained: (1) Three dimensional (3D) T1-weighted sequence, turbo field echo (TFE), sagittal, with field of view (FOV) = 208 × 240 × 256 mm, reconstructed resolution of 1 × 1 × 1 mm, echo time (TE) = min full echo, repetition time (TR) = 2300 ms, TI = 900 ms, two times accelerated acquisition; (2) Diffusion-weighted sequence, axial, with FOV 232 × 232 × 160 mm, reconstructed resolution of 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms; TR = 3300 ms, 32 directions (*b* = 800 s/mm<sup>2</sup>); (3) Diffusion-weighted sequence, axial, with FOV 232 × 232 × 160 mm, reconstructed resolution of 2 × 2 × 2 mm, TE = 71 ms; TR = 3300 ms (reversed phase encoded b0); (4) 3D-fluid attenuated inversion recovery (FLAIR) sequence, sagittal, with FOV 256 × 256 × 160 mm, reconstructed resolution of 1.2 × 1 × 1 mm, TE = 119 ms, TR = 4800 ms, TI = 1650 ms. (5) T2-weighted sequence, coronal, with FOV 264 × 204 mm, reconstructed resolution of 0.25 × 0.25 × 1.5 mm, TR = 2500 ms, TE = 80 ms; flip angle = 90, with coverage of the anterior cranial fossa.

**Manual segmentation of the olfactory bulbs.** Two independent evaluators blinded to clinical and olfactory data manually segmented the volumes of the olfactory bulbs using ITK-SNAP (version 3.8) (Fig. 3)<sup>41</sup>. The limits of the olfactory bulb in the coronal plane were determined by the surrounding cerebrospinal fluid,



**Figure 3.** Manual segmentation of the olfactory bulbs. A. Coronal T2-weighted image of a participant. B. Coronal T2-weighted image with segmentations made by the two evaluators. Red: Rater 1; Green: Rater 2; Yellow: Overlay.

while an abrupt diameter change defined the posterior boundary of the olfactory bulb at the transition with the olfactory tract<sup>42</sup>. The volumetric measures of the right and left olfactory bulbs were taken independently and then summed. The mean values established by the two evaluators were used in all subsequent analyses. Interobserver agreement was evaluated using Pearson's correlation coefficient and the DSC (Fig. 3).

The estimated total intracranial volume (eTIV) was computed using FreeSurfer (version 7.1.1, <http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>) which normalized the volumes of the olfactory bulbs to eliminate biases caused by unequal head sizes.

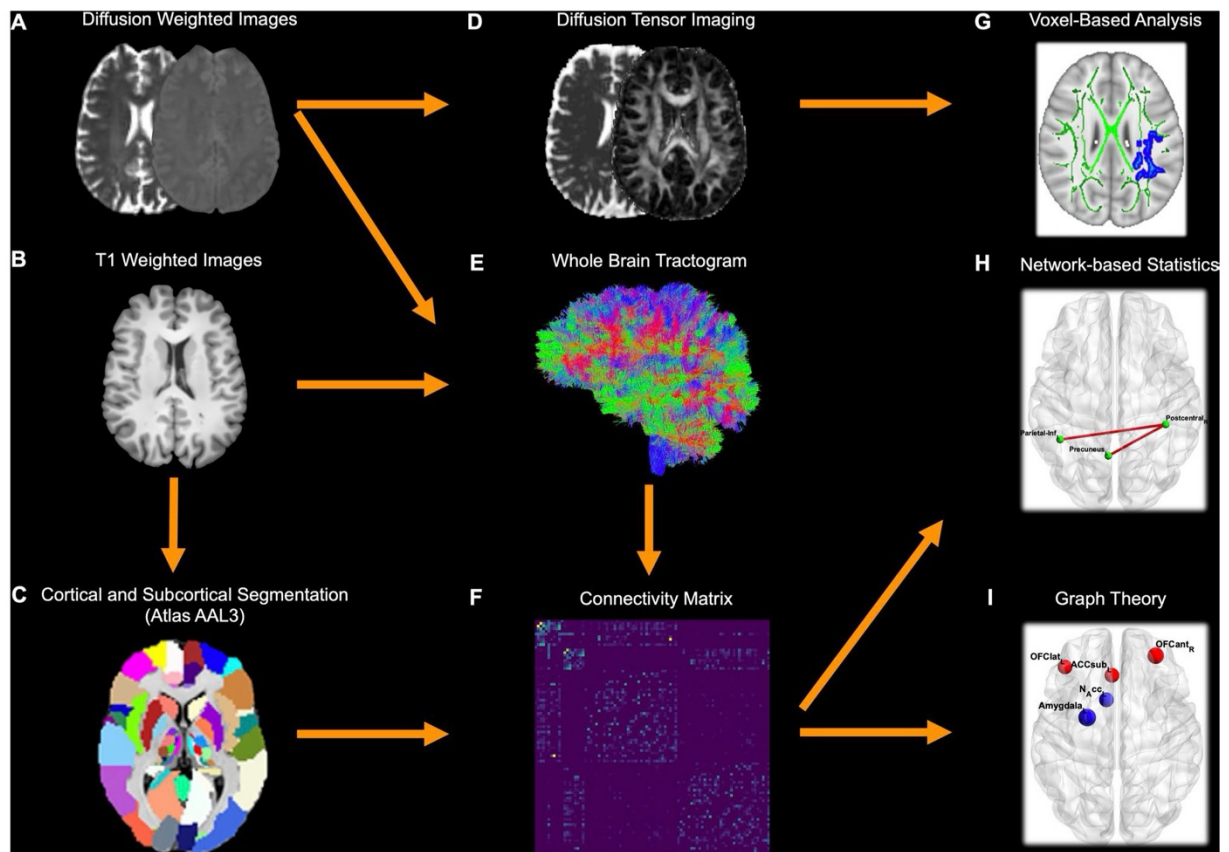
**Diffusion magnetic resonance imaging processing.** TractoFlow was used to analyze dMRI and T1-weighted images (Fig. 4)<sup>43</sup>. As an automated tool for processing dMRI, it extracts diffusion tensor imaging (DTI) measures. FA, MD, RD, and AD were calculated. Probabilistic whole-brain anatomically constrained particle filtering tractography was performed on a fiber orientation distribution function (fODF) of maximum spherical harmonics order of 6<sup>44</sup>. The output of TractoFlow was then further processed via advanced steps to generate structural connectomes using SCILPY library version 1.0.0<sup>45</sup>. Then, COMMIT2 with ball & sticks forward model was used to filter the raw tractogram and compute the COMMIT2 weights of each streamline<sup>16,17</sup>.

**Voxel-based diffusion imaging analysis.** The TBSS pipeline in FSL (version 6.0)<sup>30</sup> was used to compare MRI metric differences between the COV+ and COV− groups (Fig. 4). The FA maps were nonlinearly aligned to the FMRIB-58 map in the template space of the Montreal Neuroimaging Institute (MNI). The FA skeleton mean was computed following the deformable registration. The FA maps deformation fields were utilized for FA, MD, RD, and AD. The registered maps were projected onto the FA skeleton.

**Network construction.** The brain network is composed of nodes and edges. To determine the nodes within the network, we selected 171 grey matter regions of the brain from the AAL3 atlas<sup>46</sup>. Each AAL3 region in standard MNI space was back-transformed to the participant's native diffusion space. The COMMIT2-weighted tractogram and AAL3 parcellations were used to derive COMMIT2-weighted structural connectivity matrices (Fig. 4). The COMMIT2 weight of a streamline is a measure that quantifies the contribution to the diffusion MRI signal of each streamline and is proportional to the cross-sectional area of the biological fibers along their path. By its turn, the COMMIT2 weight of a connection corresponds to the sum of the individual weights assigned by COMMIT2 to each streamline connecting two parcels of the matrix and was used as a marker of connectivity strength. Through its ability to take into account the tracking bias related to variations in bundle width, the COMMIT2 weight constitutes a more biological proxy than the frequently used streamline count<sup>15</sup>. The possibility to inject priors about brain anatomy and its organization, and not only about microstructural properties, represents a powerful and novel way to tackle the false-positive problem in tractography and brain structural connectivity<sup>16,17</sup>. COMMIT2-weighted  $171 \times 171$  whole-brain matrices were computed.

Three-dimensional projections of structural connections and nodes were visualized using BrainNet Viewer (version 1.42)<sup>47</sup>, for comparison of COMMIT2 weight matrices and graph theory analyses.





**Figure 4.** Processing flowchart. ((A) and (B)). The TractoFlow pipeline processes diffusion-weighted and T1-weighted images (C) T1-weighted images are labeled in 171 brain regions of the AAL3 atlas. (D) Diffusion MRI-derived measures are computed. (E) Whole brain probabilistic tractography is performed using an anatomically constrained particle filter algorithm. (F) Extraction of the COMMIT2-weighted connectivity matrix. (G) Voxel-based analysis investigated FA, MD, RD, and AD metrics. (H) Network-based statistics analysis. (I) Graph theory analysis: global and local network. *AAL* automated anatomical labeling, *COMMIT* convex optimization modeling for microstructure informed tractography, *FA* fractional anisotropy, *MD* mean diffusivity, *RD* radial diffusivity, *AD* axial diffusivity.

**Network-based statistics.** NBS was performed following Zalesky's methods with NBS Connectome (version 1.2) to determine the different connections<sup>48,49</sup>. NBS is a statistical method based on graph theory and is often used to explore differences in the structural connectivity in the brain WM network. Typically, NBS analysis is conducted to identify subnetworks consisting of pairs of nodes and connections whose structural connectivity strength varies significantly between groups.

**Network measures.** The Brain Connectivity Toolbox (BCT) computed network measures for each subject<sup>50</sup>. For global networks, betweenness centrality (corresponding to the fraction of all shortest paths in the network), modularity (reflecting the segregation of the network), assortativity (reflecting whether nodes tend to be connected to other nodes with similar strengths), participation (measure of diversity of intermodular connections), clustering coefficient (fraction of connected triangles around a node), mean strength (corresponding to the average of all the nodal strengths, where the nodal strength is the sum of the weights of links connected to the node), global efficiency (corresponding to the average inverse shortest path length in the network and inversely related to the characteristic path length), density (corresponding to the fraction of present connections to possible connections), characteristic path length (average of the shortest path length across all nodes), edge count, and small-worldness (ratio of average clustering coefficient to characteristic path length) were analyzed.

We analyzed regional network measures, calculated for each node, including betweenness centrality (number of shortest paths that pass through a node), clustering (fraction of connected triangles around a node), edge count, local efficiency (average of the inverse shortest path length in the neighborhood a node), nodal strength (sum of weights of links connected to the node), path length (shortest path length across the (average of the shortest path length across all nodes), and participation (a measure of the diversity of intermodular connections of a node).

Local network measures were calculated for the olfactory-related brain regions (olfactory cortex, gyrus rectus, medial orbital gyrus, anterior orbital gyrus, posterior orbital gyrus, lateral orbital gyrus, insula, hippocampus, parahippocampal gyrus, amygdala, caudate nucleus, putamen, pallidum, thalamus [mediodorsal medial nucleus and mediodorsal lateral nucleus], anterior cingulate cortex [subgenual, pregenual and supracallosal], and nucleus accumbens)<sup>51,52</sup>.

**MRI quality control.** The MRI images were inspected for significant gross geometric distortion, mass movement, and signal drop artifacts to ensure their quality. For T1-weighted and dMRI images, a Nextflow pipeline for dMRI quality control (Dmriqc-flow) was also utilized<sup>53</sup>.

**Statistical analysis.** *Demographic and clinical assessments.* The demographic and clinical characteristics of the groups were compared using independent-sample t-tests for normally distributed continuous variables, Mann–Whitney tests for nonnormally distributed continuous variables, and  $\chi^2$  for categorical variables. Fulfillment of the normality assumption was inspected through visual examination of variable distributions and the Shapiro–Wilk test. The significance level was set at  $p < 0.05$ . All statistical analyses were performed in R, version 4.1.0 (*R Foundation for Statistical Computing*, Vienna, Austria).

*Segmentation of the olfactory bulbs.* The olfactory bulb volumes were compared using a t-test for independent samples. To account for multiple comparisons, the results were adjusted using the False Discovery Rate (FDR) method<sup>54</sup>. The eTIV corrected the volumes obtained with the formula: (volume of the olfactory bulb/eTIV)  $\times$  100.

An analysis of covariance (ANCOVA) was performed to compare the normalized total olfactory bulb volume between groups, while controlling for variables such as sex, age, and allergic rhinosinusitis. As necessary, significant p-values were adjusted using post hoc Bonferroni tests ( $p < 0.05$ ).

The level of interobserver agreement for the segmentation of the olfactory bulbs was assessed by the Pearson's correlation coefficient and the DSC. The DSC is an overlap similarity index that reflects agreement in size and location. It ranges from 0 (no overlap) to 1 (complete overlap) (Fig. 3). A satisfactory overlap exists when  $DSC > 0.70$ <sup>55</sup>.

*Voxel-based diffusion imaging analysis.* To test for group differences, a general linear model (GLM) with contrast was performed on VBA data. The TBSS framework<sup>30</sup> includes nonparametric permutation testing (5000 permutations) to correct multiple comparisons and *threshold-free cluster enhancement* (TFCE). Age and sex were used as nuisance covariates. Results were considered significant at  $p < 0.05$ , TFCE corrected for multiple comparisons. WM regions were named according to the Johns Hopkins University white-matter tractography atlas.

*Network-based statistics.* Between-group differences (COV- > COV+ and COV- < COV+ contrasts) were tested on structural connectivity matrices for a range of primary thresholds (from  $t = 2.5$  to  $t = 3.5$ ), with age and sex as nuisance variables. Five thousand permutations were used, with intensity as the measure of network size and a statistical significance threshold set at  $p < 0.05$ .

*Network metrics.* Between-group differences were tested with either Mann–Whitney (modularity, clustering, and nodal strength) or independent-sample t-tests (other global network metrics). A GLM was used to analyze the local network metrics differences in olfactory-related brain areas between the control and COVID-19 groups, using age and sex as covariates. All results were corrected using the FDR method<sup>54</sup>.

We performed a partial correlation analysis between global network measures, SS-16 test score, and normalized total olfactory bulb volume, adjusting for age, sex, education, comorbidities (allergic rhinosinusitis and migraine), and time between COVID-19 diagnosis and study clinical/imaging procedures. Data were analyzed using Spearman's coefficient. Statistical significance was defined as a two-tailed  $p < 0.05$ .

## Data availability

The anonymized dataset that supports these study findings is available upon reasonable request from the corresponding author from a qualified investigator if the intent is to increase reproducibility. The data were not publicly available because of privacy or ethical restrictions.

Received: 30 March 2023; Accepted: 4 August 2023

Published online: 09 August 2023

## References

1. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE). Johns Hopkins University (JHU).
2. Al-Aly, Z., Xie, Y. & Bowe, B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature* **594**(7862), 259–264. <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03553-9> (2021).
3. Nalbandian, A. *et al.* Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat. Med.* **27**(4), 601–615. <https://doi.org/10.1038/s41591-021-01283-z> (2021).
4. Agyeman, A. A., Chin, K. L., Landersdorfer, C. B., Liew, D. & Ofori-Asenso, R. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Mayo Clin. Proc.* **95**(8), 1621–1631. <https://doi.org/10.1016/j.mayocp.2020.05.030> (2020).
5. Lechien, J. R. *et al.* Prevalence and 6-month recovery of olfactory dysfunction: A multicentre study of 1363 COVID-19 patients. *J. Intern. Med.* **290**(2), 451–461. <https://doi.org/10.1111/joim.13209> (2021).



6. Sayin, İ, Yaşar, K. K. & Yazici, Z. M. Taste and smell impairment in COVID-19: An AAO-HNS anosmia reporting tool-based comparative study. *Otolaryngol. Neck Surg.* **163**(3), 473–479. <https://doi.org/10.1177/0194599820931820> (2020).
7. Xydakis, M. S. et al. Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **20**(9), 1015–1016. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30293-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30293-0) (2020).
8. Meinhardt, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. *Nat. Neurosci.* **24**(2), 168–175. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5> (2021).
9. de Melo, G. D. et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. *Sci. Transl. Med.* <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abb8396> (2021).
10. Khan, M. et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. *Cell* **184**(24), 5932–5949.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2021.10.027> (2021).
11. Brann, D. H. et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. *Sci. Adv.* <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc5801> (2020).
12. Ho, C.-Y. et al. Postmortem assessment of olfactory tissue degeneration and microvasculopathy in patients with COVID-19. *JAMA Neurol.* <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2022.0154> (2022).
13. Altunısık, E., Baykan, A. H., Sahin, S., Aydin, E. & Erturk, S. M. Quantitative analysis of the olfactory system in COVID-19: An MR imaging study. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* **42**(12), 2207–2214. <https://doi.org/10.3174/ajnr.A7278> (2021).
14. Wingrove, J. et al. Aberrant olfactory network functional connectivity in people with olfactory dysfunction following COVID-19 infection: An exploratory, observational study. *EClinicalMedicine* **58**, 101883. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2023.101883> (2023).
15. Yeh, C.-H., Jones, D. K., Liang, X., Descoteaux, M. & Connelly, A. Mapping structural connectivity using diffusion MRI: Challenges and opportunities. *J Magn. Reson. Imaging* **53**(6), 1666–1682. <https://doi.org/10.1002/jmri.27188> (2021).
16. Daducci, A., Dal Palù, A., Lemkaddem, A. & Thiran, J.-P. COMMIT: Convex optimization modeling for microstructure informed tractography. *IEEE Trans. Med. Imaging* **34**(1), 246–257. <https://doi.org/10.1109/TMI.2014.2352414> (2015).
17. Schiavi, S. et al. A new method for accurate in vivo mapping of human brain connections using microstructural and anatomical information. *Sci. Adv.* **6**(31), eaba8245. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aba8245> (2020).
18. Zhang, F. et al. Quantitative mapping of the brain's structural connectivity using diffusion MRI tractography: A review. *Neuroimage* **249**, 118870. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2021.118870> (2022).
19. Dan, X. et al. Olfactory dysfunction in aging and neurodegenerative diseases. *Ageing Res Rev.* **70**, 101416. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2021.101416> (2021).
20. Chen, B. et al. Aberrancies of brain network structures in patients with anosmia. *Brain Topogr.* **33**(3), 403–411. <https://doi.org/10.1007/s10548-020-00769-2> (2020).
21. Sreenivasan, K. et al. Olfactory network differences in master sommeliers: Connectivity analysis using granger causality and graph theoretical approach. *Brain Connect.* **7**(2), 123–136. <https://doi.org/10.1089/brain.2016.0458> (2017).
22. Hummel, T., Kobal, G., Gudziol, H. & Mackay-Sim, A. Normative data for the “Sniffin” Sticks” including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: An upgrade based on a group of more than 3,000 subjects”. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* **264**(3), 237–243. <https://doi.org/10.1007/s00405-006-0173-0> (2007).
23. Altundag, A. et al. Olfactory cleft measurements and COVID-19-related anosmia. *Otolaryngol. Neck Surg. Off. J. Am. Acad. Otolaryngol. Neck Surg.* **164**(6), 1337–1344. <https://doi.org/10.1177/0194599820965920> (2021).
24. Hoffmann, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**(2), 271–280.e8. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.02.052> (2020).
25. Butowt, R. & von Bartheld, C. S. Anosmia in COVID-19: Underlying mechanisms and assessment of an olfactory route to brain infection. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* **27**(6), 582–603. <https://doi.org/10.1177/1073858420956905> (2021).
26. Hummel, T., Sekinger, B., Wolf, S. R., Pauli, E. & Kobal, G. “Sniffin” sticks: olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. *Chem. Senses.* **22**(1), 39–52. <https://doi.org/10.1093/chemse/22.1.39> (1997).
27. Silveira-Moriyama, L. et al. The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil. *Mov. Disord.* **23**(16), 2328–2334. <https://doi.org/10.1002/mds.22241> (2008).
28. Tan, C.J.-W. et al. Neuroradiological basis of COVID-19 olfactory dysfunction: A systematic review and meta-Analysis. *Laryngoscope* **132**(6), 1260–1274. <https://doi.org/10.1002/lary.30078> (2022).
29. Buschhüter, D. et al. Correlation between olfactory bulb volume and olfactory function. *Neuroimage* **42**(2), 498–502. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2008.05.004> (2008).
30. Smith, S. M. et al. Tract-based spatial statistics: Voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. *Neuroimage* **31**(4), 1487–1505. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.02.024> (2006).
31. Douaud, G. et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. *Nature* **604**(7907), 697–707. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04569-5> (2022).
32. Rau, A. et al. Widespread white matter oedema in subacute COVID-19 patients with neurological symptoms. *Brain* <https://doi.org/10.1093/brain/awac045> (2022).
33. Pelizzari, L. et al. Mid-term MRI evaluation reveals microstructural white matter alterations in COVID-19 fully recovered subjects with anosmia presentation. *Ther. Adv. Neurol. Disord.* **15**, 17562864221111996. <https://doi.org/10.1177/17562864221111996> (2022).
34. Bispo, D. et al. Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19. *Front. Neurol.* <https://doi.org/10.3389/fneur.2022.1029302> (2022).
35. Iravani, B. et al. Acquired olfactory loss alters functional connectivity and morphology. *Sci. Rep.* **11**(1), 16422. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-95968-7> (2021).
36. Zhang, H., Chung, T.W.-H., Wong, F.K.-C., Hung, I.F.-N. & Mak, H.K.-F. Changes in the intranetwork and internetwork connectivity of the default mode network and olfactory network in patients with COVID-19 and olfactory dysfunction. *Brain Sci.* <https://doi.org/10.3390/brainsci12040511> (2022).
37. Esposito, F. et al. Olfactory loss and brain connectivity after COVID-19. *Hum. Brain Mapp.* **43**(5), 1548–1560. <https://doi.org/10.1002/hbm.25741> (2022).
38. NeuroCOVID-19. Brazilian Registry NeuroCovBr. <https://www.neurocovbr.com/>. Accessed 1 February 2022.
39. Cesar, K. G., Yassuda, M. S., Porto, F. H. G., Brucki, S. M. D. & Nitrini, R. MoCA Test: Normative and diagnostic accuracy data for seniors with heterogeneous educational levels in Brazil. *Arq. Neuropsiquiatr.* **77**(11), 775–781. <https://doi.org/10.1590/0004-282X20190130> (2019).
40. Nasreddine, Z. S. et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: A brief screening tool for mild cognitive impairment. *J. Am. Geriatr. Soc.* **53**(4), 695–699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x> (2005).
41. Yushkevich, P. A. et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: Significantly improved efficiency and reliability. *Neuroimage* **31**(3), 1116–1128. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2006.01.015> (2006).
42. Paschen, L. et al. The olfactory bulb volume in patients with idiopathic Parkinson's disease. *Eur. J. Neurol.* **22**(7), 1068–1073. <https://doi.org/10.1111/ene.12709> (2015).
43. Theaud, G. et al. TractoFlow: A robust, efficient and reproducible diffusion MRI pipeline leveraging Nextflow & Singularity. *Neuroimage* **218**, 116889. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2020.116889> (2020).
44. Girard, G., Whittingstall, K., Deriche, R. & Descoteaux, M. Towards quantitative connectivity analysis: Reducing tractography biases. *Neuroimage* **98**, 266–278. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2014.04.074> (2014).

45. Scilpy. Sherbrooke Connectivity Imaging Lab. <https://github.com/scilus/scilpy>. Accessed 1 February 2022.
46. Rolls, E. T., Huang, C.-C., Lin, C.-P., Feng, J. & Joliot, M. Automated anatomical labelling atlas 3. *Neuroimage* **206**, 116189. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2019.116189> (2020).
47. BrainNet Viewer. <https://www.nitrc.org/projects/bnv/>. Accessed 1 February 2022.
48. Zalesky, A., Fornito, A. & Bullmore, E. T. Network-based statistic: Identifying differences in brain networks. *Neuroimage* **53**(4), 1197–1207. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2010.06.041> (2010).
49. Network Based Statistic Toolbox. <https://sites.google.com/site/bctnet/network-based-statistic-toolbox>. Accessed 1 February 2022.
50. Rubinov, M. & Sporns, O. Complex network measures of brain connectivity: Uses and interpretations. *Neuroimage* **52**(3), 1059–1069. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.003> (2010).
51. Han, P., Zang, Y., Akshita, J. & Hummel, T. Magnetic resonance imaging of human olfactory dysfunction. *Brain Topogr.* **32**(6), 987–997. <https://doi.org/10.1007/s10548-019-00729-5> (2019).
52. Seubert, J., Freiherr, J., Djordjevic, J. & Lundström, J. N. Statistical localization of human olfactory cortex. *Neuroimage* **66**, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.10.030> (2013).
53. A Nextflow pipeline for diffusion MRI quality check (dmriqc\_flow). Sherbrooke Connectivity Imaging Lab. [https://github.com/scilus/dmriqc\\_flow](https://github.com/scilus/dmriqc_flow). Accessed 1 February 2022.
54. Benjamini, Y. & Hochberg, Y. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. R. Stat. Soc. Ser. B* **57**(1), 289–300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x> (1995).
55. Zijdenbos, A. P., Dawant, B. M., Margolin, R. A. & Palmer, A. C. Morphometric analysis of white matter lesions in MR images: Method and validation. *IEEE Trans. Med. Imaging* **13**(4), 716–724. <https://doi.org/10.1109/42.363096> (1994).

### Acknowledgements

The authors thank the patients and controls for their participation in the study. We would like to thank the staff of Hospital Santa Marta for their assistance in collecting the MRI data. We also thank the Sherbrooke Connectivity Imaging Lab team for their assistance, guidance, and cooperation in the MRI data processing.

### Author contributions

D.B., P.B., D.P., F.G., A.S. and N.R.: study design. D.B., P.B., D.P., M.D. and N.R.: analysis and interpretation of data. D.B., P.B. and D.P.: drafting of the manuscript. D.B., P.B., D.P., F.M., B.D., H.P., F.G., A.O., N.R., A.S. and M.D.: critical revision of the manuscript.

### Competing interests

The authors declare no competing interests.


### Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-023-40115-7>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to D.D.C.B.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2023



## Altered structural connectivity in olfactory dysfunction after mild COVID-19 using probabilistic tractography

### Authors:

Diógenes Diego de Carvalho Bispo<sup>1,2,3,\*#</sup>, Pedro Renato de Paula Brandão<sup>4,5,#</sup>, Danilo Assis Pereira<sup>6</sup>, Fernando Bisinoto Maluf<sup>3</sup>, Bruna Arrais Dias<sup>3</sup>, Hugo Rafael Paranhos<sup>3</sup>, Felipe von Glehn<sup>2,5</sup>, Augusto César Penalva de Oliveira<sup>7</sup>, Alexandre Anderson de Sousa Munhoz Soares<sup>2</sup>, Maxime Descoteaux<sup>8,9,##</sup>, and Neysa Aparecida Tinoco Regattieri<sup>2,##</sup>

# Both authors share the first authorship.

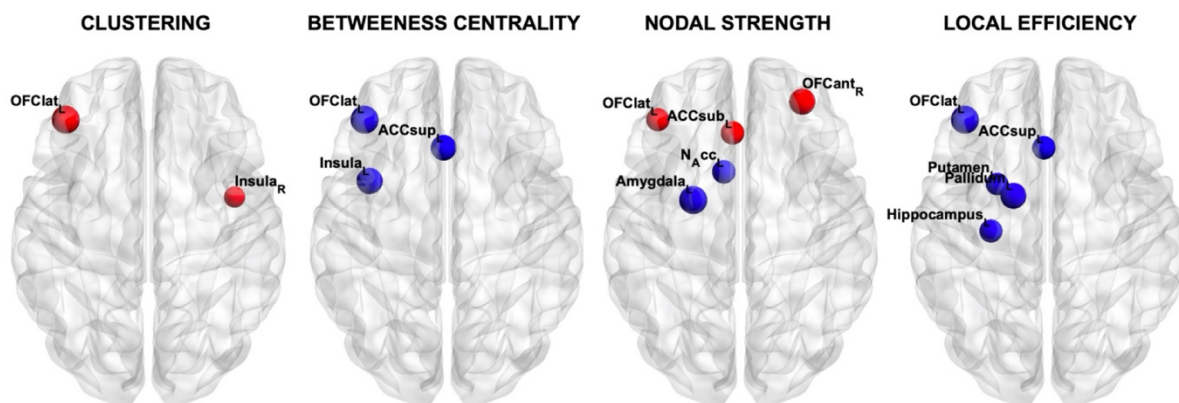
## Both authors share senior authorship.

### Supplementary Information

**Supplementary Table S1.** Group comparison of COMMIT2-weighted connectivity matrices of the whole-brain network between COV- and COV+. Significance was thresholded at  $p < 0.05$ . Permutations = 5,000.

CONTROL > COVID-19			
Node 1	Node 2	t	$t_{thr} = 3.0$
Postcentral gyrus R	Inferior parietal gyrus L	3.60	X
Postcentral gyrus R	Precuneus L	3.83	X

Abbreviations: L, left; R, right; thr, threshold.



**Supplementary Figure S1.** Difference of local network metrics in olfactory-related regions between COV+ and COV- ( $p < 0.05$  uncorrected). The size of the node represents the significance of difference between two groups.

Abbreviations: OFClat, lateral orbital gyrus; OFCant, anterior orbital gyrus; ACCsup, anterior cingulate cortex (supracallosal); ACCsub, anterior cingulate cortex (subgenual); NAcc, nucleus accumbens, R, right; L, left.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A COVID-19 não impacta apenas os pulmões, mas também o sistema nervoso, resultando em uma variedade de manifestações neurológicas. Pacientes podem experimentar desde sintomas leves, como cefaleia, fadiga e hiposmia, até complicações mais graves como encefalite, acidente vascular cerebral e síndrome de Guillain-Barré. Em alguns casos, o vírus foi identificado no SNC, sugerindo um possível impacto direto. Além disso, as alterações neurológicas observadas podem ser atribuídas à resposta inflamatória sistêmica e à formação de coágulos sanguíneos. A compreensão aprofundada do envolvimento do sistema nervoso na COVID-19 é crucial para orientar estratégias de tratamento e oferecer cuidados adequados aos pacientes afetados. Pesquisas continuam a investigar os mecanismos precisos e os potenciais efeitos a longo prazo dessa interação entre o SARS-CoV-2 e o sistema nervoso.

Nos primeiros meses da pandemia COVID-19, participei de uma colaboração para esclarecer um caso de parkinsonismo após infecção por SARS-CoV-2 no Hospital Universitário de Brasília. Esse esforço resultou na publicação do artigo intitulado “*Coronavirus disease 2019 and parkinsonism: a non-post-encephalitic case*” (FABER et al., 2020) (**Anexo D**), representando o primeiro relato na literatura de um caso de parkinsonismo não relacionado à encefalite. Através da neuroimagem, conseguimos detectar o comprometimento do sistema nigroestriatal na COVID-19, desempenhando um papel crucial nessa descoberta. Paralelamente, observamos um aumento expressivo de casos de anosmia relacionada a COVID-19 em todo o mundo. Essas evidências substanciais serviram como estímulo para ampliar nossa investigação sobre o sistema nervoso de pacientes com COVID-19, com especial atenção aos casos menos graves.

No Artigo 1 de nossa pesquisa, intitulado “*Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19*” (BISPO et al., 2022), mostramos que pacientes com COVID-19 apresentaram alterações microestruturais na substância branca em um acompanhamento médio de 3 meses. Os pacientes que tiveram COVID-19 apresentaram uma redução na densidade de fibras nos tratos de substância branca de associação, projeção e comissurais, em comparação com o grupo de controle. Vale destacar que a amostra do nosso estudo foi composta por pacientes predominantemente não hospitalizados. Estes achados corroboram com os de outros



estudos publicados na literatura. Além disso, no nosso estudo não foi observada alteração significativa na substância cinzenta. Ao contrário, a literatura engloba alguns estudos com amostras maiores e períodos de acompanhamento prolongados, evidenciando alterações tanto no volume cerebral total quanto na espessura cortical.

Em nosso estudo, observamos que o grupo COVID-19 apresentou uma maior intensidade de fadiga, sendo que as medidas de integridade axonal nos feixes de projeção, tratos cerebelares e corpo caloso se correlacionaram com a gravidade da fadiga. Na literatura, pacientes diagnosticados com síndrome da fadiga crônica exibem alterações microestruturais da substância branca nos tratos ascendentes e descendentes do tronco cerebral e em tratos de associação. Diversos estudos sobre a síndrome de fadiga crônica indicam a presença de um volume reduzido da substância branca, comprometimentos na mielinização, condução reduzida e alterações na conectividade funcional que interliga o tronco cerebral a outras regiões cerebrais. Assim, é plausível inferir que a fadiga após a COVID-19 pode apresentar correlações com a neuroimagem que se assemelham à síndrome da fadiga crônica.

É relevante ressaltar que em nosso estudo não foi identificada uma redução do desempenho dos testes cognitivos no grupo COVID-19 quando comparado ao grupo controle. No entanto, observou-se que medidas de FW correlacionaram-se com o desempenho em testes de tempo de reação e memória visual no grupo COVID-19. O índice de água livre é considerado um marcador indireto de neuroinflamação e já foi previamente investigado em contextos relacionados a condições neurodegenerativas, transtornos mentais e doenças infecciosas. Na literatura, a magnitude do aumento do FW foi associada ao comprometimento cognitivo em pacientes que apresentaram sintomas neurológicos após a COVID-19. Além disso, níveis mais elevados de marcadores inflamatórios sistêmicos durante a fase aguda da COVID-19 correlacionaram-se com alterações microestruturais cerebrais. Acredita-se que durante o insulto inflamatório do SARS-CoV-2, neurônios, oligodendrócitos e outras células gliais podem ter suas funções fisiológicas comprometidas, resultando em um distúrbio da homeostase cerebral.

No Artigo 2 intitulado “*Altered structural connectivity in olfactory dysfunction after mild COVID-19 using probabilistic tractography*” (BISPO et al., 2023), revelamos que pacientes com hiposmia persistente após COVID-19 exibiram uma redução de 25% no volume dos bulbos olfatórios em um acompanhamento médio de três meses. No grupo controle, observou-se uma correlação positiva significativa entre o volume do

bulbo olfatório e a função olfativa, consistente com pesquisas anteriores. Contudo, essa correlação não foi observada em pacientes com COVID-19. A possível recuperação da função olfativa em muitos indivíduos que inicialmente apresentaram hiposmia durante a fase aguda da COVID-19 poderia explicar essa divergência. Além disso, a infecção por SARS-CoV-2 pode afetar a substância branca e cinzenta, mesmo em indivíduos com sintomas leves sem hospitalização, o que pode impactar no processamento superior em regiões cerebrais relacionadas ao sistema olfativo.

Os pacientes hipósímicos infectados pelo SARS-CoV-2 apresentaram alterações significativas na rede de substância branca, em comparação com os controles. Uma sub-rede nas áreas sensoriais parietais com conectividade aumentada foi identificada nestes pacientes. As propriedades topológicas globais e locais da rede revelaram uma integração reduzida e uma segregação aumentada, especialmente em áreas cerebrais relacionadas ao olfato. Além disso, o desempenho olfativo correlacionou-se negativamente com medidas de conectividade no grupo COVID-19. Neste contexto, embora a plasticidade cerebral após a perda sensorial tenha sido amplamente documentada em relação à visão e audição, pouco se sabe sobre os efeitos da perda da função olfativa. Alguns estudos na literatura indicam a existência de mecanismos compensatórios nas áreas sensoriais e correlatas ao olfato, visando mitigar as deficiências no processamento olfativo.

Em conclusão, os resultados de nossa pesquisa proporcionam uma visão abrangente das implicações neurológicas decorrentes da COVID-19. Ao identificar alterações microestruturais na substância branca, correlações entre integridade axonal e fadiga, e alterações na conectividade relacionada à perda olfativa, contribuimos para o entendimento mais profundo dos impactos do SARS-CoV-2 no sistema nervoso. Enfatizamos a necessidade contínua de estudos mais amplos de conectividade cerebral e análises longitudinais para confirmar e compreender melhor essas observações, proporcionando entendimentos valiosos sobre as consequências neurológicas de longo prazo da COVID-19. Essa trajetória de pesquisa não apenas enriquece o campo da neurociência, mas também é essencial para orientar futuras estratégias de cuidado e tratamento integral dos pacientes afetados por essa complexa interação entre o vírus e o sistema nervoso.

## 7. REFERÊNCIAS

- ABBOTT, N. J. et al. Structure and function of the blood–brain barrier. **Neurobiology of Disease**, v. 37, n. 1, p. 13–25, 2010.
- ABU-RUMEILEH, S. et al. Guillain–Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. **Journal of Neurology**, v. 268, n. 4, p. 1133–1170, 2021.
- AGHAGOLI, G. et al. Neurological Involvement in COVID-19 and Potential Mechanisms: A Review. **Neurocritical Care**, v. 34, n. 3, p. 1062–1071, 2021.
- AGYEMAN, A. A. et al. Smell and Taste Dysfunction in Patients With COVID-19: A Systematic Review and Meta-analysis. **Mayo Clinic proceedings**, v. 95, n. 8, p. 1621–1631, ago. 2020.
- AL-ALY, Z.; XIE, Y.; BOWE, B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. **Nature**, v. 594, n. 7862, p. 259–264, jun. 2021.
- AL-HASHEL, J. Y. et al. Coronavirus disease-19 and headache; impact on pre-existing and characteristics of de novo: a cross-sectional study. **The Journal of Headache and Pain**, v. 22, n. 1, p. 97, 2021.
- ALMUTAIRI, M. et al. Neuroinflammation and Its Impact on the Pathogenesis of COVID-19. **Frontiers in Medicine**, 2021.
- ALMUTAIRI, M. M. A. et al. Factors controlling permeability of the blood–brain barrier. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 1, p. 57–77, 2016.
- ALQUISIRAS-BURGOS, I. et al. Neurological Complications Associated with the Blood-Brain Barrier Damage Induced by the Inflammatory Response During SARS-CoV-2 Infection. **Molecular Neurobiology**, v. 58, n. 2, p. 520–535, 2021.
- AL-SAMKARI, H. et al. COVID-19 and Coagulation: Bleeding and Thrombotic Manifestations of SARS-CoV-2 Infection. **Blood**, 2020.
- ALTUNISIK, E. et al. Quantitative Analysis of the Olfactory System in COVID-19: An MR Imaging Study. **American Journal of Neuroradiology**, 2021.
- BAIG, A. M. et al. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host–Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. **Acs Chemical Neuroscience**, 2020.
- BALLOUZ, T. et al. Recovery and symptom trajectories up to two years after SARS-CoV-2 infection: population based, longitudinal cohort study. **BMJ**, v. 381, p. e074425, 31 maio 2023.
- BASELER, H. A. et al. The negative impact of COVID-19 on working memory revealed using a rapid online quiz. **PLOS ONE**, v. 17, n. 11, p. e0269353-, 14 nov. 2022.

BASSER, P. J.; MATTIELLO, J.; LEBIHAN, D. MR diffusion tensor spectroscopy and imaging. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 1, p. 259–267, 1994.

BECKER, J. H. et al. Assessment of Cognitive Function in Patients after COVID-19 Infection. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 10, p. 8–11, 2021.

BEIJING NORMAL UNIVERSITY. **BrainNet Viewer**. Disponível em: <<https://www.nitrc.org/projects/bnv/>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

BELLON, M. et al. Cerebrospinal Fluid Features in Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) Positive Patients. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. e3102–e3105, 1 nov. 2021.

BENEDETTI, F. et al. Brain correlates of depression, post-traumatic distress, and inflammatory biomarkers in COVID-19 survivors: A multimodal magnetic resonance imaging study. **Brain, Behavior, & Immunity - Health**, v. 18, p. 100387, 2021.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1 jan. 1995.

BISPO, D. et al. Brain microstructural changes and fatigue after COVID-19. **Frontiers in Neurology**, v. 13, 2022.

BISPO, D. D. DE C. et al. Altered structural connectivity in olfactory dysfunction after mild COVID-19 using probabilistic tractography. **Scientific Reports**, v. 13, n. 1, p. 12886, 2023.

BLAZHENETS, G. et al. Slow but Evident Recovery from Neocortical Dysfunction and Cognitive Impairment in a Series of Chronic COVID-19 Patients. **Journal of Nuclear Medicine**, v. 62, n. 7, p. 910, 1 jul. 2021.

BODNAR, B. et al. Cellular mechanisms underlying neurological/neuropsychiatric manifestations of COVID-19. **Journal of Medical Virology**, v. 93, n. 4, p. 1983–1998, 2021.

BOHN, B. et al. Incidence of Dementia Following Hospitalization With Infection Among Adults in the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study Cohort. **JAMA Network Open**, v. 6, n. 1, p. e2250126–e2250126, 9 jan. 2023.

BOLDRINI, M.; CANOLL, P. D.; KLEIN, R. S. How COVID-19 Affects the Brain. **JAMA Psychiatry**, v. 78, n. 6, p. 682–683, 1 jun. 2021.

BOSCOLO-RIZZO, P. et al. Self-reported smell and taste recovery in coronavirus disease 2019 patients: a one-year prospective study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 279, n. 1, p. 515–520, 2022.

BRANN, D. H. et al. Non-neuronal expression of SARS-CoV-2 entry genes in the olfactory system suggests mechanisms underlying COVID-19-associated anosmia. **Science advances**, v. 6, n. 31, jul. 2020.

BRIGUGLIO, M. et al. Disentangling the Hypothesis of Host Dysosmia and SARS-CoV-2: The Bait Symptom That Hides Neglected Neurophysiological Routes. **Frontiers in Physiology**, v. 11, 2020.

BROLA, W.; WILSKI, M. Neurological consequences of COVID-19. **Pharmacological Reports**, v. 74, n. 6, p. 1208–1222, 2022.

BURKS, S. M. et al. Can SARS-CoV-2 infect the central nervous system via the olfactory bulb or the blood-brain barrier? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 95, p. 7–14, 2021.

BUTOWT, R.; BILINSKA, K.; VON BARTHELD, C. S. Olfactory dysfunction in COVID-19: new insights into the underlying mechanisms. **Trends in Neurosciences**, v. 46, n. 1, p. 75–90, 1 jan. 2023.

BUZHDIYGAN, T. et al. The SARS-CoV-2 Spike Protein Alters Barrier Function in 2D Static and 3D Microfluidic in-Vitro Models of the Human Blood–brain Barrier. **Neurobiology of Disease**, 2020.

CAPELLI, S. et al. MRI evidence of olfactory system alterations in patients with COVID-19 and neurological symptoms. **Journal of Neurology**, v. 270, n. 3, p. 1195–1206, 2023.

CECCHETTI, G. et al. Cognitive, EEG, and MRI features of COVID-19 survivors: a 10-month study. **Journal of Neurology**, v. 269, n. 7, p. 3400–3412, 2022.

CELLA, M.; CHALDER, T. Measuring fatigue in clinical and community settings. **Journal of psychosomatic research**, v. 69, n. 1, p. 17–22, jul. 2010.

CESAR, K. G. et al. MoCA Test: normative and diagnostic accuracy data for seniors with heterogeneous educational levels in Brazil. **Arquivos de neuro-psiquiatria**, v. 77, n. 11, p. 775–781, nov. 2019.

CHALDER, T. et al. Development of a fatigue scale. **Journal of psychosomatic research**, v. 37, n. 2, p. 147–153, 1993.

CHEETHAM, N. J. et al. The effects of COVID-19 on cognitive performance in a community-based cohort: a COVID symptom study biobank prospective cohort study. **eClinicalMedicine**, v. 62, 1 ago. 2023.

CHEN, F. et al. ApoE4 Causes Severe COVID-19 Outcomes via Downregulation of ACE2. 2022.

CHEN, R. et al. The Spatial and Cell-Type Distribution of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in Human and Mouse Brain. 2020.

CHIU, A. et al. COVID-19-induced Anosmia Associated With Olfactory Bulb Atrophy. **Neuroradiology**, 2020.

CHOU, S. H.-Y. et al. Global Incidence of Neurological Manifestations Among Patients Hospitalized With COVID-19—A Report for the GCS-NeuroCOVID

Consortium and the ENERGY Consortium. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 5, p. e2112131–e2112131, 11 maio 2021.

CONNORS, J. M.; LEVY, J. H. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. **Blood**, v. 135, n. 23, p. 2033–2040, 4 jun. 2020.

CONSTANT, O. et al. SARS-CoV-2 Poorly Replicates in Cells of the Human Blood-Brain Barrier Without Associated Deleterious Effects. **Frontiers in Immunology**, 2021.

CONWAY, E. M.; PRYZDIAL, E. L. G. Is the COVID-19 Thrombotic Catastrophe Complement-connected? **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, 2020.

COUSINEAU, M. et al. A test-retest study on Parkinson's PPMI dataset yields statistically significant white matter fascicles. **NeuroImage. Clinical**, v. 16, p. 222–233, 2017.

CRIVELLI, L. et al. Changes in cognitive functioning after COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Alzheimer's & Dementia**, v. 18, n. 5, p. 1047–1066, 1 maio 2022.

DADUCCI, A. et al. COMMIT: Convex optimization modeling for microstructure informed tractography. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 34, n. 1, p. 246–257, jan. 2015.

DAS, G.; MUKHERJEE, N.; GHOSH, S. Neurological Insights of COVID-19 Pandemic. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 9, p. 1206–1209, 6 maio 2020.

DE ALCÂNTARA, I. et al. Cognitive Deficits in the Acute Phase of COVID-19: A Review and Meta-Analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 12, n. 3, 2023.

DE MELO, G. D. et al. COVID-19-related anosmia is associated with viral persistence and inflammation in human olfactory epithelium and brain infection in hamsters. **Science translational medicine**, v. 13, n. 596, jun. 2021.

DENNIS, A. et al. Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. **BMJ open**, v. 11, n. 3, p. e048391, mar. 2021.

DÍEZ-CIRARDA, M. et al. Multimodal neuroimaging in post-COVID syndrome and correlation with cognition. **Brain**, v. 146, n. 5, p. 2142–2152, 2 maio 2023a.

DÍEZ-CIRARDA, M. et al. Hippocampal subfield abnormalities and biomarkers of pathologic brain changes: from SARS-CoV-2 acute infection to post-COVID syndrome. **eBioMedicine**, v. 94, 1 ago. 2023b.

DIVANI, A. A. et al. Coronavirus Disease 2019 and Stroke: Clinical Manifestations and Pathophysiological Insights. **Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases**, v. 29, n. 8, 1 ago. 2020.

DOMINGO, P. et al. The Four Horsemen of a Viral Apocalypse: The Pathogenesis of SARS-CoV-2 Infection (COVID-19). **Ebiomedicine**, 2020.

- DOUAUD, G. et al. SARS-CoV-2 is associated with changes in brain structure in UK Biobank. **Nature**, v. 604, n. 7907, p. 697–707, abr. 2022.
- DUBÉ, M. et al. Axonal Transport Enables Neuron-to-Neuron Propagation of Human Coronavirus OC43. **Journal of Virology**, v. 92, n. 17, p. 10.1128/jvi.00404-18, 2018.
- EHRENFELD, M. et al. Covid-19 and Autoimmunity. **Autoimmunity Reviews**, 2020.
- ERICKSON, M. A. et al. Interactions of SARS-CoV-2 With the Blood–Brain Barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, 2021.
- ERICKSON, M. A.; BANKS, W. A. Neuroimmune Axes of the BloodBrain Barriers and BloodBrain Interfaces: Bases for Physiological Regulation, Disease States, and Pharmacological Interventions. **Pharmacological Reviews**, v. 70, n. 2, p. 278–314, 2018.
- ESPOSITO, F. et al. Olfactory loss and brain connectivity after COVID-19. **Human brain mapping**, v. 43, n. 5, p. 1548–1560, abr. 2022.
- FABER, I. et al. Coronavirus Disease 2019 and Parkinsonism: A Non-post-encephalitic Case. **Movement Disorders**, v. 35, n. 10, p. 1721–1722, 1 out. 2020.
- FÁTIMA ARAGÃO, M. DE et al. Anosmia in COVID-19 Associated With Injury to the Olfactory Bulbs Evident on MRI. **American Journal of Neuroradiology**, 2020.
- FAUL, F. et al. G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. **Behavior research methods**, v. 39, n. 2, p. 175–191, maio 2007.
- FISCHL, B. FreeSurfer. **NeuroImage**, v. 62, n. 2, p. 774–781, 2012.
- FLETCHER-SANDERSJÖÖ, A.; BELLANDER, B. Is COVID-19 Associated Thrombosis Caused by Overactivation of the Complement Cascade? A Literature Review. **Thrombosis Research**, 2020.
- FOTUHI, M. et al. Neurobiology of COVID-19. **Journal of Alzheimer’s Disease**, v. 76, p. 3–19, 2020.
- GADANEC, L. K. et al. Can SARS-CoV-2 Virus Use Multiple Receptors to Enter Host Cells? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 3, 2021.
- GARYFALLIDIS, E. et al. Recognition of white matter bundles using local and global streamline-based registration and clustering. **NeuroImage**, v. 170, p. 283–295, abr. 2018.
- GRAHAM, E. L. et al. Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non-hospitalized Covid-19 “long haulers”. **Annals of Clinical and Translational Neurology**, v. 8, n. 5, p. 1073–1085, 2021.
- GROFF, D. et al. Short-term and Long-term Rates of Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection: A Systematic Review. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 10, p. 1–17, 2021.

- GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 28 fev. 2020.
- GUEDJ, E. et al. 18F-FDG brain PET hypometabolism in patients with long COVID. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, n. 9, p. 2823–2833, 2021.
- GUPTA, M.; WEAVER, D. F. COVID-19 as a Trigger of Brain Autoimmunity. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 12, n. 14, p. 2558–2561, 21 jul. 2021.
- GUPTA, S. et al. A systematic review of Bell's Palsy as the only major neurological manifestation in COVID-19 patients. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 90, p. 284–292, 1 ago. 2021.
- HAMPSHIRE, A. et al. Cognitive deficits in people who have recovered from COVID-19. **EClinicalMedicine**, v. 39, p. 101044, 2021.
- HAN, P. et al. Magnetic Resonance Imaging of Human Olfactory Dysfunction. **Brain topography**, v. 32, n. 6, p. 987–997, nov. 2019.
- HARRISON, P. J.; TAQUET, M. Neuropsychiatric disorders following SARS-CoV-2 infection. **Brain**, v. 146, n. 6, p. 2241–2247, 1 jun. 2023.
- HO, C.-Y. et al. Postmortem Assessment of Olfactory Tissue Degeneration and Microvasculopathy in Patients With COVID-19. **JAMA neurology**, abr. 2022.
- 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, abr. 2020.
- HOSP, J. A. et al. Cognitive impairment and altered cerebral glucose metabolism in the subacute stage of COVID-19. **Brain**, v. 144, n. 4, p. 1263–1276, 2021.
- HUA, K. et al. Tract probability maps in stereotaxic spaces: analyses of white matter anatomy and tract-specific quantification. **NeuroImage**, v. 39, n. 1, p. 336–347, jan. 2008.
- HUANG, S. et al. Persistent white matter changes in recovered COVID-19 patients at the 1-year follow-up. **Brain**, dez. 2021.
- HUMMEL, T. et al. "Sniffin" sticks': olfactory performance assessed by the combined testing of odor identification, odor discrimination and olfactory threshold. **Chemical senses**, v. 22, n. 1, p. 39–52, fev. 1997.
- HUMMEL, T. et al. Normative data for the "Sniffin" Sticks" including tests of odor identification, odor discrimination, and olfactory thresholds: an upgrade based on a group of more than 3,000 subjects." **European archives of oto-rhino-laryngology : official journal of the European Federation of Oto-Rhino-Laryngological Societies (EUFOS) : affiliated with the German Society for Oto-Rhino-Laryngology - Head and Neck Surgery**, v. 264, n. 3, p. 237–243, mar. 2007.



IADECOLA, C.; ANRATHER, J.; KAMEL, H. Effects of COVID-19 on the Nervous System. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 16- 27.e1, 1 out. 2020.

IBA, T. et al. The Unique Characteristics of COVID-19 Coagulopathy. **Critical Care**, 2020.

JACKSON, C. The Chalder Fatigue Scale (CFQ 11). **Occupational medicine (Oxford, England)**, v. 65, n. 1, p. 86, jan. 2015.

JACOB, F. et al. Human Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Cells and Brain Organoids Reveal SARS-CoV-2 Neurotropism Predominates in Choroid Plexus Epithelium. **Cell Stem Cell**, 2020.

JACOMY, H. et al. Human coronavirus OC43 infection induces chronic encephalitis leading to disabilities in BALB/C mice. **Virology**, v. 349, n. 2, p. 335–346, 2006.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. **COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE)**. Disponível em: <<https://coronavirus.jhu.edu/map.html>>. Acesso em: 9 mar. 2023.

KANDEMIRLI, S. G. et al. Olfactory Bulb MRI and Paranasal Sinus CT Findings in Persistent COVID-19 Anosmia. **Academic Radiology**, 2021.

KAS, A. et al. The cerebral network of COVID-19-related encephalopathy: a longitudinal voxel-based 18F-FDG-PET study. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 48, n. 8, p. 2543–2557, 2021.

KHAN, M. et al. Visualizing in deceased COVID-19 patients how SARS-CoV-2 attacks the respiratory and olfactory mucosae but spares the olfactory bulb. **Cell**, v. 184, n. 24, p. 5932- 5949.e15, nov. 2021.

KIM, P. H. et al. Neuroimaging Findings in Patients with COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Korean J Radiol**, v. 22, n. 11, p. 1875–1885, nov. 2021.

KLOK, F. A. et al. Incidence of Thrombotic Complications in Critically Ill ICU Patients With COVID-19. **Thrombosis Research**, 2020.

KOX, M. et al. Cytokine Levels in Critically Ill Patients With COVID-19 and Other Conditions. **Jama**, 2020.

KUBOTA, T.; KURODA, N.; SONE, D. Neuropsychiatric aspects of long COVID: A comprehensive review. **Psychiatry and Clinical Neurosciences**, v. 77, n. 2, p. 84–93, 2023.

LECHIEN, J. R. et al. Olfactory and gustatory dysfunctions as a clinical presentation of mild-to-moderate forms of the coronavirus disease (COVID-19): a multicenter European study. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 277, n. 8, p. 2251–2261, 2020.

LECHIEN, J. R. et al. Prevalence and 6-month recovery of olfactory dysfunction: a multicentre study of 1363 COVID-19 patients. **Journal of internal medicine**, v. 290, n. 2, p. 451–461, ago. 2021.

- LEVI, M. et al. Coagulation Abnormalities and Thrombosis in Patients With COVID-19. **The Lancet Haematology**, 2020.
- LI, Y. et al. Physiological and pathological regulation of ACE2, the SARS-CoV-2 receptor. **Pharmacological Research**, v. 157, p. 104833, 2020.
- LI, Y.-C.; BAI, W.-Z.; HASHIKAWA, T. The neuroinvasive potential of SARS-CoV2 may play a role in the respiratory failure of COVID-19 patients. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 6, p. 552–555, 1 jun. 2020.
- LIGUORI, C. et al. Subjective neurological symptoms frequently occur in patients with SARS-CoV2 infection. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 88, p. 11–16, 2020.
- LIMA, M. et al. Unraveling the Possible Routes of SARS-COV-2 Invasion into the Central Nervous System. **Current Treatment Options in Neurology**, v. 22, n. 11, p. 37, 2020.
- LIN, E. et al. Brain Imaging of Patients with COVID-19: Findings at an Academic Institution during the Height of the Outbreak in New York City. **American Journal of Neuroradiology**, v. 41, n. 11, p. 2001, 1 nov. 2020.
- LIU, Y.-H. et al. One-Year Trajectory of Cognitive Changes in Older Survivors of COVID-19 in Wuhan, China: A Longitudinal Cohort Study. **JAMA Neurology**, v. 79, n. 5, p. 509–517, 1 maio 2022.
- LODIGIANI, C. et al. Venous and Arterial Thromboembolic Complications in COVID-19 Patients Admitted to an Academic Hospital in Milan, Italy. **Thrombosis Research**, 2020.
- MAO, L. et al. Neurologic Manifestations of Hospitalized Patients With Coronavirus Disease 2019 in Wuhan, China. **JAMA Neurology**, v. 77, n. 6, p. 683–690, 1 jun. 2020.
- MARTINI, A. L. et al. Time-dependent recovery of brain hypometabolism in neuro-COVID-19 patients. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 50, n. 1, p. 90–102, 2022.
- MARTINOS CENTER. **FreeSurfer**. Disponível em: <<http://surfer.nmr.mgh.harvard.edu>>. Acesso em: 31 jan. 2022.
- MATOS, A. DE M. B. et al. Subacute Cognitive Impairment in Individuals With Mild and Moderate COVID-19: A Case Series. **Frontiers in Neurology**, v. 12, n. August, p. 1–8, 2021.
- MEINHARDT, J. et al. Olfactory transmucosal SARS-CoV-2 invasion as a port of central nervous system entry in individuals with COVID-19. **Nature neuroscience**, v. 24, n. 2, p. 168–175, fev. 2021.
- MORAND, A. et al. Similar patterns of [18F]-FDG brain PET hypometabolism in paediatric and adult patients with long COVID: a paediatric case series. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, v. 49, n. 3, p. 913–920, 2022.

NALBANDIAN, A. et al. Post-acute COVID-19 syndrome. **Nature Medicine**, v. 27, n. 4, p. 601–615, 2021.

NASREDDINE, Z. S. et al. The Montreal Cognitive Assessment, MoCA: a brief screening tool for mild cognitive impairment. **Journal of the American Geriatrics Society**, v. 53, n. 4, p. 695–699, abr. 2005.

NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CARE EXCELLENCE. **COVID-19 rapid guideline: managing the longterm effects of COVID-19**. Disponível em: <<https://www.nice.org.uk/guidance/ng188/resources/covid19-rapid-guideline-managing-the-longterm-effects-of-covid19-pdf-51035515742>>. Acesso em: 1 nov. 2023.

NERSESJAN, V. et al. Neuropsychiatric and Cognitive Outcomes in Patients 6 Months After COVID-19 Requiring Hospitalization Compared With Matched Control Patients Hospitalized for Non-COVID-19 Illness. **JAMA Psychiatry**, v. 79, n. 5, p. 486–497, 1 maio 2022.

NEUROCOVBR STUDY GROUP. **NeuroCovBr**. Disponível em: <<https://www.neurocovbr.com/>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

NI, W. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Critical Care**, v. 24, n. 1, p. 422, 2020.

NICHOLS, T. E.; HOLMES, A. P. Nonparametric permutation tests for functional neuroimaging: a primer with examples. **Human brain mapping**, v. 15, n. 1, p. 1–25, jan. 2002.

NOOIJER, A. H. D. et al. Complement Activation in the Disease Course of Coronavirus Disease 2019 and Its Effects on Clinical Outcomes. **The Journal of Infectious Diseases**, 2020.

NØSTDAHL, T. et al. Defining the cut-off point of clinically significant postoperative fatigue in three common fatigue scales. **Quality of life research : an international journal of quality of life aspects of treatment, care and rehabilitation**, v. 28, n. 4, p. 991–1003, abr. 2019.

OXLEY, T. J. et al. Large-Vessel Stroke as a Presenting Feature of Covid-19 in the Young. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 20, p. e60, 28 abr. 2020.

PANDHARIPANDE, P. P. et al. Long-term cognitive impairment after critical illness. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 14, p. 1306–1316, out. 2013.

PANIZ-MONDOLFI, A. et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 7, p. 699–702, 1 jul. 2020.

PASCHEN, L. et al. The olfactory bulb volume in patients with idiopathic Parkinson's disease. **European journal of neurology**, v. 22, n. 7, p. 1068–1073, jul. 2015.

PASTERNAK, O. et al. Free water elimination and mapping from diffusion MRI. **Magnetic resonance in medicine**, v. 62, n. 3, p. 717–730, set. 2009.

- PATERSON, R. W. et al. The emerging spectrum of COVID-19 neurology: clinical, radiological and laboratory findings. **Brain**, v. 143, n. 10, p. 3104–3120, 1 out. 2020.
- PAUL, A. M. et al. Osteopontin facilitates West Nile virus neuroinvasion via neutrophil “Trojan horse” transport. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 4722, 2017.
- PELLEGRINI, L. et al. SARS-CoV-2 Infects the Brain Choroid Plexus and Disrupts the Blood-CSF Barrier in Human Brain Organoids. **Cell Stem Cell**, 2020.
- PEZZINI, A.; PADOVANI, A. Lifting the mask on neurological manifestations of COVID-19. **Nature Reviews Neurology**, v. 16, n. 11, p. 636–644, 2020.
- PIERPAOLI, C. et al. Diffusion tensor MR imaging of the human brain. **Radiology**, v. 201, n. 3, p. 637–648, dez. 1996.
- QIN, Y. et al. Long-term microstructure and cerebral blood flow changes in patients recovered from COVID-19 without neurological manifestations. **Journal of Clinical Investigation**, v. 131, n. 8, 2021.
- RAFFELT, D. et al. Apparent Fibre Density: a novel measure for the analysis of diffusion-weighted magnetic resonance images. **NeuroImage**, v. 59, n. 4, p. 3976–3994, fev. 2012.
- RAFFELT, D. A. et al. Investigating white matter fibre density and morphology using fixel-based analysis. **NeuroImage**, v. 144, n. Pt A, p. 58–73, jan. 2017.
- RAMAN, B. et al. Medium-term effects of SARS-CoV-2 infection on multiple vital organs, exercise capacity, cognition, quality of life and mental health, post-hospital discharge. **eClinicalMedicine**, v. 31, 1 jan. 2021.
- RAU, A. et al. Widespread white matter oedema in subacute COVID-19 patients with neurological symptoms. **Brain : a journal of neurology**, jun. 2022.
- REESE, J. T. et al. Generalisable long COVID subtypes: findings from the NIH N3C and RECOVER programmes. **eBioMedicine**, v. 87, 1 jan. 2023.
- RHEAULT, F. et al. Bundle-specific tractography with incorporated anatomical and orientational priors. **NeuroImage**, v. 186, p. 382–398, fev. 2019.
- RHEAULT, F. **Analyse et reconstruction de faisceaux de la matière blanche**. [s.l.] University of Sherbrooke, 2020.
- ROLLS, E. T. et al. Automated anatomical labelling atlas 3. **NeuroImage**, v. 206, p. 116189, fev. 2020.
- RUBINOV, M.; SPORNS, O. Complex network measures of brain connectivity: uses and interpretations. **NeuroImage**, v. 52, n. 3, p. 1059–1069, set. 2010.
- SAYIN, İ.; YAŞAR, K. K.; YAZICI, Z. M. Taste and Smell Impairment in COVID-19: An AAO-HNS Anosmia Reporting Tool-Based Comparative Study. **Otolaryngology-head and neck surgery : official journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 163, n. 3, p. 473–479, set. 2020.

SCHIAVI, S. et al. A new method for accurate in vivo mapping of human brain connections using microstructural and anatomical information. **Science advances**, v. 6, n. 31, p. eaba8245, jul. 2020.

SEFIK, E. et al. Inflammasome Activation in Infected Macrophages Drives COVID-19 Pathology. **Nature**, 2022.

SEREBROVSKA, Z. et al. Hypoxia, HIF-1 $\alpha$ , and COVID-19: From Pathogenic Factors to Potential Therapeutic Targets. **Acta Pharmacologica Sinica**, 2020.

SEUBERT, J. et al. Statistical localization of human olfactory cortex. **NeuroImage**, v. 66, p. 333–342, fev. 2013.

SHANG, J. et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 21, p. 11727–11734, 26 maio 2020.

SHERBROOKE CONNECTIVITY IMAGING LAB. **Scilpy**. Disponível em: <<https://github.com/scilus/scilpy>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

SILVEIRA-MORIYAMA, L. et al. The use of smell identification tests in the diagnosis of Parkinson's disease in Brazil. **Movement disorders : official journal of the Movement Disorder Society**, v. 23, n. 16, p. 2328–2334, dez. 2008.

SMITH, S. M. et al. Tract-based spatial statistics: voxelwise analysis of multi-subject diffusion data. **NeuroImage**, v. 31, n. 4, p. 1487–1505, jul. 2006.

SORIANO, J. B. et al. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. **The Lancet Infectious Diseases**, n. October, 2021.

TALAVERA, B. et al. Anosmia is associated with lower in-hospital mortality in COVID-19. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 419, 15 dez. 2020.

TAN, C. J.-W. et al. Neuroradiological Basis of COVID-19 Olfactory Dysfunction: A Systematic Review and Meta-Analysis. **The Laryngoscope**, v. 132, n. 6, p. 1260–1274, jun. 2022.

TAQUET, M. et al. Neurological and psychiatric risk trajectories after SARS-CoV-2 infection: an analysis of 2-year retrospective cohort studies including 1 284 437 patients. **The Lancet Psychiatry**, v. 9, n. 10, p. 815–827, 1 out. 2022.

TAVARES-JÚNIOR, J. W. L. et al. COVID-19 associated cognitive impairment: A systematic review. **Cortex**, v. 152, p. 77–97, 2022.

TAY, M. Z. et al. The Trinity of COVID-19: Immunity, Inflammation and Intervention. **Nature Reviews Immunology**, 2020.

THAWEETHAI, T. et al. Development of a Definition of Postacute Sequelae of SARS-CoV-2 Infection. **JAMA**, v. 329, n. 22, p. 1934–1946, 13 jun. 2023.

THE R FOUNDATION FOR STATISTICAL COMPUTING. **The R Project for Statistical Computing**.

THEAUD, G. et al. TractoFlow: A robust, efficient and reproducible diffusion MRI pipeline leveraging Nextflow & Singularity. **NeuroImage**, v. 218, p. 116889, set. 2020.

THUNELL, E. et al. Effects of COVID-19 on the Human Central Olfactory System: A Natural Pre-Post Experiment. **American Journal of Neuroradiology**, v. 43, n. 12, p. 1777–1783, 2022.

TIAN, M. et al. HIF-1 $\alpha$  Promotes SARS-CoV-2 Infection and Aggravates Inflammatory Responses to COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2021.

TONG, J. Y. et al. The Prevalence of Olfactory and Gustatory Dysfunction in COVID-19 Patients: A Systematic Review and Meta-analysis. **Otolaryngology–Head and Neck Surgery**, v. 163, n. 1, p. 3–11, 1 jul. 2020.

TONIOLO, S. et al. Is the Frontal Lobe the Primary Target of SARS-CoV-2? **Journal of Alzheimer's Disease**, v. 81, p. 75–81, 2021.

TORICES, S. et al. Expression of SARS-CoV-2-related Receptors in Cells of the Neurovascular Unit: Implications for HIV-1 Infection. **Journal of Neuroinflammation**, 2021.

TOURNIER, J.-D.; CALAMANTE, F.; CONNELLY, A. Robust determination of the fibre orientation distribution in diffusion MRI: non-negativity constrained super-resolved spherical deconvolution. **NeuroImage**, v. 35, n. 4, p. 1459–1472, maio 2007.

UNIVERSITY OF MELBOURNE. **NBS Connectome**. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/bctnet/network-based-statistic-toolbox>>. Acesso em: 31 jan. 2022.

VARGA, Z. et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. **The Lancet**, v. 395, n. 10234, p. 1417–1418, 2 maio 2020.

VON BARTHELD, C. S.; WANG, L. Prevalence of Olfactory Dysfunction with the Omicron Variant of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Cells**, v. 12, n. 3, 2023.

WANG, Q. et al. Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2. **Cell**, v. 181, n. 4, p. 894–904.e9, 14 maio 2020.

WANG, Y. et al. SARS-CoV-2-associated acute disseminated encephalomyelitis: a systematic review of the literature. **Journal of Neurology**, v. 269, n. 3, p. 1071–1092, 2022.

WINGROVE, J. et al. Aberrant olfactory network functional connectivity in people with olfactory dysfunction following COVID-19 infection: an exploratory, observational study. **eClinicalMedicine**, v. 58, 1 abr. 2023.

- WU, K. et al. Roles of the Cyclooxygenase 2 Matrix Metalloproteinase 1 Pathway in Brain Metastasis of Breast Cancer \*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 15, p. 9842–9854, 10 abr. 2015.
- XIAO, K. et al. Isolation of SARS-CoV-2-related coronavirus from Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 286–289, 2020.
- XU, E.; XIE, Y.; AL-ALY, Z. Long-term neurologic outcomes of COVID-19. **Nature Medicine**, v. 28, n. 11, p. 2406–2415, 2022.
- XYDAKIS, M. S. et al. **Smell and taste dysfunction in patients with COVID-19. The Lancet. Infectious diseases**, set. 2020.
- YANG, L. et al. A Human Pluripotent Stem Cell-Based Platform to Study SARS-CoV-2 Tropism and Model Virus Infection in Human Cells and Organoids. **Cell Stem Cell**, 2020a.
- YANG, Y. et al. Plasma IP-10 and MCP-3 levels are highly associated with disease severity and predict the progression of COVID-19. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 146, n. 1, p. 119- 127.e4, 1 jul. 2020b.
- YE, Q.; WANG, B.; MAO, J. The Pathogenesis and Treatment of the 'Cytokine Storm' in COVID-19. **Journal of Infection**, 2020.
- YEATMAN, J. D. et al. Tract profiles of white matter properties: automating fiber-tract quantification. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e49790, 2012.
- YEH, C.-H. et al. Mapping Structural Connectivity Using Diffusion MRI: Challenges and Opportunities. **Journal of magnetic resonance imaging : JMRI**, v. 53, n. 6, p. 1666–1682, jun. 2021.
- YIN, X.-X. et al. Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) as a Vital Target for Brain Inflammation during the COVID-19 Outbreak. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 11, n. 12, p. 1704–1705, 17 jun. 2020.
- YUSHKEVICH, P. A. et al. User-guided 3D active contour segmentation of anatomical structures: significantly improved efficiency and reliability. **NeuroImage**, v. 31, n. 3, p. 1116–1128, jul. 2006.
- ZALESKY, A.; FORNITO, A.; BULLMORE, E. T. Network-based statistic: identifying differences in brain networks. **NeuroImage**, v. 53, n. 4, p. 1197–1207, dez. 2010.
- ZHANG, F. et al. Quantitative mapping of the brain's structural connectivity using diffusion MRI tractography: A review. **NeuroImage**, v. 249, p. 118870, abr. 2022.
- ZHANG, L. et al. SARS-CoV-2 Crosses the Blood–brain Barrier Accompanied With Basement Membrane Disruption Without Tight Junctions Alteration. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, 2021.
- ZHAO, Z. et al. Establishment and Dysfunction of the Blood-Brain Barrier. **Cell**, v. 163, n. 5, p. 1064–1078, 19 nov. 2015.



ZHENG, S. et al. Viral Load Dynamics and Disease Severity in Patients Infected With SARS-CoV-2 in Zhejiang Province, China, January-March 2020: Retrospective Cohort Study. **BMJ**, 2020.

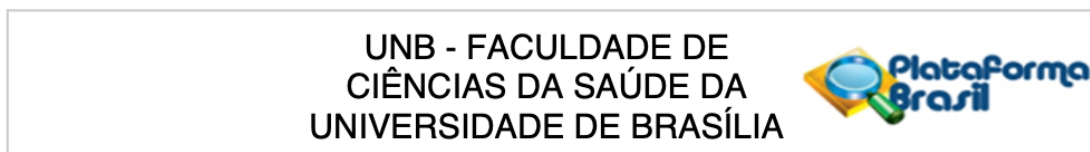
ZIJDENBOS, A. P. et al. Morphometric analysis of white matter lesions in MR images: method and validation. **IEEE transactions on medical imaging**, v. 13, n. 4, p. 716–724, 1994.

ZUBAIR, A. S. et al. Neuropathogenesis and Neurologic Manifestations of the Coronaviruses in the Age of Coronavirus Disease 2019: A Review. **JAMA Neurology**, v. 77, n. 8, p. 1018–1027, 1 ago. 2020.

ZUO, T. et al. Alterations in Gut Microbiota of Patients With COVID-19 During Time of Hospitalization. **Gastroenterology**, 2020.

## 8. ANEXOS

### Anexo A - Aprovação no Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Continuação do Parecer: 4.206.706

ao CEP.

Para quaisquer outras dúvidas e requisições estamos disponíveis pelo e-mail (felipe.vongleh@unb.br) ou tel (61) 99933-2712.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA

Todas as pendências foram atendidas.

Não há óbices éticos para a realização do presente protocolo de pesquisa.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Conforme Resolução CNS 466/2012, itens X.1.- 3.b. e XI.2.d, os pesquisadores responsáveis deverão apresentar relatórios parcial semestral e final do projeto de pesquisa, contados a partir da data de aprovação do protocolo de pesquisa.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1557723.pdf	22/07/2020 15:10:05		Aceito
Brochura Pesquisa	ProjetoPesquisaHUB_Final_CEP.docx	22/07/2020 15:09:27	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RespostaCEP_UNB.docx	17/07/2020 11:11:08	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_Bergmann.pdf	17/07/2020 11:09:14	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_Eduardo.pdf	17/07/2020 11:08:49	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_GustavoTakano.pdf	17/07/2020 11:08:18	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_GustavoFreire.pdf	17/07/2020 11:07:50	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_Wagner.pdf	17/07/2020 11:07:16	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CVLattes_Felipe.pdf	17/07/2020 11:04:25	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TermoAnuencia_HUB.pdf	17/07/2020 10:26:08	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Orçamento	Orcamento_HUB_corrigido.docx	17/07/2020 10:20:24	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Cronograma	Cronograma_HUB_corrigido.docx	17/07/2020 10:19:16	Felipe von Glehn Silva	Aceito

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com

**UNB - FACULDADE DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA  
UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA**



Continuação do Parecer: 4.206.706

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NC_TCLE_Assentimento.docx	17/07/2020 10:18:13	Felipe von Glehn Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NC_TCLE_HUB.docx	17/07/2020 10:17:28	Felipe von Glehn Silva	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NC_TCLE_PAIS.docx	17/07/2020 10:16:24	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Anuencia_Pesquisador_HUB.docx	04/06/2020 13:17:13	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	CartaEncaminhamentoCEP_HUB.docx	04/06/2020 13:15:10	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Solicitação registrada pelo CEP	CartaEncaminhamentoCEP.pdf	04/06/2020 13:12:23	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	TermoConcordanciaInstitucional_HUB.docx	04/06/2020 13:11:00	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Declaração de Pesquisadores	ANUENCIA_PESQUISADOR.pdf	30/05/2020 13:51:40	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_submissao_HUB_UNB.docx	30/05/2020 13:47:37	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_FelipeVonGlehn.pdf	30/05/2020 13:46:02	Felipe von Glehn Silva	Aceito
Outros	NC_centros_participantes.docx	04/05/2020 10:48:53	Aline de Moura Brasil Matos	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BRASILIA, 11 de Agosto de 2020

\_\_\_\_\_  
**Assinado por:  
Marie Togashi  
(Coordenador(a))**

**Endereço:** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília - Campus Darcy Ribeiro

**Bairro:** Asa Norte

**CEP:** 70.910-900

**UF:** DF

**Município:** BRASILIA

**Telefone:** (61)3107-1947

**E-mail:** cepfsunb@gmail.com

## Anexo B - Formulário de dados demográficos e clínicos



### Questionário sobre COVID-19 e sintomas neurológicos a profissionais da assistência em saúde

#### Informações preliminares

Após preencher este questionário, você será convidado a realizar a coleta de RT-qPCR por swab (cotonete) nasofaríngeo, seguida por uma coleta de sangue venoso (coletado de veia no antebraço) para quantificação dos anticorpos IgA e IgG para o novo coronavírus (SARS-CoV-2), por método imunoenzimático (ELISA). As informações serão repassadas à Comissão de Controle de Infecção Hospitalar (CCIH) de sua instituição, para que os resultados desses exames possam ser fornecidos a você. Enfatizamos que os pesquisadores resguardarão sigilo completo sobre todos estes dados, em qualquer hipótese.

1. Você preencheu o termo de consentimento e concorda em participar desta pesquisa?

Sim

Não

2. Faremos algumas perguntas sobre você e seu estado de saúde

OK

3. Digite, por gentileza, seu nome completo

4. Nos informe, por favor, sua data de nascimento (DD/MM/AAAA)

5. ID (código identificador: Primeira letra dos dois primeiros nomes e primeira letra do último sobrenome + data de nascimento no formato DDMMAAAA).

Exemplo: Fulano Oliveira Silva, nascido em 03/01/1970; ID=FOS03011970

6. Forneça seu endereço de e-mail completo, por gentileza, para que possamos contatar o(a) senhor(a)

7. Qual é o seu número de telefone para contato? (DD) NNNNN-NNNN

## Anexo C - Avaliação Cognitiva de Montreal (MoCA / versão brasileira)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA) Nome: \_\_\_\_\_ Data de nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Versão Experimental Brasileira Escolaridade: \_\_\_\_\_ Data de avaliação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
 Sexo: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA		Copiar o cubo		Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos			
				<input type="checkbox"/> Contorno <input type="checkbox"/> Números <input type="checkbox"/> Ponteiros		___/5			
NOMEAÇÃO									
						___/3			
MEMÓRIA		Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Sem Pontuação
		1ª tentativa							
		2ª tentativa							
ATENÇÃO		Leia a sequência de números (1 número por segundo)		O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta [ ] 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta [ ] 7 4 2				___/2	
		Leia a série de letras. O sujeito deve bater com a mão (na mesa) cada vez que ouvir a letra "A". Não se atribuem pontos se ≥ 2 erros.		[ ] F B A C M N A A J K L B A F A K D E A A A J A M O F A A B				___/1	
		Subtração de 7 começando pelo 100 [ ] 93 [ ] 86 [ ] 79 [ ] 72 [ ] 65		4 ou 5 subtrações corretas: 3 pontos; 2 ou 3 corretas 2 pontos; 1 correta 1 ponto; 0 correta 0 ponto				___/3	
LINGUAGEM		Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje. [ ]		O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala. [ ]				___/2	
		Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto). [ ] _____ (N ≥ 11 palavras)						___/1	
ABSTRAÇÃO		Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta [ ] trem - bicicleta [ ] relógio - régua						___/2	
EVOCAÇÃO TARDIA		Deve recordar as palavras SEM PISTAS		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS
		Pista de categoria		[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	[ ]	
OPCIONAL		Pista de múltipla escolha							
ORIENTAÇÃO		[ ] Dia do mês [ ] Mês [ ] Ano [ ] Dia da semana [ ] Lugar [ ] Cidade						___/6	
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmiento Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman (UNIFESP-SP 2007)		TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade						___/30	

## Anexo D - Artigo publicado em colaboração

Faber I, Brandão PRP, Menegatti F, Bispo DDC, Maluf FB, Cardoso F. Coronavirus Disease 2019 and Parkinsonism: A Non-post-encephalitic Case. *Mov Disord.* 2020 Oct;35(10):1721-1722. doi: 10.1002/mds.28277.



### LETTERS: NEW OBSERVATION

## Coronavirus Disease 2019 and Parkinsonism: A Non-post-encephalitic Case

A 35-year-old previously healthy female presented with fever, cough, sneezing, rhinorrhea, diarrhea, myalgia, anosmia, and hyposmia. She was diagnosed with mild coronavirus disease 2019 (COVID-19) infection (positive quantitative reverse transcription polymerase chain reaction test for severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 [SARS-CoV-2] performed by nasopharyngeal swab) and did not require hospitalization. After 10 days, she recovered from respiratory symptoms but developed paresthesia and difficulty in moving her right arm. After 1 day, she became unable to move the right arm and developed a lower voice tone, generalized rigidity, and slowness of movement with gait unsteadiness.

Two weeks after the onset of neurological symptoms, physical examination revealed decreased facial expression, eyelid retraction, and slow and hypometric saccades as well as hypophonia. She also had generalized and asymmetric (right worse than the left) bradykinesia and cogwheel rigidity, stooped posture, gait with reduced arm swing, en bloc turning, and decreased stride length. The Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III score on the first evaluation was 49. After 4 days of therapy with 200/50 mg of levodopa/benserazide three times a day, there was significant improvement of facial expression, dysarthria, bradykinesia, and arm swinging. The Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III score decreased to 32 (see the Supplementary Information for Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale Part III detailed description; physical examination features are shown in Video S1). Cognition was normal, and Sniffin' Sticks confirmed moderate hyposmia (9/16 correct answers). The proband had no family history of parkinsonism.

Laboratory workup included a normal cerebrospinal fluid analysis (cells, 0; protein, 36 mg/dL; glucose, 60 mg/dL). The 3-Tesla magnetic resonance imaging was unremarkable, including an evaluation of nigrosome-1 and neuromelanin imaging. Brain fluorodeoxyglucose-positron emission tomography showed normal glucose metabolism. There was decreased dopamine transporter density on the left putamen (more evident in the mid-

putamen, different from the posterior involvement usual of idiopathic Parkinson's disease). Such finding contrasted with the patient's bilateral symptoms, what could be attributed to microstructural changes in other brain pathways (Fig. 1).

Our patient clearly has akinetic-rigid parkinsonism. The abnormal dopamine transporter scan and levodopa improvement confirm the presynaptic nature of the parkinsonian syndrome. As the patient was neurologically normal prior to the COVID-19 infection, we conclude that SARS-CoV-2 infection is responsible for the parkinsonism. Méndez-Guerrero and colleagues<sup>1</sup> recently described another case of parkinsonism associated with COVID-19 affecting a critically ill patient with pleomorphic neurologic symptomatology.

Neurologic manifestations in COVID-19 most commonly described include headache, seizures, stroke, hyposmia, and altered mental status.<sup>2,3</sup> As they may occur regardless of respiratory symptoms, most likely there is direct viral neurotoxicity.<sup>4</sup> Since the outbreak of encephalitis lethargica in the 1920s,<sup>5</sup> an ever-growing number of viruses have been implicated in postencephalitic parkinsonism, including influenza, Epstein-Barr, West Nile, and Japanese encephalitis.<sup>6</sup> In contrast, the COVID-19 clinical and laboratory pictures of our patient do not suggest she had encephalitis. In parkinsonism associated with viral infections, neuropathology varies from direct acute infection to postinfectious neuroinflammation, both culminating with dopaminergic cell loss. SARS-CoV-2 might infect neurons in the central nervous system through either retrograde axonal transport or hematogenic routes.<sup>4</sup> Our patient probably had a direct SARS-CoV-2 lesion of the nigro-striatal system.<sup>7</sup>

In conclusion, we report a case of levodopa-responsive parkinsonism probably caused by direct SARS-CoV-2 infection, broadening the disease clinical spectrum. ■

**Acknowledgments:** We thank Dr. Alaor Barra Sobrinho, Director of Imagens Médicas de Brasília, for kindly giving support for nuclear medicine complementary exams.

Ingrid Faber, MD, PhD,<sup>1\*</sup> Pedro R.P. Brandão, MD,<sup>2</sup>  
Fiorella Menegatti, MD,<sup>3</sup>  
Diógenes D. de Carvalho Bispo, MD,<sup>1,4</sup>  
Fernando B. Maluf, MD,<sup>4</sup> and  
Francisco Cardoso, MD, PhD<sup>5</sup>

<sup>1</sup>University Hospital of Brasília, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>2</sup>Neuroscience and Behavior Lab, University of Brasília, Brasília, Brazil, <sup>3</sup>Nuclear Medicine Section, Imagens Médicas de Brasília, Brasília, Brazil, <sup>4</sup>Radiology Clinic, Santa Marta Hospital, Taguatinga, Brazil, and <sup>5</sup>Movement Disorders Unit, Internal Medicine Department, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

## References

- Méndez-Guerrero A, Laespada-García MI, Gómez-Grande A, et al. Acute hypokinetic-rigid syndrome following SARS-CoV-2 infection. *Neurology* [published online ahead of print July 8, 2020]. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000010282>.
- Munhoz RP, Pedrosa JL, Nascimento FA, et al. Neurological complications in patients with SARS-CoV-2 infection: a systematic review.

© 2020 International Parkinson and Movement Disorder Society

**Key Words:** SARS-CoV-2, CNS infection, parkinsonism, COVID-19, postinfectious parkinsonism

\*Correspondence to: Dr. Ingrid Faber, Departamento de Neurologia, Hospital Universitário de Brasília, Universidade de Brasília (UnB), Brasília 70.830-200, Brasil; E-mail: ingridfaber81@gmail.com

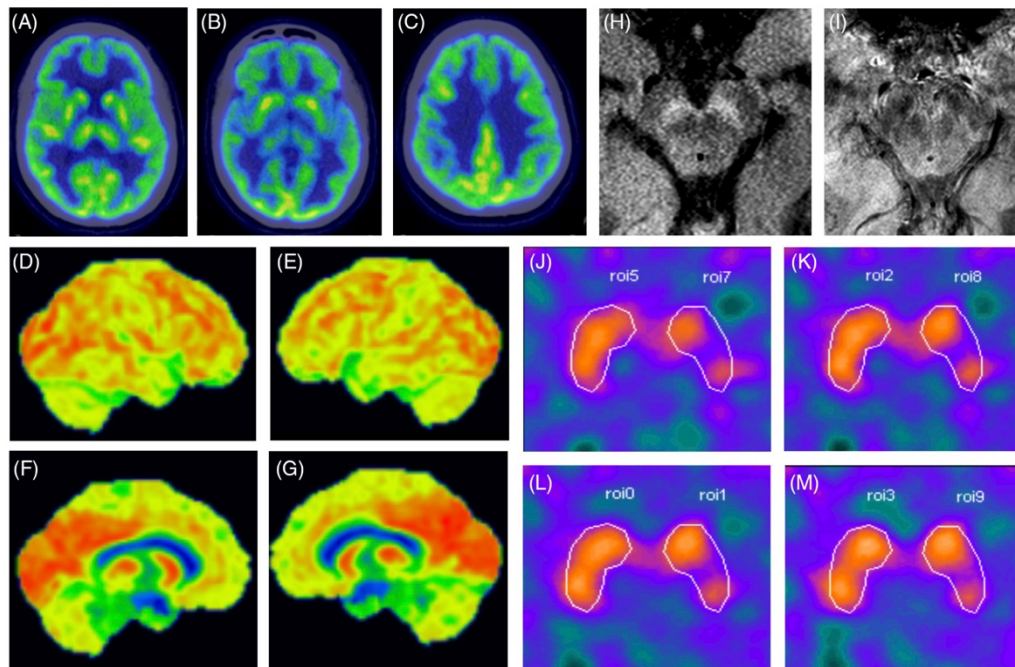
Ingrid Faber and Pedro R.P. Brandão contributed equally to this work.

**Relevant conflicts of interest/financial disclosures:** Nothing to report.

**Received:** 29 July 2020; **Revised:** 13 August 2020; **Accepted:** 17 August 2020

Published online 24 September 2020 in Wiley Online Library ([wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)). DOI: 10.1002/mds.28277





**FIG 1.** Comprehensive neuroimaging ancillary evaluation: fluorodeoxyglucose–positron emission tomography, neuromelanin and nigrosome-1 magnetic resonance imaging, and  $^{99m}\text{Tc}$ -TRODAT-1 (Technetium-99m labeled tropane derivative) single-photon emission computed tomography. **(A–C)** Fluorodeoxyglucose–positron emission tomography scan axial slices (through the thalamus, striatum, and corona radiata) show cerebral glucose metabolism within normal limits in the basal ganglia and cortical regions. **(D–G)** Three-dimensional stereotactic surface projection (3d-SSP) projection of the cortical radiotracer uptake to a lateral and medial surface perspective of both hemispheres shows normal glucose metabolism. **(H)** Normal neuromelanin content is seen in an axial magnetic resonance imaging slice of the midbrain through the substantia nigra. **(I)** Nigrosome-1 and its related “swallow-tail” sign are readily identifiable in both cerebral peduncles. **(J–M)** Nigrostriatal denervation at the left mid-putamen (semiquantification of dopamine transporter binding—0.60), contralateral to the most significant clinically affected side. The specific dopamine transporter binding potential in the basal ganglia is calculated as the difference between dorsal putamen activity (PUT) and the reference region, that is, the occipital activity (OA), divided by the OA:  $(\text{PUT}-\text{OA})/\text{OA}$ . [Color figure can be viewed at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com)]

- Arq Neuropsychiatr 2020;78(5):290–300. <https://doi.org/10.1590/0004-282x20200051>.
- Ellul MA, Benjamin L, Singh B, et al. Neurological associations of COVID-19. *Lancet Neurol* 2020;19(9):767–783. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30221-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30221-0).
  - Paniz-Mondolfi A, Bryce C, Grimes Z, et al. Central nervous system involvement by severe acute respiratory syndrome coronavirus-2 (SARS-CoV-2). *J Med Virol* 2020;92(7):699–702. <https://doi.org/10.1002/jmv.25915>.
  - Hoffman LA, Vilensky JA. Encephalitis lethargica: 100 years after the epidemic. *Brain* 2017;140(8):2246–2251. <https://doi.org/10.1093/brain/awx177>.
  - Limphaibool N, Iwanowski P, Holstad MJV, Kobylarek D, Kozubski W. Infectious etiologies of Parkinsonism: pathomechanisms and clinical implications. *Front Neurol* 2019;10:652. <https://doi.org/10.3389/fneur.2019.00652>.
  - Zubair AS, McAlpine LS, Gardin T, Farhadian S, Kuruvilla DE, Spudich S. Neuropathogenesis and neurologic manifestations of the coronaviruses in the age of coronavirus disease 2019: a review. *JAMA Neurol* 2020;77(8):1018–1027. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.2065>.

## Supporting Data

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.