

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PABLO ANDREI APPELT

ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO PADRONIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS EM PACIENTES COM SARS-COV-2

UBERABA

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO

PABLO ANDREI APPELT

ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO PADRONIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS EM PACIENTES COM SARS-COV-2

Dissertação dividida em 2 artigos apresentada ao Programa de Pós Graduação em Fisioterapia, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro em Associação com a Universidade Federal de Uberlândia, como cumprimento ao requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo José Luvizutto

UBERABA

2021

[

Catálogo na fonte:

Biblioteca da Universidade Federal do Triângulo Mineiro

A656e	<p>Appelt, Pablo Andrei Elaboração de um protocolo padronizado para avaliação das alterações neurológicas em pacientes com SARS-COV-2/ Pablo Andrei Appelt. -- 2021. 56 f. : il., graf., tab.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Fisioterapia) -- Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2021 Orientador: Prof. Dr. Gustavo José Luvizutto Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Luciane Aparecida Pascucci Sande de Souza</p> <p>1. Sistema nervoso. 2. SARS-CoV-2. 3. Manifestações neurológicas. 4. Mapeamento encefálico. 5. Cognição. I. Luvizutto, Gustavo José. II. Universidade Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 616.8:578.834</p>
-------	---

PABLO ANDREI APPELT

ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO PADRONIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS EM PACIENTES COM SARS-COV-2

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em em Fisioterapia, área de concentração “Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica” (Linha de Pesquisa: Processos de Avaliação e Intervenção Fisioterapêutica dos Sistemas Cardiorrespiratório e Neurológico), da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Fisioterapia.

Uberaba, 25 de agosto de 2021

Banca Examinadora:

Dr. Gustavo José Luvizutto – Orientador
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Luciane Aparecida Pascucci Sande de Souza
Universidade Federal do Triângulo Mineiro

Dra. Roberta Sessa Stilhando Yamaguchi
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

Documento assinado eletronicamente por **GUSTAVO JOSE LUVIZUTTO, Professor do Magistério Superior**, em 15/09/2021, às 15:59, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **LUCIANE APARECIDA PASCUCCI SANDE DE SOUZA, Professor do Magistério Superior**, em 22/09/2021, às 14:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



Documento assinado eletronicamente por **ROBERTA SESSA STILHANO YAMAGUCHI, Usuário Externo**, em 22/09/2021, às 15:38, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#) e no art. 34 da [Portaria Reitoria/UFTM nº 87, de 17 de agosto de 2021](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufm.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0566361** e o código CRC **8E8292AE**.

SUMÁRIO

ARTIGO 1	6
RESUMO	7
ABSTRACT	8
1.1 INTRODUÇÃO	9
1.2 METODOLOGIA	10
1.2.1 <i>Crerios de elegibilidade</i>	11
1.2.2 <i>Busca de dados e pesquisa</i>	11
1.2.3 <i>Seleção dos estudos</i>	11
1.2.4 <i>Extração de dados</i>	12
1.2.5 <i>Avaliação do Risco de Viés</i>	12
1.2.6 <i>Recomendação de Evidência</i>	13
1.2.7 <i>Síntese de Dados e Análise Estatística</i>	13
1.3 RESULTADOS	14
1.4 DISCUSSÃO	17
1.5 CONCLUSÃO	19
REFERÊNCIAS	19
ARTIGO 2	22
RESUMO	23
ABSTRACT	24
2.1 INTRODUÇÃO	25
2.2 OBJETIVOS	27
2.2.1 <i>Objetivo Geral</i>	27
2.2.2 <i>Objetivos Secundários</i>	27
2.3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
2.3.1 <i>Desenho do estudo</i>	28

2.3.2 Local de realização da pesquisa	28
2.3.3 População estudada	28
2.3.4 Critérios de elegibilidade	28
2.3.5 Procedimentos	29
2.3.6 Instrumentos para medição das variáveis	31
a) Avaliação da função cognitiva e neuropsiquiátrica	31
b) Avaliação da atividade elétrica cerebral.....	32
2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
2.5 RESULTADOS	36
2.5.1 Dados demográficos	36
2.5.2 Dados cognitivos ao longo do tempo	37
2.5.3 Dados de EEG ao longo do tempo	39
2.6 DISCUSSÃO	43
2.6.1 Eletroencefalograma	43
2.6.2 Função Cognitiva	46
2.6.3 Limitações	47
2.6.4 Implicações	48
2.9 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	48
ANEXOS	

CONTEXTUALIZAÇÃO

O presente trabalho consta de dois artigos. O artigo 1 tem como título Efeito da aplicação de células tronco na recuperação funcional da ataxia espinocerebelar: revisão sistemática e metanálise e o artigo 2 tem como título Elaboração de um protocolo padronizado para avaliação das alterações neurológicas em pacientes com SARS-Cov-2.

Os temas divergem entre si pois foram propostos previamente à pandemia por Coronavirus, sendo que o trabalho de intervenção, que seria com tema também relacionado à Ataxia Espinocerebelar, teve que ser substituído por outro que exigisse menos intervenções presenciais.

Por este motivo os temas apresentados são distintos, mas tal fato não interfere na importância e relevância dos mesmos.

ARTIGO 1

EFEITO DA APLICAÇÃO DE CÉLULAS TRONCO NA RECUPERAÇÃO FUNCIONAL DA ATAXIA ESPINOCEREBELAR: REVISÃO SISTEMÁTICA E METANÁLISE

Pablo Andrei Appelt¹, Kristin Comella², Luciane Aparecida Pascucci Sande de Souza³, Gustavo José Luvizutto³

1 – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

2 – Diretora Científica US Stem Cell Clinic, Weston, Flórida, Estados Unidos.

3 – Professores do Departamento de Fisioterapia Aplicada da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

Pablo Andrei Appelt

Fisioterapeuta. Especialista em Educação em Saúde para Preceptores do SUS

Departamento de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Federal do Triangulo Mineiro – UFTM

Endereço: Avenida Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia, 38025-180, Uberaba, Minas Gerais

E-mail: pabloandrei.appelt@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2681-4662>

RESUMO

Introdução: A ataxia espinocerebelar é uma doença neurodegenerativa hereditária caracterizada por alterações na marcha, equilíbrio e coordenação motora. Terapias com células tronco têm sido utilizadas como alternativa para retardar a evolução da doença. **Objetivos:** O objetivo desta revisão foi investigar se a aplicação de células tronco é segura e se produziu efeito na recuperação funcional em indivíduos com ataxia espinocerebelar. **Metodologia:** Os estudos incluídos nesta revisão investigaram a eficácia e segurança de um protocolo de aplicação de células tronco mesenquimais extraídas do cordão umbilical e de tecido adiposo. Dois estudos utilizaram via intratecal para aplicação e um estudo utilizou via intravenosa. **Resultados:** Os estudos mostraram melhora na pontuação das escalas ICARS (Escala Internacional Cooperativa de Classificação de Ataxia), ADL (Escala de Atividade de Vida Diária), BBS (Escala de Equilíbrio de Berg) e SARA (Escala de Avaliação e Classificação de Ataxia), mas sem significância estatística. **Conclusão:** Há necessidade de mais estudos com desenhos diferentes, maior tamanho amostral e controle de viés, para elucidação da melhor evidência disponível sobre os mecanismos envolvidos nessa terapêutica.

Palavras-chave: Ataxia espinocerebelar, células tronco, hereditária, mesenquimais, recuperação funcional.

ABSTRACT

Background: Spinocerebellar ataxia is a hereditary neurodegenerative disease characterized by changes in balance, locomotion and motor coordination. Stem cell therapies are currently being investigated as an alternative to delay the evolution of the disease. **Objectives:** The aim of this review was to investigate the safety and whether the application of stem cells produced an effect on functional recovery in individuals with spinocerebellar ataxia. **Methods:** The studies included in this review investigated the efficacy and safety of a protocol for the application of mesenchymal stem cells extracted from umbilical cord and adipose tissue. Two studies used intrathecal route for application and one study used intravenous route. **Results:** Studies have shown clinical improvement in the scores of the ICARS (International Cooperative Ataxia Rating Scale), ADL (Activities of Daily Living Scale), BBS (Berg Balance Scale) and SARA (Scale for the Assessment and Rating of Ataxia), but lacked statistical significance. **Conclusions:** Further studies are needed with different designs, largest sample sizes and placebo control, to fully understand anticipated outcomes of cellular therapy for spinocerebellar ataxia.

Key-words: spinocerebellar ataxia, stem cells, hereditary, mesenchymal, functional recovery.

1.1 INTRODUÇÃO

O termo ataxia é utilizado para denominar uma doença hereditária neurodegenerativa ou adquirida, com características genóticas e fenotípicas heterogêneas (SULLIVAN et al., 2019), além de alterações no tônus muscular, incoordenação motora e controle postural inadequado (AWAD et al., 2018). As ataxias espinocerebelares são causadas por alterações degenerativas no cerebelo. Atualmente existem 48 classificações (ILG et al., 2014; AMARANTE et al., 2017), sendo a ataxia espinocerebelar tipo III (SCA3), também denominada Doença de Machado Joseph a mais prevalente (MARTINS, et al., 2013). A prevalência é de 1-5/100.000, mas pode variar de acordo com o grupo geográfico e étnico (BUIJSEN, 2019).

Há grande variedade de manifestações clínicas nas ataxias espinocerebelares incluindo alterações na marcha, disartria, diminuição de reflexos tendinosos profundos, espasticidade, oftalmoplegia progressiva, sinais extrapiramidais incluindo distonia, rigidez e/ou bradicinesia, além de alterações do neurônio motor inferior, com fasciculações e amiotrofia, diminuição de sensibilidade, retração palpebral, perda de peso, distúrbios do sono e fadiga (MORO et al., 2014). O tratamento das doenças cerebelares degenerativas é um desafio devido a sua natureza progressiva que gera alterações neurológicas e funcionais importantes, além de gerar consequências negativas como quedas, imobilismo e redução da participação e do convívio social. (ZEIGELBOIM et al., 2013; LO et al., 2016).

Diversos tratamentos vêm sendo discutidos com objetivo de reduzir o impacto da doença na funcionalidade destes indivíduos, bem como postergar a degeneração do cerebelo. Dentre as opções terapêuticas, células tronco mesenquimais multipotentes vem sendo amplamente estudadas nessa população devido as propriedades imunomodulatórias e regenerativas (AULETTA et al., 2012). Estas células podem ser isoladas da medula óssea, tecido adiposo, placenta, timo, cordão umbilical e polpa dental, e vem sendo opção terapêutica para diversas doenças degenerativas, pois podem aumentar o suprimento exógeno de células capazes de promover neurogênese e efeitos modulatórios, estimulando a plasticidade e a diferenciação celular (BANG et al., 2005).

As terapias baseadas em células tronco representam uma nova estratégia terapêutica para ataxias espinocerebelares (ILG et al., 2014; WAGNER et al., 2016). Estudos pré-clínicos em modelos animais ou com células tronco pluripotentes induzidas, mostraram resultados positivos na redução da degeneração cerebelar, além de desacelerar a perda da função motora em ratos com ataxia espinocerebelar tipo 2 (Mao et al., 2015; Chang et al., 2011). Rocca et al. (2017) evidenciou atraso no início dos déficits locomotores e na degeneração dos neurônios sensitivos, e Huda et al. (2016) observou reparo tecidual das células de Purkinje e interneurônios cerebelares.

Além disso, neurotransplantes têm sido realizados em vários modelos com ratos mutantes usando diferentes tipos de células e técnicas para interromper ou postergar a degeneração das células de Purkinje e restaurar a arquitetura cerebelar normal (WAGNER et al., 2016). Estes estudos reforçam o empenho em pesquisas para gerar células tronco pluripotentes para indivíduos com doenças neurodegenerativas, como por exemplo, as IPS (*induced pluripotent stem cells*), apesar de ser ainda uma condição pouco explorada nos ensaios clínicos com humanos (MIGUIRE et al., 2019; SABAPATHY, 2016). Portanto, sabendo da escassez de estudos relacionando ataxia espinocerebelar e protocolos de aplicação clínica de células tronco, percebe-se a necessidade de maiores estudos para elucidação da melhor evidência disponível sobre os mecanismos envolvidos nesta terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar a literatura disponível sobre os efeitos de tratamentos com células tronco em pacientes com ataxia espinocerebelar e seu uso para reduzir déficits motores e promover funcionalidade.

1.2 METODOLOGIA

A revisão seguiu as recomendações descritas no *Cochrane Handbook for Intervention Reviews* (HIGGINS, 2011), e também segue os itens recomendados pelo protocolo de revisões sistemáticas, segundo o *checklist* (PRISMA) (MOTHER et al., 2015). Esta revisão foi registrada no Registro Internacional Prospectivo de Revisões Sistemáticas (PROSPERO) sob número de registro CRD42020179245.

1.2.1 Critérios de Elegibilidade

Os critérios de elegibilidade foram os seguintes:

- a) Participantes: pacientes com ataxia espinocerebelar com confirmação clínica e genética;
- b) Intervenções: protocolos de aplicação de células tronco;
- c) Controle: qualquer comparação;
- d) Desfechos: função motora, distúrbios de linguagem, distúrbios de motilidade ocular, qualidade de vida, equilíbrio e na marcha, além da segurança da intervenção.
- e) Desenho do estudo: ensaios clínicos randomizados, *quasi*-randomizados e não randomizados.

1.2.2 Busca de dados e pesquisa

Na busca virtual dos estudos, utilizamos as bases de dados PUBMED, SCIELO, OVID, CINAHL, WEB OF SCIENCE, SCIENCE DIRECT, SPRINGER, PEDRO, LILACS, SCOPUS e COCHRANE e CLINICAL TRIAIS até Agosto de 2020. A estratégia de busca foi: “*cerebellar degeneration*” ou MESH terms (*Medical Subjects Headings*) e “*stem cells*” ou MESH terms, nos idiomas inglês, português e espanhol.

Para identificar outros ensaios publicados, não publicados e ensaios em andamento, foi realizado:

- rastreamento das listas de referências dos estudos identificados;
- contato com autores dos estudos e especialistas, e
- utilizamos a estratégia de busca do *Science Citation Index* para rastrear artigos importantes.

1.2.3 Seleção dos estudos

Foram incluídos estudos com indivíduos diagnosticados com ataxia espinocerebelar sendo submetidos a tratamento com células tronco, apresentando desfechos como função motora, distúrbios de linguagem, distúrbios de motilidade

ocular, qualidade de vida, equilíbrio estático e na marcha, além da segurança do tratamento. Foram excluídos: artigos duplicados; revisões sistemáticas; artigos indisponíveis na íntegra, capítulos ou resumos; estudos experimentais; estudos de caso ou série de casos; caso-controle; estudos transversais; estudos de coorte e *off topics*. Dois pares de revisores examinaram independentemente todos os títulos e resumos identificados na pesquisa bibliográfica, obtiveram artigos completos de todos os estudos potencialmente elegíveis e os avaliaram quanto à elegibilidade. Os revisores resolveram as divergências por discussão ou, se necessário, com auxílio de um terceiro revisor. Também consideramos os estudos relatados apenas como resumos de conferências.

1.2.4 Extração de dados

Dois autores desta revisão avaliaram independentemente os dados dos estudos incluídos. As discrepâncias foram resolvidas por discussão entre os autores e utilizamos um formulário de extração de dados padrão. Foram delineadas as seguintes informações: características do estudo, participantes, intervenções e resultados (tipos de medidas de resultado e eventos adversos).

1.2.5 Avaliação do Risco de Viés

Dois autores avaliaram o risco de viés para cada estudo, e as discrepâncias foram resolvidas por meio de discussão e consulta a outro autor. O risco de viés foi avaliado de acordo com os seguintes domínios:

- Geração de sequência aleatória;
- Ocultação de alocação;
- Ocultação de participantes e profissionais;
- Ocultação da avaliação de resultados;
- Dados de resultados incompletos;
- Relatório de resultado seletivo;
- Outro viés.

Avaliamos o risco de viés para cada domínio como alto, baixo, ou incerto. Para dados com resultados incompletos em estudo individuais, estipulamos como baixo risco de viés para perda de *follow-up* menos que 10% e a diferença de menos de 5% em dados perdidos entre intervenção e grupo controle.

1.2.6 *Recomendação de Evidência*

Resumimos as evidências e avaliamos sua recomendação separadamente dos corpos da evidência de estudos clínicos randomizados e não-randomizados. Utilizamos o Sistema de Avaliação de Recomendações, Desenvolvimento e Avaliação (GRADE), metodologia para avaliar recomendação de evidência para cada resultado com alta, moderada, baixa ou muito baixa. O guia detalhado GRADE foi usado para avaliar o risco geral de viés, imprecisão, inconsistência, desvio do tema e viés de publicação e em resumir os resultados em um perfil de evidência. (Tabela 3) (GUYATT et al., 2008).

Planejamos avaliar o viés de publicação por meio da inspeção visual de gráficos de funil para cada resultado para o qual identificamos 10 ou mais estudos elegíveis; no entanto, não foi possível porque não havia estudos suficientes para realizar essa avaliação.

1.2.7 *Síntese de Dados e Análise Estatística*

Todos os resultados como variáveis contínuas foram analisados. Os resultados foram apresentados como média das diferenças (MD) e intervalos de confiança de 95%, usando modelos de efeitos fixos. Quando consideramos estudos suficientemente similares, conduzimos a metanálise agrupando dados apropriados. A variabilidade nos resultados entre os estudos foi verificada usando a estatística I^2 e o valor p para o teste qui quadrado de heterogeneidade fornecido pelo Review Manager. Além disso, o Review Manager (RevMan) (versão 5.3; Nordic Cochrane Center, Cochrane) foi usado para todas as análises. Devido ao pequeno número de estudos que foram identificados, os testes de sensibilidade (por exemplo, baixo versus alto risco de viés) não foram realizados, bem como análise de subgrupos.

1.3 RESULTADOS

Foram identificados 143 estudos, os quais 59 eram da base PUBMED, 62 da Bireme, 19 da Science Direct, 1 da Cochrane e 3 da Clinical Trials. Após a leitura de títulos e resumos, selecionou-se 27 estudos para análise de elegibilidade. Foram excluídos 24 estudos porque foram considerados um dos seguintes tipos de artigos: relato de caso ($n = 3$), série de casos ($n = 5$), estudo auto-controlado ($n = 4$), revisão ($n = 4$) ou *off topics* ($n = 8$). Foram selecionados 3 ensaios clínicos para análise e 2 para metanálise baseados em desfechos homogêneos. Os demais foram excluídos por se tratarem de estudos prospectivos, revisões da literatura e estudos transversais. O fluxograma a seguir, desenha o resultado obtido (Figura 1).

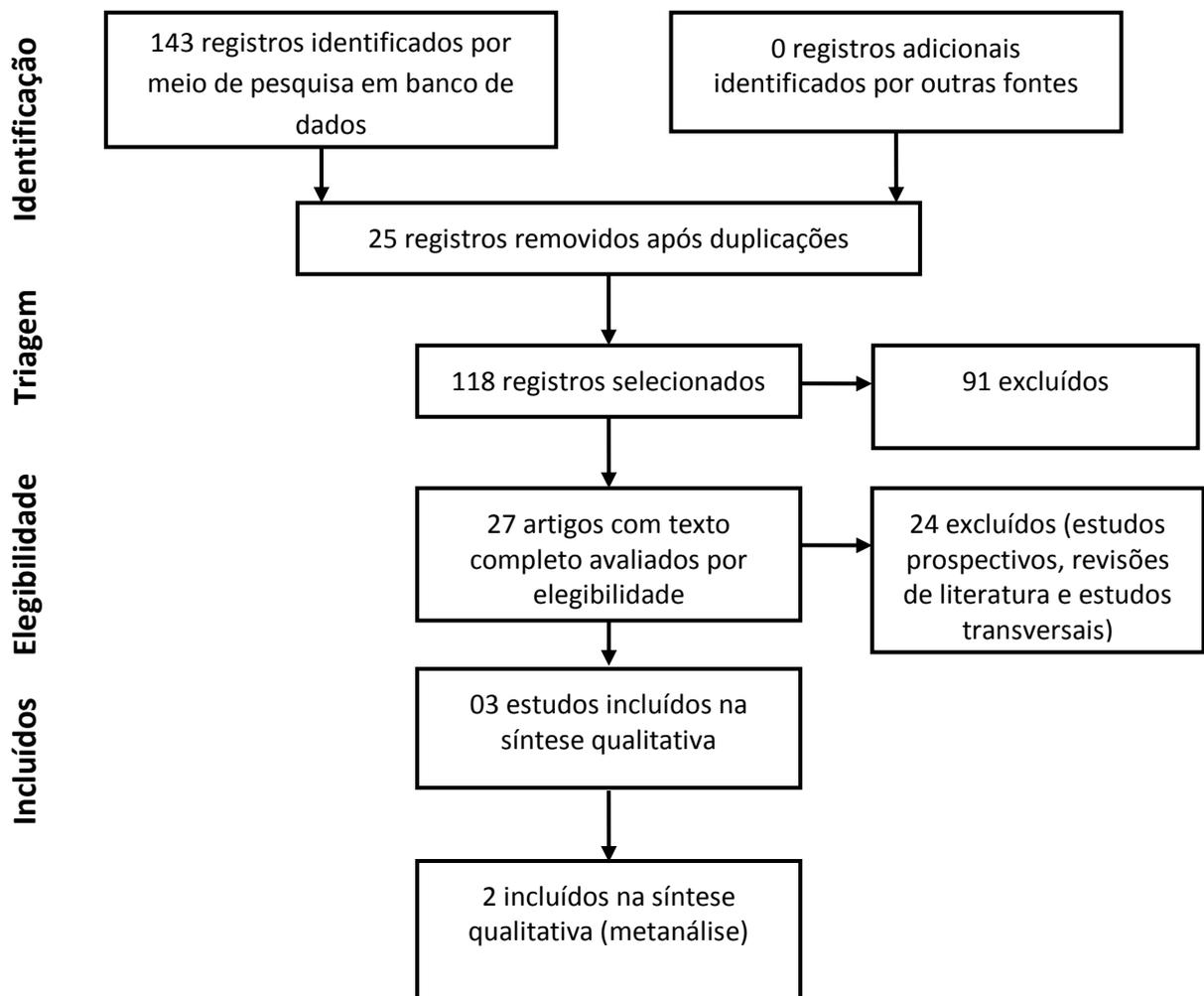


Figura 1. Fluxograma para seleção dos artigos.

A tabela 1 descreve as características principais e mais relevantes dos três artigos incluídos na revisão.

Tabela 1. Características dos estudos incluídos na revisão

Autores (ano)	Número de Participantes	Desenho do Estudo	País	Critérios de Inclusão	Critérios de Exclusão	Pontuação PEDro
Dongmei et al. (2011)	n = 24 2 grupos: SCA e MSA-C Idade: 46 anos	Ensaio clínico não-randomizado	China	SCA	Disfunção cardiopulmonar, renal e hepática, ou infecção sistêmica.	5 Pontos
Jin et al. (2013)	n = 16 Idade: 39,9 ± 10,2 anos	Ensaio clínico não controlado <i>open label</i>	China	SCA1, SCA2 ou SCA3, idade de 16 à 65 anos.	Disfunção cardiopulmonar, renal e hepática, ou infecção sistêmica; marcadores tumorais; pressão arterial > 180 /110 mmHg; gravidez ou amamentando.	6 Pontos
Tsai et al. (2017)	n = 7 Idade: 48,85 ± 14,75 anos	Ensaio clínico piloto <i>open label</i> /Fase I/IIa	Taiwan	SCA 3 ou MSA-C variando 10-20 na SARA	Outro ensaio com terapia celular a menos de 30 dias, teste de gravidez positivo.	5 Pontos

Legendas: SCA = Ataxia Espinocerebelar, MSA-C = Atrofia Cerebelar de Múltiplos Sistemas, SARA = Escala para Avaliação e Classificação da Ataxia. O diagnóstico de ataxia espinocerebelar em todos os estudos seguiu o padrão diagnóstico de Harding com confirmação molecular.

A tabela 2 descreve as intervenções, resultados e GRADE de cada estudo selecionado.

Tabela 2. Intervenções, resultados e GRADE dos estudos incluídos na revisão.

Autor/Ano	Intervenções	Resultados	GRADE
Dongmei et al., 2011	UCMSCs (1 x 10 ⁶ /kg; 10 mL) com 5 mg dexametasona foi injetado via intratecal semanalmente por 4 semanas por punções lombares, resultando em 4 injeções por 4 semanas.	ICARS = ↑ postura, distúrbios da marcha, coordenação, desordens na fala, motilidade ocular. ADL = ↑ habilidade de auto-cuidado.	⊕⊕⊕⊕ Baixa
Jin et al., 2013	UCMSCs(4 x 10 ⁷) em 30ml de solução salina fisiológica IV em 30 minutos e 3 tratamentos, 2 x 10 ⁷ em 30ml IV e 2 x 10 ⁷ em 1ml IT simultaneamente. 4 aplicações com uma semana de intervalo.	Depois da primeira aplicação de UCMSCs, 38% (6/16) ↑ BBS. De 3 a 6 meses 63% (10/16) ↑ BBS e houveram melhoras estatisticamente significantes em relação a linha de base. Após 1 ano 7/16 (44%) ↑ BBS sobre a linha de base, e somente 5/16 (31%) dos pacientes sofreram agravo da doença. ↑ ICARS no 3º e 6º mês.	⊕⊕⊕⊕ Baixa

Tsai et al., 2017	100 g de tecido adiposo foi colhido por liposucção da região abdominal de dois doadores saudáveis. As AD-MSC foram congeladas na concentração de 7×10^7 de células viáveis em 20 ml de solução para criopreservação. No dia da infusão, AD-MSCs descongeladas foram misturadas com 100 ml com solução salina normal e administradas IV em 40 min.	SARA = 13.25 no início do estudo, 13 nos primeiros 15 dias, 12.75 aos 6 meses, e retornaram a 13.5 aos 12 meses.	⊕⊕⊕⊕ Baixa
-------------------	--	--	---------------

Legendas: UCMSC: células estromais mesenquimais do cordão umbilical, ICARS: Escala Internacional Cooperativa de Classificação de Ataxia, ADL: Escala de Atividade de Vida Diária, IT: Intratecal, BBS: Escala de Equilíbrio de Berg, AD-MSCs: células tronco mesenquimais do tecido adiposo, IV: intravenoso, SARA: Escala para Avaliação e Classificação da Ataxia.

O risco de viés dos estudos incluídos está demonstrado na tabela 3.

Tabela 3. Classificação do Risco de Viés

Risco de Viés	Alto Risco	Baixo Risco	Risco Incerto
Geração de sequência aleatória	Dongmei et al., 2011 Jin et al., 2013 Tsai et al., 2017	Nenhum	Nenhum
Ocultação de alocação	Dongmei et al., 2011 Jin et al., 2013 Tsai et al., 2017	Nenhum	Nenhum
Cegamento dos participantes e profissionais	Dongmei et al., 2011 Jin et al., 2013 Tsai et al., 2017	Nenhum	Nenhum
Cegamento de avaliadores de desfecho	Nenhum	Dongmei et al., 2011 Jin et al., 2013	Tsai et al., 2017
Desfechos incompletos	Nenhum	Dongmei et al., 2011 Jin et al., 2013 Tsai et al., 2017	Nenhum

				Dongmei et al., 2011		
Relato de desfecho seletivo				Jin et al., 2013 Tsai et al., 2017		
	Nenhum					Nenhum

O desfecho avaliado na metanálise foi a pontuação da escala ICARS (Escala Internacional Cooperativa de Avaliação de Ataxia). Somente esta escala foi reportada em dois estudos, pois as outras variáveis são heterogêneas. Na figura 2 observamos que não há diferença estatisticamente significativa (MD = 8,36, 95% CI, 0,88, 17,60; $p = 0,08$) entre os grupos células tronco no baseline e follow-up nos dois estudos.

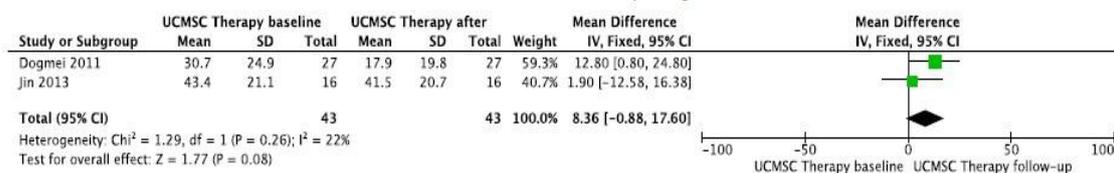


Figura 2: Metanálise dos estudos Dogmei, 2011 e Jin, 2013.

1.4 DISCUSSÃO

Com base nos resultados da metanálise observamos que não há diferença estatisticamente significativa na pontuação da escala ICARS antes e após aplicação de células tronco em indivíduos com ataxia espinocerebelar. Porém, houve melhora de 8,36 pontos na escala ICARS após a aplicação de células tronco. A escala ICARS foi desenvolvida por Trouillas et al. (2011) e compreende 19 itens, divididos em quatro sub-escalas: 1) distúrbios da postura e da marcha (itens 1-7, pontuação 0-34); 2) funções cinéticas (itens 8-14, pontuação 0-52); 3) distúrbios da fala (itens 15-16, pontuação 0-8); e 4) distúrbios oculomotores (itens 17-19, pontuação 0-6), juntamente com um teste funcional (espiral de Arquimedes). Winser et al. (2016), relata que a *Minimal Clinical Importance Difference* (MICD) da ICARS é de 2 pontos para comprovar melhora clínica e funcional. Baseado nesses achados, podemos inferir que os indivíduos com ataxia espinocerebelar submetidos a tratamento com

células tronco, mesmo sem resultados significantes na metanálise, apresentaram melhora clínica importante.

Por não se tratarem de ensaios clínicos randomizados, por não haver ocultação de alocação nem cegamento de participantes ou avaliadores e mesmo havendo relato sobre avaliadores de desfecho, justificativa de perda e exclusão de participantes e disponibilização dos protocolos, seguindo os critérios do sistema GRADE, observa-se uma recomendação de evidência baixa para uso de protocolo de células tronco em ataxia espinocerebelar. Nos trabalhos incluídos nesta revisão houveram desenhos de estudos heterogêneos e baixo tamanho amostral, que pode ser explicado pelo fato de ser uma doença rara, levando a um baixo número de participantes, influenciando, assim, nos resultados da metanálise. Se houverem estudos com desenhos diferentes dos estudos incluídos nesta revisão, como por exemplo, randomização, cegamento entre outros; a recomendação de evidência será maior.

Por meio desta revisão sistemática, pode se perceber a segurança de tratamentos envolvendo indivíduos com ataxia espinocerebelar que foram submetidos a tratamentos com células troncos, assim como outros tipos de ataxia, como atrofia cerebelar de múltiplos sistemas. Em todos os estudos os participantes das pesquisas não tiveram efeitos colaterais importantes.

Dentre as várias fontes para extração de células tronco, dois estudos utilizaram células provenientes de cordão umbilical (Dongmei et al., 2011, Jin et al., 2013) e um estudo utilizou células de tecido adiposo (Tsai et al., 2017). No estudo de Dongmei et al. (2011), houve melhora significativa nas escalas ICARS e ADL (*Activity of Daily Living Scale*), além de não existir efeitos adversos. Jin et al. (2013), também evidenciou melhora nas escalas ICARS e Escala de Equilíbrio de Berg, principalmente dos 3 aos 6 meses após aplicação de células tronco do cordão umbilical. Tsai et al. (2017) mostrou que aplicações com células oriundas do tecido adiposo, apresentam resultados pouco significativos quanto a sua eficácia, mas se mostraram seguros, avaliando os indivíduos com a escala SARA, posturografia e ressonância magnética.

Interessantemente, quando avaliamos os estudos separadamente, podemos constatar que houve melhoras nos parâmetros motores dos indivíduos com ataxia espinocerebelar submetidos à terapia com células tronco, mas quando avaliados na metanálise, o resultado foi influenciado pelo pequeno tamanho amostral, além disso,

sabendo da variabilidade de idade apresentada nos estudos incluídos e da diferença nas fontes de células utilizadas para cada procedimento, algumas questões ficam latentes para futuros trabalhos. Qual a diferença na eficácia do tratamento com células tronco em indivíduos com ataxia espinocerebelar em diferentes idades? Será que os resultados são similares em pessoas mais jovens e pessoas mais idosas? Células tronco extraídas de qual fonte têm melhor efeito? Quais células são mais eficientes, autólogas ou alógenas?

Esta revisão pode auxiliar futuras pesquisas, pois traz dados importantes referentes ao público alvo, tipo de células utilizadas, forma de aplicação, critérios de avaliação entre outros.

Há necessidade de mais pesquisas referentes a esta temática com desenhos criteriosos, como ensaios clínicos randomizados, cegos ou duplo cegos com maior tamanho amostral e menor risco de viés.

1.5 CONCLUSÃO

Houve baixa evidência na recomendação de terapia de células tronco em indivíduos com ataxia espinocerebelar, mas observou-se melhora clinicamente importante. Além disso, deve-se levar em consideração que os trabalhos incluídos nesta revisão apresentam riscos de viés e falhas metodológicas, e, portanto, recomenda-se a elaboração de ensaios clínicos de maior tamanho amostral e menores risco de viés para que conclusões futuras possam ser embasadas em pesquisas mais robustas.

REFERÊNCIAS

SULLIVAN, Roisin; YAU, Wai Y.; O'CONNOR, Emer; Houlden, Henry. Spinocerebellar ataxia: an update. **Journal of Neurology**, v. 266, p. 533-544.

SAFFIE AWAD, Paula; VIAL UNDURRAGA, Felipe; CHANA-CUEVAS, Pedro. Características clínicas de 63 pacientes con ataxia. **Rev. méd. Chile**, Santiago, v. 146, n. 6, p. 702-707, jun. 2018.

ILG, W.; BASTIAN, A. J.; BOESCH, S.; BURCIU, R. G.; CELNIK, P.; CLAAßEN, J.; FEIL, K.; KALLA, R.; MIYAI, I.; NACHBAUER, W.; SCHÖELS, L. Consensus Paper: Management of Degenerative Cerebellar Disorders. **Cerebellum**. v. 13, n. 2, p. 248–268, Abril 2014.

AMARANTE, Thiago R. P.; TAKEDA, Sibeles Y. M.; TIEVE, Hélio A. G.; ZONTA, Marise B. Impact of disease duration on functional status of patients with spinocerebellar ataxia type 2. **Arq. Neuropsiquiatr**, v. 75, n. 11, p. 773-777, 2017.

MARTINS, Camila P.; RODRIGUES, Érika de C.; OLIVEIRA, Laura A. S. de. Abordagem fisioterapêutica da ataxia espinocerebelar: uma revisão sistemática. **Fisioter. Pesq.**, Rio de Janeiro, v. 20, n. 3, p. 286-291, 2013.

BUIJSEN, Ronald A. M. et al. Genetics, Mechanisms, and Therapeutic Progress in Polyglutamine Spinocerebellar Ataxias. **Neurotherapeutics**. v. 16, p. 263–286, 2019.

MORO, Adriana et al. Ataxia espinocerebelosa tipo 3: subfenótipos em uma coorte de pacientes brasileiros. **Arq. Neuro-Psiquiatr.** São Paulo, v. 72, n. 9, p. 659-662, Set. 2014.

ZEIGELBOIM, B. S.; SOUZA, S. D. de; MENGELBERG, H.; TEIVE, H. A. G.; LIBERALESS, P. B. N. Reabilitação vestibular com realidade virtual na ataxia espinocerebelar. **ACR**. v. 18, n. 2, p. 143-147, Julho 2013.

LO, Raymond Y.; FIGUEROA, Karla P.; PULST, Stefan M.; PERLMAN, Susan; WILMOT, George; GOMEZ, Christopher; SCHMAHMANN, Jeremy; PAULSON, Henry; SHAKKOTAI, Vikram G.; YING, Sarah; ZESIEWICZ, Theresa; BUSHARA, Khalaf; GESCHWIND, Michael; XIA, Guangbin; YUM, Jui-Tsen; LEEM, Lue-Em; ASHIZAWA, Tetsuo; SUBRAMONY, SH; KUO, Sheng-HanKuo. Depression and Clinical Progression in Spinocerebellar Ataxias. **Parkinsonism RelatDisord**, v. 22, p. 87-92, Janeiro 2016.

AULETTA, Jeffery J.; BARTHOLOMEW, Amelia M.; MAZIARZ, Richard T.; DEANS, Robert J.; MILLER, Robert H.; LAZARUS, Hillard M.; COHEN, Jeffrey A. The potential of mesenchymal stromal cells as a novel cellular therapy for multiple sclerosis. **Future Medicine**. v. 4, n. 5, p. 529-547, 2012.

BANG, Oh Young; LEE, Jin Soo; LEE, Phil Hyu; LEE, Gwang. Autologous Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Stroke Patients. **Ann. Neurol**. v. 57, p. 874-882, 2005.

ILG, W.; BASTIAN, A. J.; BOESCH, S.; BURCIU, R. G.; CELNIK, P.; CLAABEN, J.; FEIL, K.; KALLA, R.; MIYAI, I.; NACHBAUER, W.; SCHÖELS, L. Consensus Paper: Management of Degenerative Cerebellar Disorders. **Cerebellum**. v. 13, n. 2, p. 248–268, Abril 2014.

WAGNER, Jacob L.; O’CONNOR, Deirdre M.; DONSANTE, Anthony; BOULIS, Nicholas M. Gene, stem cell and alternative therapy for SCA1. **Frontiers in Molecular Neuroscience**. V. 8, Agosto 2016.

MAO, Zhijuan; ZHANG, Suming; CHEN, Hong. Stem cell therapy for amiotrophyc lateral sclerosis. **Cell Regeneration**. v. 4, n. 11, 2015.

CHANG, You-Kang; CHEN, Ming-Hsiang; CHIANG, Yi-Hung; CHEN, Yu-Fan; MA, Wei-Hsien; TSENG, Chian-You; SOONG, Bing-Wen; HO, Jennifer H.; LEE, Oscar K. Mesenchymal stem cell transplantation ameliorates motor function deterioration of spinocerebellar ataxia by rescuing cerebellar Purkinje cells. **Journal of Biomedical Science**. v.18, n. 54, 2011.

ROCCA, Celine J.; GOODMAN, Spencer M.; DULIN, Jennifer N.; HAQUANG, Joseph H.; GERTSMAN, Ilya; BLONDELLE, Jordan; SMITH, Janell L. M.; HEYSER, Charles J.; CHERQUI, Stephanie. Transplantation of wild-type mouse hematopoietic stem and progenitor cells ameliorates deficits in a mouse model of Friedreich’s ataxia. **Sci Transl Med**. v. 9, n. 413, Outubro 2017.

HUDA, Fathul; FAN, Yiping; SUZUKI, Mamiko; KONNO, Ayumu; MATSUZAKI, Yasunori; TAKAHASHI, Nobutaka; CHAN, Jerry K. Y.; HIRAI, Hirokazu. Fusion of Human Fetal Mesenchymal Stem Cells with Degenerating Cerebellar Neurons in Spinocerebellar Ataxia Type 1 Model Mice. **Plos One**, Novembro, 2016.

MAGUIRE, Jean Ann; GAGNEA, Alyssa L.; GONZALEZ-ALEGREA, Pedro; DAVIDSON, Beverly L.; SHAKKOTTAID, Vikram; GADUEA, Paul; FRENCHA, Deborah L. Generation of Spinocerebellar Ataxia Type 2 induced pluripotent stem cell lines, CHOPi002-A and CHOPi003-A, from patients with abnormal CAG repeats in the coding region of the ATXN2 gene. **Stem Cell Research**. v. 34, 2019.

SABAPATHY, Vikran; SANJAY, Kumar. hiPSC-derived iMSCs: NextGen MSCs as an advanced

therapeutically active cell resource for regenerative medicine. **J. Cell. Mol. Med.** v. 20, n. 8, p. 1571-1588, 2016.

HIGGINS, J.P.T.; GREEN, S. Cochrane Handbook for Systematic Reviews and Interventions. Version 5.1.0. The Cochrane Colaboration, 2011.

MOHER, David; SHAMSEER, Larissa; CLARKE, Mike; GHERSI, Davina; LIBERATI, Alessandro; PETTICREW, Mark; SHEKELLE, Paul; STEWART, Lesley A.; PRISMA-P Group. Preferred reporting items for systematic review and meta-analysis protocols (PRISMA-P) 2015 statement. **Systematic Reviews.** v. 4, n. 1, 2015.

GUYATT, Gordon H.; OXMAN, Andrew D.; VIST, Gunn E.; KUNZ, Regina; FALCK-YTTER, Yngve; ALONSO-COELLO, Pablo; SCHÜNEMANN, Holger J. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. **BMJ**, v. 336, p. 924-926, Abril 2008.

DONGMEI, Han; JING, Liu; MEI, Xue; LING, Zhu; HONGMIN, Yan; ZHIDONG, Wang; LI, Ding; ZIKUAN, Guo; HENGXIANG, Wang. Clinical analysis of the treatment of spinocerebellar ataxia and multiple system atrophy-cerebellar type with umbilical cord mesenchymal stromal cells. **Cytotherapy.** v. 13, p. 913-917, 2011.

JIN, Jia-Li; LIU, Zhuo; LU, Zhen-Juan; GUAN, De-Ning; WANG, Chong; CHEN, Zhi-Bin; ZHANG, Jun; ZHANG, Wei-Yun; WU, Jia-Yong; XU, Yun. Safety and Efficacy of Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Therapy in Hereditary Spinocerebellar Ataxia. **Current Neurovascular Research.** v. 10, p. 11-20, 2013.

TSAI, Yun-An; LIU, Ren-Shyan; LIRNG, Jiing-Feng; YANG, Bang-Hung; CHANG, Chin-Hao; WANG, Yi-Chen; WU, Yu-Shan; HO, Jennifer Hui-Chun; LEE, Oscar K.; SOONG, Bing-Wen. Treatment of Spinocerebellar Ataxia With Mesenchymal Stem Cells: A Phase I/IIa Clinical Study. **Cell Transplantation.** v. 26, p. 503-512, 2017.

TROUILILLAS, P.; TAKAYANAGI, T.; HALLETT, M., CURRIER, R. D.; SUBRAMONY, S. H.; WESSEL, K. et al. International Cooperative Ataxia Rating Scale for pharmacological assessment of cerebellar syndrome. **J Neurol Sci**, v. 145, n. 2, p. 2045-2011, Fev. 1997.

WINSER, Stanley; SMITH, Catherine M.; HALE, Leigh A.; CLAYDON, Leica S.; WHITNEY, Susan L.; KLATT, Brooke; MOTTERSHEAD, John; ZAYDAN, Islam; HEYMAN, Rock. Psychometric properties of a core set of measures of balance for people with cerebellar ataxia secondary to multiple sclerosis. **Physical Medicine and Rehabilitation**, 2016.

ARTIGO 2

ELABORAÇÃO DE UM PROTOCOLO PADRONIZADO PARA AVALIAÇÃO DAS
ALTERAÇÕES NEUROLÓGICAS EM PACIENTES COM SARS-COV-2Pablo Andrei Appelt¹, Gustavo José Luvizutto²

1 – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Fisioterapia. Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

2 – Professor do Departamento de Fisioterapia Aplicada da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), Uberaba, Minas Gerais, Brasil.

Pablo Andrei Appelt

Fisioterapeuta. Especialista em Educação em Saúde para Preceptores do SUS

Departamento de Mestrado em Fisioterapia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM

Endereço: Avenida Frei Paulino, 30 - Bairro Abadia, 38025-180, Uberaba, Minas Gerais

E-mail: pabloandrei.appelt@gmail.com

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2681-4662>

RESUMO

Introdução: O SARS-CoV-2 tem um grande potencial inflamatório no SNC podendo alterar funções cognitivas, sensoriais e motoras. Estudos demonstram que pacientes diagnosticados com COVID-19 não apresentaram sintomas respiratórios típicos; em vez disso, exibiram apenas sintomas neurológicos (NeuroCOVID) ou ambos, assim como alterações no lobo frontal. **Objetivos:** Avaliar a atividade elétrica cerebral e a função cognitiva em pacientes com COVID-19 ao longo de 1 ano e buscar se há associação entre elas. **Metodologia:** Trata-se de um estudo de coorte prospectiva e epidemiológica de pacientes com SARS-Cov-2 na cidade de Uberaba com duração de 12 meses. Foram utilizadas as escalas de Ansiedade e Depressão, *Montreal Cognitive Assessment*, *Digit Span Test*, Eletroencefalograma em repouso e durante aplicação do *Trail Making Test* e *Box and Blocks Test* das áreas F7, F3, Cz, F4 e F8, com *follow-up* de 0-3 meses, 3-6 meses e 6-12 meses. Os dados foram considerados estatisticamente significante se $p < 0,05$. **Resultados:** Foi observada diminuição da capacidade cognitiva e da atividade cerebral na região frontal no período de 6-12 meses após a infecção por SARS-Cov-2 com correlação entre os resultados.

Palavras-chave: SARS-Cov-2, NeuroCOVID, eletroencefalograma, funções cognitivas, atividade cerebral.

ABSTRACT

Introduction: SARS-CoV-2 has a great inflammatory potential in the CNS and can alter cognitive, sensory and motor functions, negatively impacting functionality. Studies demonstrate that some patients diagnosed with COVID-19 do not have typical respiratory clinicians; instead, they exhibited only neurological symptoms (NeuroCOVID) or both. The electroencephalogram and the use of scales to assess cognitive function are important in investigating these symptoms. **Objectives:** To evaluate brain electrical activity and cognitive function in patients with COVID-19 over 1 year. **Methodology:** This is a prospective and epidemiological cohort study of patients with SARS-Cov-2 in the city of Uberaba, lasting 12 months. The work was divided into three stages: preparation and application of the electronic form, screening of participants and application of the neurological assessment protocol, with follow-up periods of 0-3 months, 3-6 months and 6-12 months. **Results:** The cognitive capacity and brain activity in the frontal region was reduced from 6 to 12 months after SARS-Cov-2 infection. .

Keywords: SARS-Cov-2, NeuroCOVID, electroencephalogram, cognitive functions, brain activity.

2.1 INTRODUÇÃO

A história recente da humanidade é composta por pandemias virais alastrantes, com grande impacto na saúde da população. O surto da doença de coronavírus 2019 (COVID-19) em Wuhan, na China, se espalhou rapidamente, com casos confirmados em vários países. Embora muitos detalhes, como a origem do vírus e sua capacidade de disseminação entre os indivíduos, permaneçam desconhecidos, confirmou-se número muito grande de casos e mortes em todo mundo (Li et al. 2020).

Os principais sinais/sintomas do COVID -19 incluem febre, tosse seca e fadiga (Huang et al. 2020). No entanto, alguns estudos demonstram que alguns pacientes diagnosticados com COVID-19 não apresentaram sintomas respiratórios típicos; em vez disso, exibiram apenas sintomas neurológicos iniciais, também denominados de NeuroCOVID (Mao et al. 2020). Evidências recentes mostram que uma série de sintomas pode permanecer após a eliminação da infecção aguda em muitas pessoas que tiveram covid-19, esta condição é conhecida como COVID Longa (Crook et al. 2021). Em um estudo recente com 214 pacientes com COVID-19, 78 (36,4%) pacientes apresentaram manifestações neurológicas, como dor de cabeça, tontura, doenças cerebrovasculares agudas e rebaixamento do nível de consciência (Mao et al. 2020). Desses 214 pacientes, 40 (18,7%) pacientes necessitaram de tratamento intensivo devido ao comprometimento neurológico grave.

Estudos sobre a patogênese da COVID-19 relatam que ele invade células epiteliais respiratórias humanas mediadas por proteínas S e receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), aumentando a probabilidade de induzir infarto e hemorragia cerebral. Além disso, a ECA 2 está espalhada por todo o cérebro, presente nos núcleos envolvidos na regulação da função cardiovascular no tronco encefálico, bem como em áreas não cardiovasculares, como o córtex motor, hipocampo e a raiz, sendo associada com aumento do fluxo sanguíneo cerebral, e aquisição de aprendizado e memória (XIA&LAZARTIGUES, 2008).

Muitos estudos têm utilizado esse exame com resultados mostrando ondas epileptiformes e alteração no formato das ondas frontais (GANALOPOULOU et al., 2020). A utilização de escalas cognitivas também é de extrema importância, pois estudos demonstram, além sintomas neurológicos prevalentes como delírio, comprometimento da orientação, afasia e distúrbios em nervos cranianos V e VII, em relação ao desempenho cognitivo, a maioria dos pacientes demonstrou comprometimento cognitivo com déficits principalmente em função executiva, atenção, linguagem e recordação atrasada. (ERMIS et al., 2021)

A COVID-19 pode alterar o padrão de conectividade funcional do cérebro humano, provocando disfunções cognitivas por meses após resolução da infecção. Pesquisadores avaliaram exames de ressonância magnética funcional de 86 voluntários que já haviam se curado há pelo menos dois meses. Em outra fase do estudo, após seis meses, 642 participantes relataram ainda sofrer com alterações de memória (54,2%), dificuldades de concentração (47%) e sintomas de ansiedade (41,9). (CRUNFLI, 2020; LU, 2020)

As alterações neurológicas decorrentes do SARS-CoV-2 podem ter impactos negativos na funcionalidade à longo prazo, seja por alterações do sistema nervoso central ou periférico. Existem poucos estudos que avaliam e acompanham os sintomas neurológicos à longo prazo com ferramentas objetivas de avaliação. O conhecimento atual sobre COVID-19 está em constante evolução, sendo que os aspectos neurológicos, clínicos e funcionais após a infecção ainda não foram estudados, e acreditamos que o monitoramento dos sintomas neurológicos compreendendo funções cognitivas e atividade cerebral podem esclarecer a evolução e impacto da SARS-CoV-2 na população.

Portanto, faz-se necessária a investigação padronizada dos sintomas neurológicos e cognitivos ao longo do tempo, para uma melhor compreensão da evolução da doença e para traçar condutas adequadas para seu tratamento.

A hipótese do presente trabalho é que o Covid-19 gere alterações neurológicas a curto, médio e longo prazo.

2.2 OBJETIVO(S)

2.2.1 Objetivo geral:

Avaliar a atividade elétrica cerebral em pacientes com COVID-19 ao longo de 1 ano.

2.2.2 Objetivos Secundários:

Avaliar a função cognitiva de pacientes com COVID-19 ao longo de 1 ano.

2.3 MATERIAIS E MÉTODOS

2.3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo de coorte prospectiva e epidemiológica de pacientes com SARS-Cov-2 na cidade de Uberaba com duração de 12 meses.

2.3.2 Local de realização da pesquisa

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biomecânica e Controle Motor (LABCOM) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, do Departamento de Fisioterapia da UFTM, em Uberaba, Minas Gerais.

2.3.3 População estudada

A população estudada foram 83 indivíduos (53 com infecção por SARS-Cov-2 e 20 sem infecção por SARS-Cov-2), pareados por sexo e idade acima de 18, recrutadas da comunidade em geral por meio de rádios de Uberaba, mídias digitais (Instagram, Facebook, Twitter e WhatsApp) e em todo âmbito da UFTM. Foram recrutados tanto participantes diagnosticados por meio de PCR quanto pelo teste rápido. Todos os participantes preencheram um TCLE virtual e com o aceite, o TCLE presencial. Este

estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro – UFTM (CAAE:30684820.4.0000.5154).

2.3.4 Critérios de elegibilidade

Critérios de inclusão: Participaram da pesquisa 53 indivíduos com infecção por SARS-CoV-2 que foram hospitalizados ou não, com capacidade cognitiva preservada e 30 indivíduos sem infecção por coronavírus pareados por sexo e idade, com idade acima de 18 anos, que aceitem a participar do estudo por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e apresentarem capacidade cognitiva preservada, sendo capazes de compreender e responder aos comandos e orientações para a realização dos testes e preenchimento dos formulários. Os acompanhamentos foram realizados após a alta hospitalar.

Critérios de exclusão: foram excluídas pessoas com alterações na capacidade cognitiva.

Descontinuidade da pesquisa: Indivíduos que não concluíram os testes propostos no momento da coleta ou a ocorrência de falha do equipamento durante a mesma.

2.3.5 Procedimentos

Após preenchimento de um formulário eletrônico, os indivíduos foram encaminhados para triagem, quando foi confirmado o diagnóstico, preenchido o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e aplicado o protocolo de avaliação neurológica.

Após a etapa de triagem, os indivíduos confirmados e incluídos foram encaminhados para aplicação do protocolo de avaliação neurológica. Esses pacientes não vieram de nenhum ambulatório de especialidade, a não ser que o médico responsável que soubesse da pesquisa achasse conveniente o acompanhamento do quadro neurológico. Todos os testes abaixo foram aplicados em três momentos pelo pesquisador principal e equipe de pesquisa durante 1 ano após o diagnóstico da doença, sendo eles: (a) dentro dos primeiros 3 meses após a alta hospitalar; (b) entre 3 e 6 meses após a alta hospitalar; (c) entre 6 meses a 1 ano após a alta hospitalar. Todos os pesquisadores do estudo foram treinados para cada item do protocolo, e todos os testes neurológicos foram realizados no LABCOM.

2.3.6 Instrumentos para medição das variáveis

a) Avaliação da função cognitiva e neuropsiquiátrica:

- Escala Hospitalar para Ansiedade e Depressão (HAD) é usada para determinar os níveis de ansiedade e depressão que um paciente está experimentando, sendo que acima de 8, o paciente apresenta considerável grau de ansiedade e depressão (BOTEGA et al. 1995).

- *Montreal Cognitive Assessment (MoCA)* (Nasreddine et al. 2005; Boyle et al. 2006) é um rápido instrumento de rastreio que foi desenvolvido e validado no Canadá para identificar pacientes com comprometimento cognitivo leve. O teste totaliza 30 pontos onde um escore de ≥ 26 indica normalidade e menor que 25 indica comprometimento cognitivo leve.

- Trail making test consiste em um teste com 25 círculos distribuídos em uma folha de papel, dividido em parte A (números) e parte B (números e letras). Deve ser

calculado o tempo que o indivíduo executa cada parte do teste por meio de um cronômetro digital.

- Digit Span Test: o teste é composto de quatorze séries para ordem direta e doze para inversa, havendo um aumento gradual da quantidade de dígitos em cada série. O participante tem duas chances para acertar a sequência de números que são repetidos com intervalo de 1 segundo. O resultado bruto máximo na ordem direta é de 90 pontos enquanto na ordem inversa é de 66 pontos.

b) Avaliação da atividade elétrica cerebral: Foi avaliada por meio de eletroencefalografia (EEG) utilizado o sistema internacional 10-20, para a colocação de eletrodos, que é realizado em intervalos específicos ao longo da cabeça criando locais que dividem o crânio em proporções de 10% ou 20% do comprimento das distâncias entre os pontos de referência (linha média nasal e occipital) (Jasper, 1936). Neste estudo foram escolhidos quatro pontos (Figura 1). Os eletrodos foram colocados sobre os locais de representações das áreas frontais (F3-F7, Cz-F3, Cz-F4 e F4-F8); além do eletrodo de aterramento em Fpz no lóbulo da orelha. O EEG foi coletado dos indivíduos durante 4 tarefas: 1) em repouso; 2) realizando uma tarefa motora de coordenação denominada Box and Blocks Test; 3) realizando uma tarefa cognitiva denominada Trail Making Test parte A; 4) realizando uma tarefa cognitiva denominada Trail Making Test parte B, descrita anteriormente. Cada tarefa foi realizada em uma sala simples, preservando o posicionamento adequado de cada indivíduo em relação à cadeira e à mesa. Após a coleta, os dados foram extraídos utilizando o programa R, exportados para Excel e filtrados offline.

A etapa de processamento e análise de dados foi realizada em linguagem R. No estudo, objetivou-se analisar os sinais EEG em relação a variações na amplitude e frequência. Dessa forma, as principais etapas adotadas são apresentadas na Figura 1.

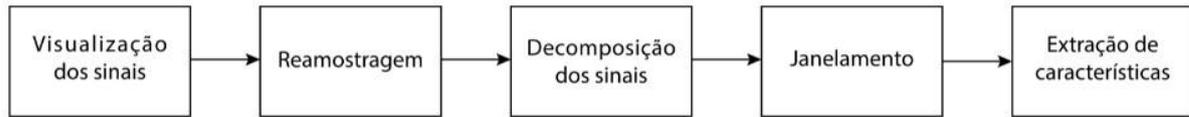


Figura 1. Diagrama de blocos descrevendo as etapas de análise e processamento dos sinais.

Inicialmente, os sinais foram visualizados para cada canal. Ao todo, foram analisados 16 canais referentes aos sinais EEG de diferentes regiões no escalpo de quatro cenários distintos. Em seguida, os sinais foram reamostrados à 200 Hz.

O método de Decomposição de Modo Empírico (EMD) foi utilizado para decompor os sinais em componentes. As Funções de Modo Intrínseco (IMFs) do método foram estimadas por meio do algoritmo de Decomposição Completa do Modo Empírico do Conjunto com Ruído Adaptativo (CEEMDAN). Dessa forma, foram estimadas 11 IMFs e uma componente residual para cada um dos sinais a fim de obter informações sobre as componentes fundamentais que constituem os sinais de EEG.

Os sinais referentes a cada IFM foram janelados, considerando janelas retangulares de 1 (um) segundo com sobreposição de 50%. Para cada janela, características sensíveis à alteração da amplitude e variabilidade foram extraídas. Assim, as principais características estimadas foram:

- **Valor Absoluto Médio (MAV):** Esta característica é capaz de representar as alterações na amplitude do sinal, uma vez que é sensível à ordem de magnitude do sinal [1]. O MAV pode ser definido como

$$MAV = \frac{1}{N} \sum_{i=1}^N |x_i|, \quad (1)$$

em que N corresponde ao número de amostras do sinal e x_i corresponde a i -ésima amostra.

- **Coeficiente de Variação (CV):** Esta característica é capaz de expressar a

- dispersão das amostras em relação à média. Quanto maior o valor do CV ($CV \rightarrow 1$), maior será a distribuição das amostras em relação à medida de tendência central e, portanto, mais heterogêneo será o sinal em relação à média. O CV pode ser definido como

$$CV = \frac{\sigma}{\mu}, \quad (2)$$

em que σ corresponde ao desvio-padrão e μ corresponde à média.

- **Taxa de cruzamento por zero (zcr):** Esta característica é capaz de estimar as mudanças na trajetória do sinal entre ciclo negativo e positivo. Portanto, permite captar a frequência de oscilação do sinal. A zcr pode ser expressa por

$$zcr = \frac{0.5}{N} \sum_{i=1}^N |\text{sign}(x_{i+1}) - \text{sign}(x_i)|, \quad (3)$$

em que

$$\text{sgn}(x_i) = \begin{cases} 1, & \text{se } x_i \geq 0 \\ -1, & \text{se } x_i < 0 \end{cases}.$$

- **Variância (σ^2):** Esta característica é capaz de representar a variabilidade do sinal. A variância permite verificar o quanto os dados se distribuem em relação à média. Em 1970, Hjorth propõe parâmetros que permitem interpretar sinais EEG no domínio da frequência por meio de características definidas no domínio temporal. Dentre elas, ele define o parâmetro atividade como sendo a variância, definida em (4), e representando a potência do sinal no domínio da frequência.

$$\sigma^2 = \frac{1}{N-1} \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2. \quad (4)$$

- **Mobilidade (mob):** Esta característica, proposta por Hjorth, é definida como em (5) e representa a frequência média do sinal.

$$mob = \frac{\sigma_d}{\sigma}, \quad (5)$$

em que σ_d corresponde ao desvio-padrão da derivada discreta de primeira ordem.

- **Complexidade (comp):** Esta característica, proposta por Hjorth, é definida como em (6) e representa a mudança de frequência do sinal. A complexidade dá uma estimativa da largura de banda do sinal, verificando a semelhança da forma de onda do sinal com uma onda senoidal pura.

$$comp = \frac{\sigma_{dd}/\sigma_d}{\sigma_d/\sigma}. \quad (6)$$

em que σ_{dd} corresponde ao desvio-padrão da derivada discreta de segunda ordem.

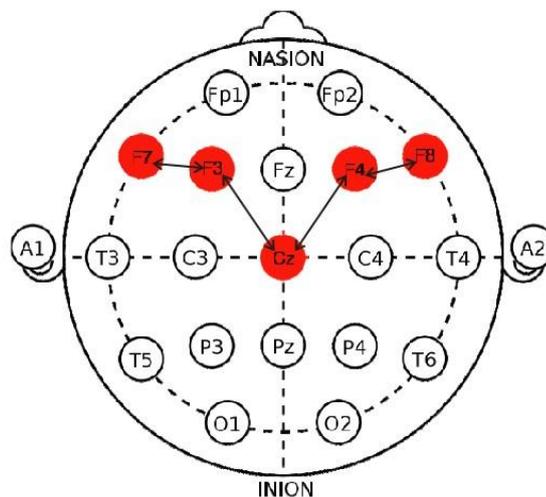


Figura 2. Esquema de posicionamento dos eletrodos.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade dos dados foi analisada por meio do teste de *Shapiro-Wilk*. Os dados demográficos contínuos foram descritos em mediana e intervalos e os categóricos em porcentagem. A comparação dos dados demográficos contínuos foi realizada por meio do teste de Mann-Whitney e os categóricos pelo teste qui-quadrado. As variáveis cognitivas (HAD, MOCA, TMT-A, TMT-B, DSTFN, DSTBN, DSTFL, DSTBL) e os dados de EEG (atividade, mobilidade e complexidade) das áreas frontais (F3-F7, Cz-F3, Cz-F4 e F4-F8) de ambos os grupos foram comparados por análise de efeitos mistos, com a correção de Geisser-Greenhouse. O teste de comparação múltipla de Tukey, com variâncias individuais foram calculadas para cada comparação. Os dados foram considerados estatisticamente significante se $p < 0,05$ e analisados no software *Prism 8.0*.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Dados demográficos

Os dados clínicos e demográficos estão demonstrados na tabela 1.

Tabela 1. Dados Epidemiológicos

	COVID-19 (n = 53)	Controle (n = 30)	p
Idade ¹	42,29 (25-69)	37,89 (21-55)	0,784
Sexo ²			
Masculino	16 (30,2%)	8 (26,7%)	
Feminino	37 (69,8%)	22 (73,3%)	0,678
IMC ¹	27,80 (19,2-46,0)	26,43 (20,8-34,8)	0,367
Anos de Estudo ¹	14,27 (8-21)	14,86 (10-22)	
Comorbidades ²	21 (39,62%)	6 (20%)	0,062

Hospitalizações	4 (7,54%)	-
UTI	1 (1,88%)	-
Intubação	1 (1,88%)	-
PCFS	1,54 (0-3)	-

1 – Mann-Whitney; 2 – qui-quadrado

Legendas: IMC = Índice de Massa Corporal, UTI = Unidade de Terapia Intensiva, PCFS = Escala de Funcionalidade pós-Covid-19.

2.5.2 Dados cognitivos ao longo do tempo

Foi observada diferença estatisticamente no modelo de efeito misto nos dados cognitivos (F (DFn, DFd) [F (1.767, 22.97) = 1,52]; p = 0,03). No teste de comparação múltipla foi observado aumento do tempo no teste TMT-A no grupo COVID-19 no período de 6-12 meses comparado ao grupo controle (MD: -8,1; IC95% -16,1 a -0,1; p = 0,041).

Tabela 2. Dados cognitivos grupo controle e COVID-19

	Controle		COVID-19		
		0-3 meses	3-6 meses	6-12 meses	
HAD	10,0 (1,0 – 18,0)	11,5 (1,0 – 21,0)	11,5 (5,0 – 21,0)	9,0 (2,0 – 21,0)	
MOCA	25,0 (17,0 – 30,0)	25,0 (20,0 – 30,0)	26,0 (23,0 – 30,0)	26,0 (11,0 – 29,0)	
TMT-A	26,8 (17,6 – 47,1) ^a	30,8 (18,1 – 48,7)	28,3 (17,8 – 53,7)	32,7 (20,6–120,7) ^a	
TMT-B	64,6 (36,7 – 155,2)	64,4 (48,1 – 114,1)	67,7 (45,4 – 188,6)	76,5 (37,3 – 207,5)	
DSFN	29,0 (11,0 – 49,0)	36,0 (10,0 – 75,0)	28,5 (13,0 – 64,0)	41,5 (14,0 – 72,0)	
DSBN	17,0 (8,0 – 34,0)	21,0 (2,0 – 41,0)	17,0 (8,0 – 33,0)	17,5 (14,0 – 72,0)	
DSFL	7,0 (4,0 – 10,0)	9,0 (3,0 – 13,0)	7,0 (3,0 – 12,0)	9,0 (4,0 – 13,0)	
DSBL	5,0 (3,0 – 8,0)	6,0 (1,0 – 9,0)	5,0 (3,0 – 9,0)	5,0 (1,0 – 8,0)	

Legendas: HAD = Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão, MOCA = Montreal Cognitive Assessment, TMT-A = Trail Making Test A, TMT-B = Trail Making Test B, DSFN = Digit Span Forward Numbers, DSBN = Digit Span Backward Numbers, DSFL = Digit Span Forward Lines, DSBL = Digit Span Backward Lines.

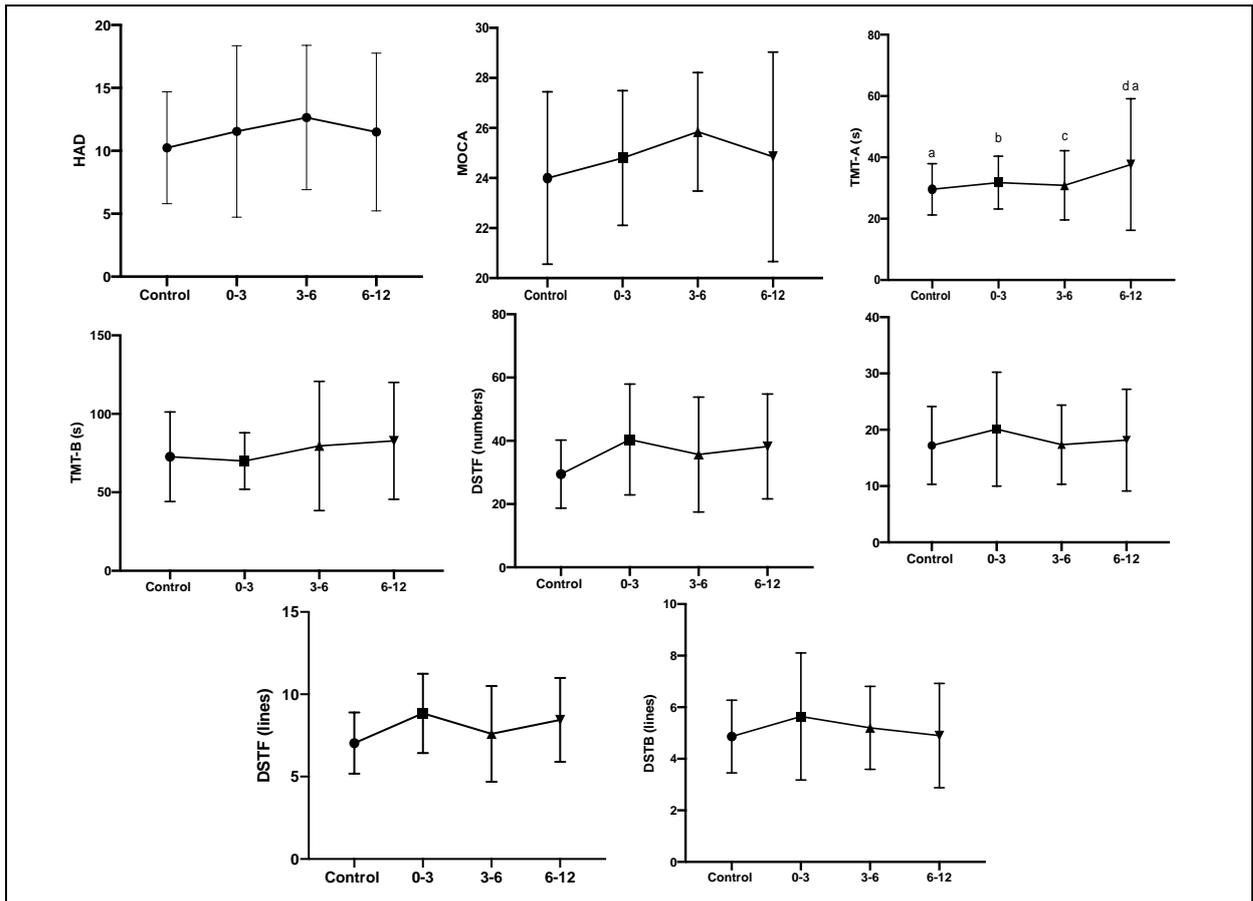


Figura 3. Dados cognitivos grupo controle e Covid-19

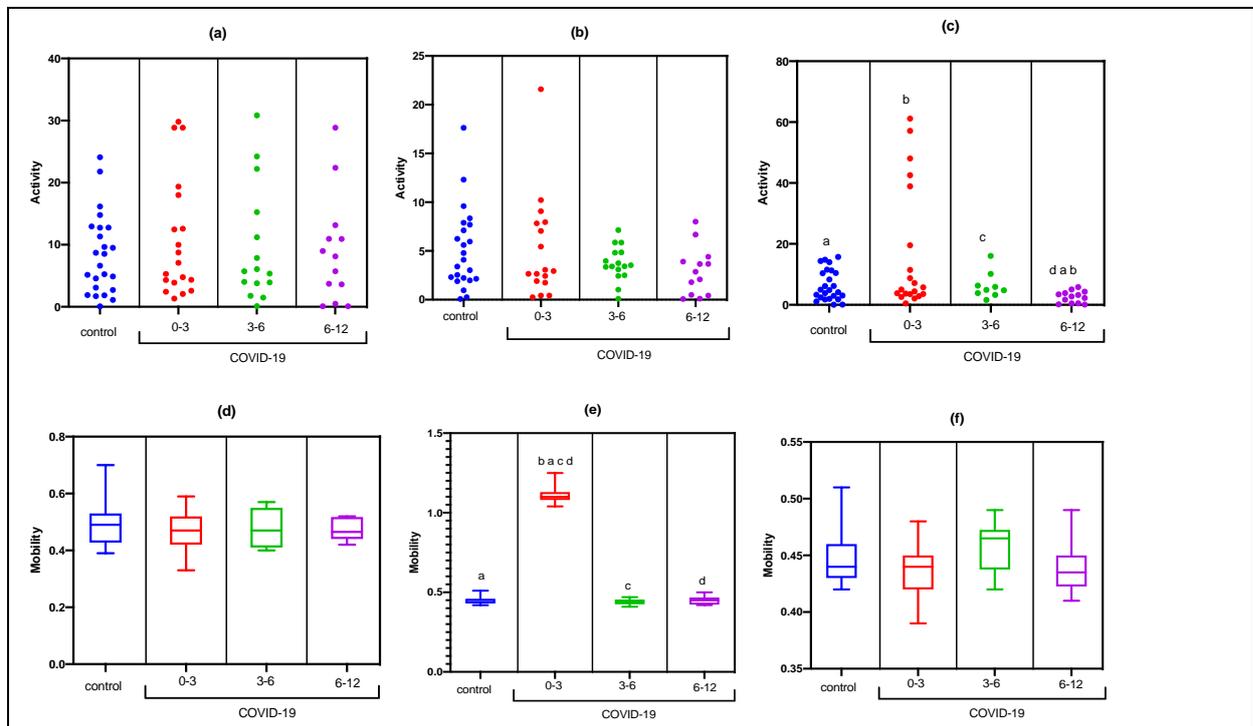
Legendas: HAD = Escala Hospitalar de Ansiedade e Depressão, MOCA = Montreal Cognitive Assessment, TMT-A = Trail Making Test A, TMT-B = Trail Making Test B, DSFN = Digit Span Forward Numbers, DSBN = Digit Span Backward Numbers, DSFL = Digit Span Forward Lines, DSBL = Digit Span Backward Lines.

2.5.3 Dados de EEG ao longo do tempo

Para o canal F3-F7 foi observada diferença estatisticamente no modelo de efeito misto nos dados de atividade durante a tarefa TMT-B ($F [3,0, 23,61] = 5,89$); $p = 0,003$), de mobilidade durante a TMT-A ($F [3,0, 51,94] = 2307$); $p < 0,001$), complexidade no repouso ($F [3,0, 34,03] = 7,01$); $p = 0,0008$), e durante a TMT-A ($F [3,0, 66,77] = 11,52$); $p = < 0,0001$).

No teste de comparação múltipla observa-se que houve redução da atividade de F3-F7 durante o TMT-B no grupo COVID-19 aos 6-12 meses comparada com grupo controle (MD: 3,8; IC95% 0,32 a 7,27; $p = 0,01$) e comparada com COVID-19

de 0-3 meses (MD: 14,04; IC95% -0,71 a 28,8; $p = 0,03$). Houve aumento da mobilidade em F3-F7 de 0-3 meses no grupo COVID-19 durante o TMT-A em comparação com o grupo controle (MD: -0,65; IC95% -0,69 a -0,62; $p < 0,0001$) e em comparação com os demais períodos de avaliação do grupo COVID 3-6 meses (MD: 0,66; IC95% 0,63 a 0,70; $p < 0,001$) e 6-12 meses (MD: 0,65; IC95% 0,62 a 0,69; $p < 0,001$). Houve redução da complexidade do sinal em F3-F7 no repouso no grupo COVID-19 aos 6-12 meses comparada ao grupo controle (MD: 2,82; IC95% 1,35 a 4,29; $p < 0,001$) e com COVID-19 aos 0-3 meses (MD: 2,51; IC95% 1,01 a 4,01; $p = 0,0002$). Houve aumento da complexidade do sinal em F3-F7 durante o TMT-A no grupo COVID-19 aos 6-12 meses comparada ao grupo controle (MD: -0,05; IC95% -0,11 a -0,001; $p = 0,02$) e com COVID-19 0-3 meses (MD: -0,10; IC95% -0,16 a -0,05; $p = 0,001$).



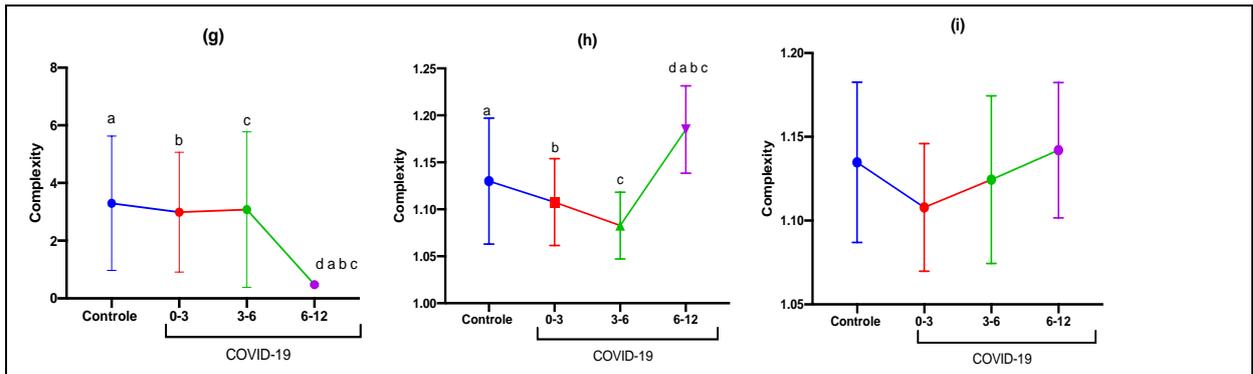
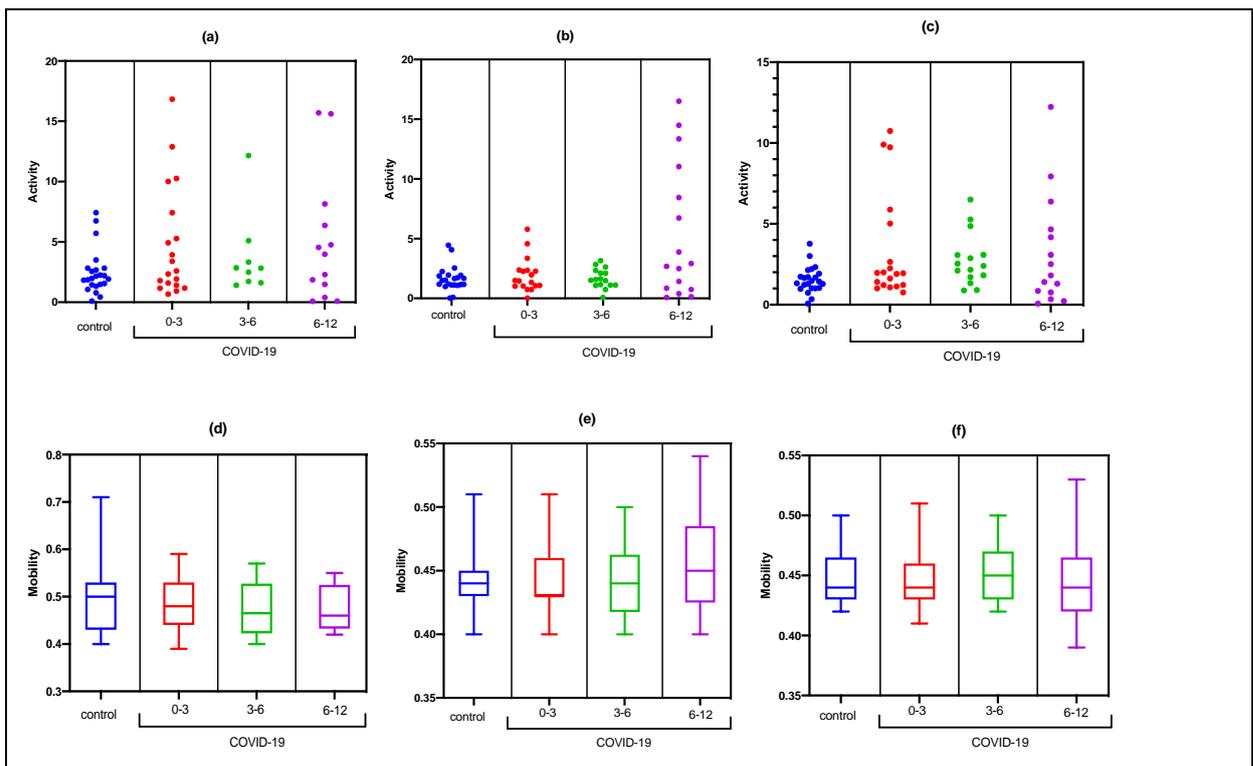


Figura 4. Propriedades estatísticas usadas no processamento de sinais no domínio do tempo do canal Cz-F3 no grupo controle (assintomático) e grupo COVID-19. (a) Atividade de Cz-F3 no repouso; (b) Atividade de Cz-F3 durante o TMT-A; (c) Atividade de Cz-F3 durante a TMT-B; (d) Mobilidade de Cz-F3 no repouso; (d) Mobilidade de Cz-F3 no TMT-A; (d) Mobilidade de Cz-F3 no TMT-B; (d) Complexidade de Cz-F3 no repouso; (d) Complexidade de Cz-F3 no TMT-A; (d) Complexidade de Cz-F3 no TMT-A.

Não houve diferenças no modelo de efeito misto para atividade, mobilidade e complexidade durante o repouso e tarefas cognitivas (TMT-A e TMT-B) nos canais Cz-F3.



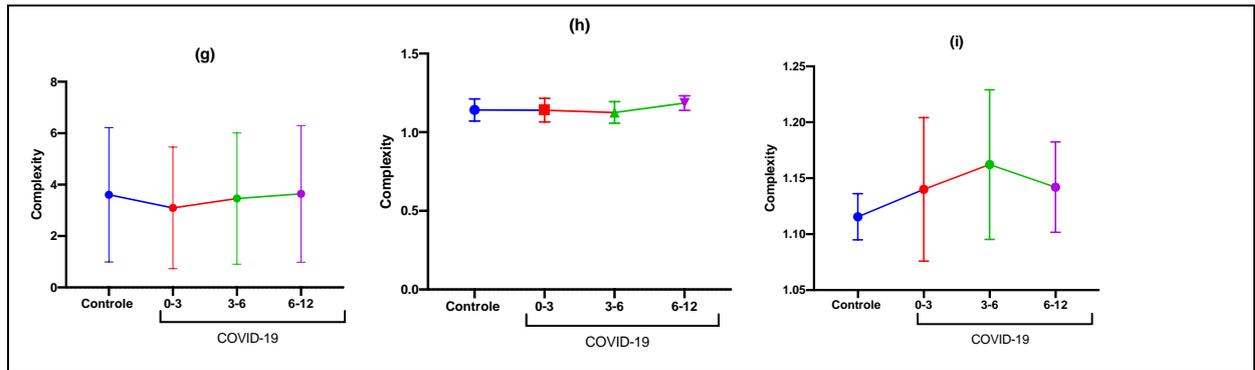
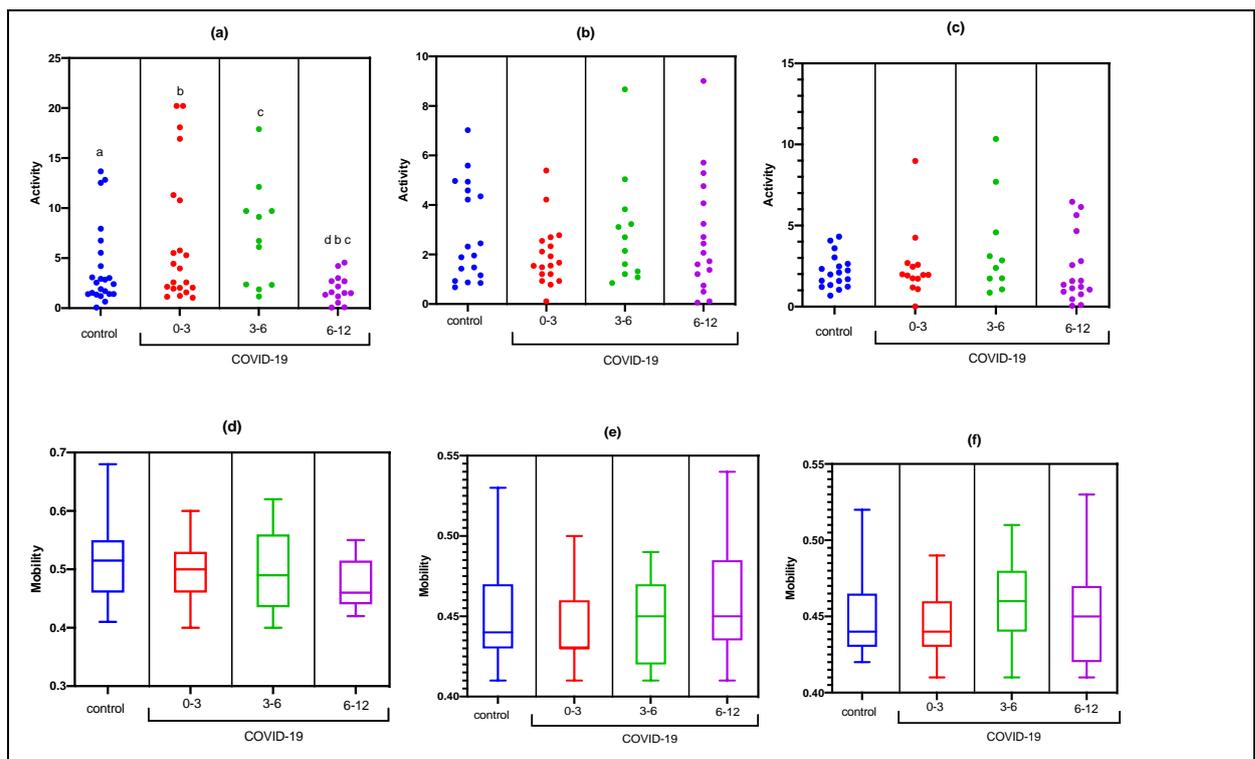


Figura 5. Modelo de efeito misto para atividade, mobilidade e complexidade durante o repouso e tarefas cognitivas (TMT-A e TMT-B) nos canais Cz-F3.

Houve diferença estatisticamente significativa na atividade de Cz-F4 durante o repouso ($F(3, 65) = 3,737$; $p = <0,0001$). No teste de comparação múltipla observou-se que a redução da atividade de Cz-F4 ocorreu no repouso de 6 a 12 meses do grupo pós-COVID comparado com o período de 0 a 3 (MD: 4,76; IC95% 0,33 a 9,19; $p = 0,03$) e o período de 3 a 6 (MD: 5,25; IC95% 0,08 a 10,43; $p = 0,042$).



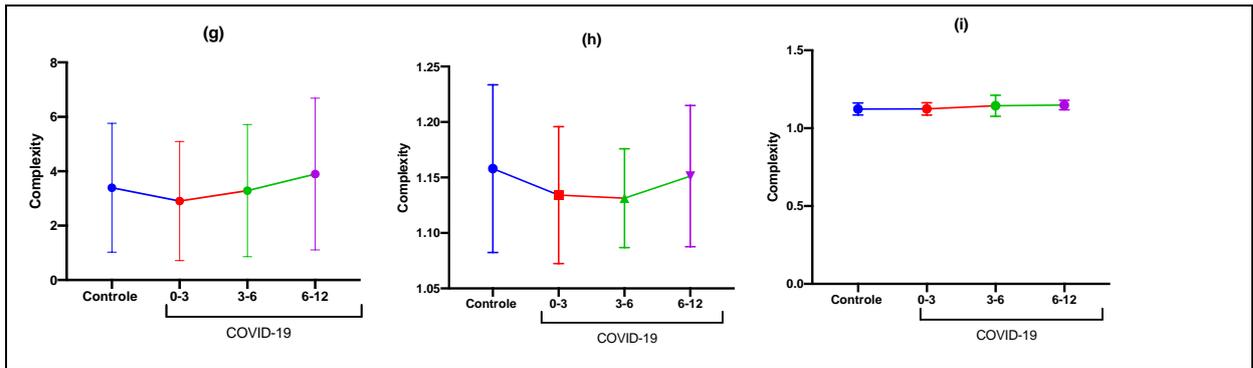
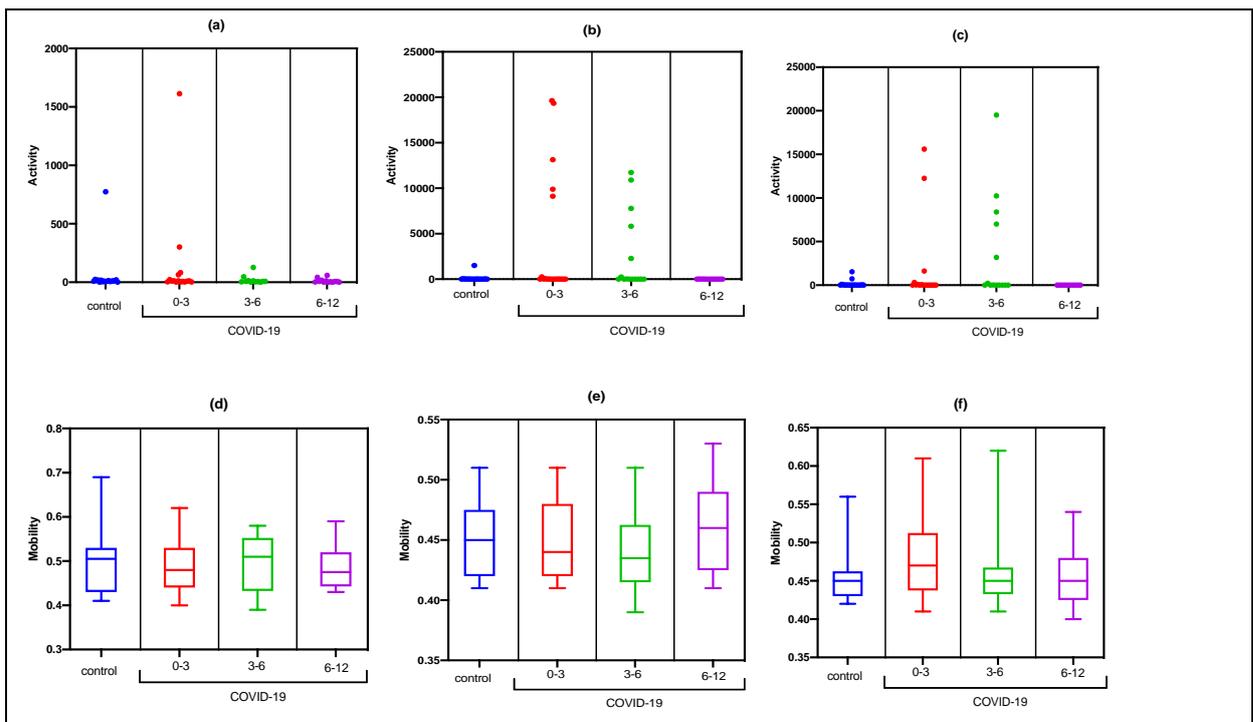


Figura 6. Propriedades estatísticas usadas no processamento de sinais no domínio do tempo do canal Cz-F4 no grupo controle (assintomático) e grupo COVID-19. (a) Atividade de Cz-F4 no repouso; (b) Atividade de Cz-F4 durante o TMT-A; (c) Atividade de Cz-F4 durante a TMT-B; (d) Mobilidade de Cz-F4 no repouso; (e) Mobilidade de Cz-F4 no TMT-A; (f) Mobilidade de Cz-F4 no TMT-B; (g) Complexidade de Cz-F4 no repouso; (h) Complexidade de Cz-F4 no TMT-A; (i) Complexidade de Cz-F4 no TMT-B.

Não houve diferenças na atividade, mobilidade e complexidade no repouso ou durante atividades cognitivas entre os grupos no canal F4-F8 (Figura 7).



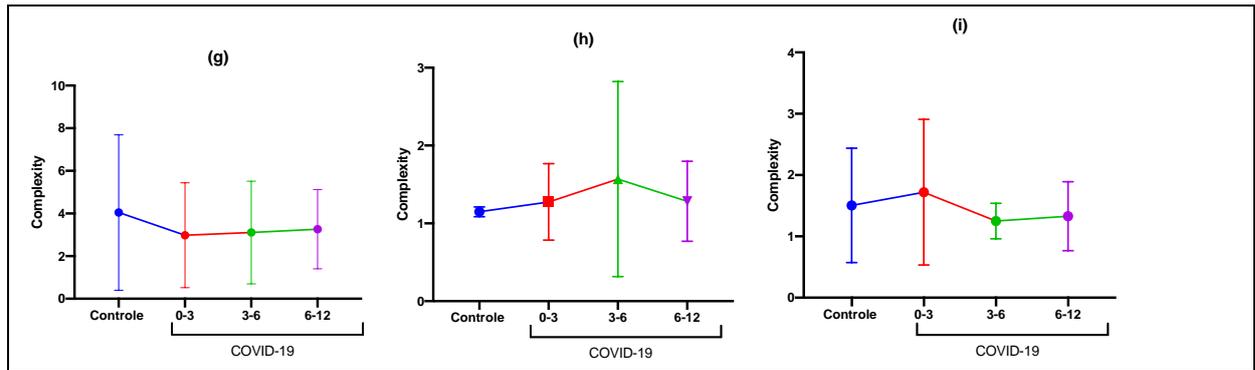


Figura 7. Atividade, mobilidade e complexidade no repouso ou durante atividades cognitivas entre os grupos no canal F4-F8.

2.6 DISCUSSÃO

Baseado nos achados encontrados observa-se piora da função cognitiva no período de 6-12 meses após COVID-19. No mesmo período foi observado redução da atividade cerebral no repouso nas áreas Cz-F4 e durante atividades cognitivas nas áreas F3-F7. Foi encontrado também aumento da mobilidade em F3-F7 nos primeiros 3 meses após COVID-19 durante tarefas cognitivas e redução da complexidade do sinal em F3-F7 no repouso no grupo COVID-19 aos 6-12 meses. Houve aumento da complexidade do sinal em F3-F7 e nos canais Cz-F3 aos 6-12 durante tarefas cognitivas.

2.6.1 Eletroencefalograma

A mobilidade é uma medida do desvio padrão da inclinação com referência ao desvio padrão da amplitude e é expressa como uma proporção por unidade de tempo e pode ser concebida também como uma frequência média. Complexidade é utilizada para avaliar tarefas em tempo real. É uma medida de detalhes excessivos com referência à forma de curva "mais suave" possível, a onda senoidal, esta correspondendo à unidade. É expressa como o número de inclinações padrão realmente geradas durante o tempo médio necessário para a geração de uma amplitude padrão dada pela mobilidade. Devido a não-linearidade do cálculo do desvio padrão, este parâmetro irá quantificar qualquer desvio da forma do seno como um aumento de unidade. (HJORTH, 1970)

Muitos estudos descrevem uma preponderância de anormalidades do lobo frontal, incluindo lentidão focal frontal e intermitente atividade delta rítmica (FIRDA), ondas agudas, descargas epileptiformes e estado de mal epiléptico. (PENSATO, 2021)

Estudos relataram atividade reduzida consistente e generalizada em pacientes com desordens de consciência, principalmente na região pré-frontal, pré-motora, áreas de associação parietotemporal e o cíngulo posterior córtex/precuneus, com evidência de conectividade cortical ineficaz entre a área pré-frontal, pré-motora, córtex posterior cingulado e o tálamo. Pacientes que permaneceram intubados em média por 30 dias, apresentam quadro de distúrbios severos na deglutição, acinesia facial, ausência de oculomotricidade e falta de interação motora durante estimulação (VIJIALA et al., 2021)

Cerca de um terço dos pacientes com COVID-19 aguda ou subaguda encaminhados para neuroimagem podem apresentar anormalidades cerebrais. Os resultados de um grande estudo multicêntrico na França mostraram acidente vascular cerebral isquêmico descrito em 27% dos pacientes, realce leptomeníngeo em 17% e encefalite em 13%. Infartos grandes foram relatados em 45% dos pacientes, com infartos lacunares em 24% e acidente vascular cerebral hemorrágico em outros 24% de 38 pacientes com COVID-19 de uma grande coorte do sistema de saúde de Nova York. (REVSIN et al., 2020)

Um amplo espectro de achados de imagem foi descrito em pacientes com COVID-19. Os resultados de um estudo recente com uma grande coorte nacional revelaram que o achado de imagem mais comum foi FLAIR unilateral e/ou hiperintensidade de difusão no lobo temporal mesial (representada em 43%). Isso pode ser devido a encefalite infecciosa versus encefalite autoimune. Lesões hiperintensas de substância branca multifocais não confluentes associadas a lesões hemorrágicas foram relatadas em 30%, em um padrão semelhante ao da encefalomielite disseminada aguda ou da leucoencefalite hemorrágica aguda. Micro-hemorragias de substância branca extensas e isoladas foram descritas em até 24%, em um padrão que lembra a coagulação intravascular disseminada. (REVSIN et al., 2020)

Os pacientes podem ter hiperintensidades de substância branca supratentorial extensas e confluentes na imagem FLAIR ou lesões hiperintensas de substância branca multifocais não confluentes FLAIR. Lesões hipersintensas em T2 também foram relatadas raramente no esplênio do corpo caloso e nos pedúnculos cerebelares médios bilaterais. A explicação potencial para lesões hiperintensas de matéria branca pode incluir encefalite viral, desmielinização pós-infecciosa, leucoencefalopatia pós-hipotóxica tardia, encefalopatia metabólica ou tóxica ou síndrome de encefalopatia reversível posterior. A encefalopatia necrotizante aguda pode ser encontrada raramente, com lesões de realce hemorrágico nos tálamos bilaterais, lobos temporais mediais e regiões subinsulares. Até 25% dos pacientes podem ter uma combinação de dois ou mais padrões de imagem. (REVSIN et al., 2020)

O volume de matéria cinzenta na rede frontal-temporal foi reduzido em pacientes recebendo oxigenoterapia ou com febre em comparação com aqueles que não receberam oxigenoterapia ou sem febre. Além disso, os pacientes com maior nível de deficiência tiveram menor volume de matéria cinzenta nos giros superior, medial e médio-frontal na alta e no acompanhamento de seis meses, mesmo quando controlando para doenças cerebrovasculares, indicando que as redes frontais podem representar o pilar central para o envolvimento do cérebro no COVID-19. O volume da matéria cinzenta na região frontal foi reduzido em pacientes com agitação em comparação com pacientes sem agitação, sugerindo que alterações na região frontal provavelmente estão subjacentes ao distúrbio de humor introduzido pelo COVID-19. É importante ressaltar que as alterações de volume da matéria cinzenta na rede frontal-temporal identificada podem prever os níveis de deficiência individual tanto na alta quanto no acompanhamento de 6 meses, ou seja, a rede frontal-temporal pode ser potencialmente empregada como um biomarcador para prognóstico e avaliação do tratamento de COVID-19. (DUAN et al., 2021)

2.6.2 Função Cognitiva

Após avaliação detalhada e padronizada, percebemos piora da função cognitiva utilizando as escalas *Montreal Cognitive Assessment*, *Digit Span Test*, *Escala de Ansiedade e Depressão* e *Trail Making Test*, assim como da função

cerebral por meio de análise de sinais eletroencefalográficos (EEG) no período de 6-12 meses pós-Covid-19.

Os coronavírus estão associados a doenças do sistema nervoso central (SNC), como encefalomielite disseminada, esclerose múltipla, convulsões febre e epilepsia de encefalite. Pacientes internados em UTI por COVID-19 relataram complicações neurológicas, e aqueles com problemas neurológicos apresentaram maior taxa de deficiência cognitiva e mortalidade (AMRUTA et al, 2021). Uma infecção viral também contribui para a carga infecciosa, que está associada ao declínio cognitivo. (HALL et al., 2021)

Há evidência neurorradiológica de dano microestrutural e interrupção da integridade funcional do cérebro no acompanhamento de 3 meses em pacientes com COVID-19 recuperados, indicando potenciais consequências neurológicas de longo prazo em pacientes com COVID-19 gravemente afetados. Os tipos de danos cerebrais observados no COVID-19 são os principais contribuintes para o declínio cognitivo e a demência, assim como a ECA-2 que é expressa no lobo temporal e no hipocampo - regiões do cérebro que estão envolvidas na cognição e na memória. (MINERS et al., 2020)

A integridade da substância branca subcortical é criticamente importante para a manutenção da função cognitiva, e uma das consequências do dano à substância branca na COVID-19 é provavelmente o comprometimento cognitivo. Isso foi destacado pela demonstração neurorradiológica de que o dano à substância branca e a interrupção da integridade funcional em regiões do cérebro como o hipocampo, no acompanhamento de 3 meses em pacientes com COVID-19 recuperados, foram associados à perda de memória. (MINERS et al., 2020)

Um estudo com 62.354 pacientes, observou alterações importantes nos níveis de transtornos psiquiátricos, demência e insônia de 14 à 90 dias após a infecção por SARS-Cov-2. (TAQUET et al. 2021). Em outro estudo, foram analisados por meio de bancos de dados, sintomas neurológicos e psiquiátricos de 236.379 sobreviventes de COVID-19 em um período de 6 meses. Os resultados foram contundentes em afirmar que a incidência destes sintomas foi de 33,62%, sendo que 12,84% receberam durante este período seu primeiro diagnóstico. (TAQUET et al., 2021)

Graham et al. (2021) avaliou 100 pacientes, 50 com diagnóstico positivo e 50 com diagnóstico negativo para COVID-19. Os resultados sugerem, dentre alterações neurológicas e não-neurológicas, distúrbios na velocidade de processamento, atenção, função executiva e memória de trabalho.

O fato das duas avaliações mostrarem alterações significativas no período de 6-12 meses embasam a hipótese de que as consequências neurológicas do Covid-19 são persistentes. Novos estudos com *follow-up* maior podem analisar os efeitos desta doença após 12 meses.

Com os achados relacionados ao aumento da mobilidade em F3-F7 nos primeiros 3 meses após COVID-19 durante tarefas cognitivas, redução da complexidade do sinal em F3-F7 no repouso no grupo COVID-19 aos 6-12 meses, aumento da complexidade do sinal em F3-F7 e nos canais Cz-F3 aos 6-12 durante tarefas cognitivas, podemos inferir: a infecção por SARS-Cov-2 pode causar lesões neurológicas a ponto de diminuir a atividade cerebral e a capacidade cognitiva no pós-COVID? O eletroencefalograma pode ser um recurso para diagnosticar alterações precoces ou síndrome pós-COVID levando-se em consideração o padrão do sinal eletroencefalográfico?

2.6.3 Limitações

Algumas limitações do estudo que devem ser levadas em consideração, como a dificuldade de contato com os participantes, adequação de horário para a realização dos testes cognitivos e do EEG, comprometimento dos participantes com o comparecimento às reavaliações, dificuldade em adequar e alocar participantes no grupo controle e por algumas vezes mau funcionamento do equipamento. A pandemia de Coronavírus dificultou as coletas, pois grande parte da população encontra-se receosa com o fato de sair de casa para realizar exames de forma presencial. Como os critérios de inclusão exigiam diagnóstico positivo de infecção por SARS-Cov-2, não necessariamente o participante tendo sido internado ou intubado, a grande maioria dos pacientes teve quadros que não necessitaram hospitalização. Acreditamos que se este estudo fosse realizado somente com indivíduos com quadros mais severos, os resultados observados poderiam ser mais contundentes e a diferença entre o grupo Covid e o grupo controle seria mais pronunciada.

2.6.4 Implicações

Este trabalho tem implicações clínicas importantes, pois o EEG pode se tornar um método de diagnóstico de síndrome pós-Covid. Um protocolo para avaliação das alterações neurológicas, em períodos de tempo pré-determinados, facilita, agiliza e norteia avaliações realizadas de maneiras e com conclusões distintas. Sabendo das alterações dos parâmetros eletroencefalográfico, técnicas como o Neurofeedback podem ser utilizadas para reorganizar esses sinais. Por mais que muito se tenha estudado e publicado acerca das manifestações neurológicas do Covid-19, a padronização da avaliação se faz necessária.

2.7 CONCLUSÃO

Houve piora da função cognitiva no período de 6-12 meses após COVID-19. No mesmo período foi observado redução da atividade cerebral nas áreas pré-frontais. Além disso, houveram padrões específicos de mobilidade e complexidade no EEG que podem auxiliar a identificar alterações à longo prazo da COVID-19.

REFERÊNCIAS

- Amruta N., Chastain W. H., Paz M., Solch R. J., Murray-Brown I. C., Befeler J. B., Gressett T. E., Longo M. T., Engler-Chiurazzi E. B., Bix G. SARS-CoV-2 mediated neuroinflammation and the impact of COVID-19 in neurological disorders. *Cytokine and Growth Factor Reviews*. 2021, 58: 1-15, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2021.02.002>
- Arbour N., Day R., Newcombe J., Talbot P. J. Neuroinvasion by human respiratory coronaviruses. *J Virol*. 2000, 74(19): 8913-21.
- Botega N. J., Pereira W. A. B., Bio M. R., Garcia Jr. C., Zomignani M. A. Psychiatric morbidity among medical in-patients: a standardized assessment (GHQ-12 and CIS-R) using 'lay' interviewers in a Brazilian hospital. *Soc Psychiatry Psychiatr Epidemiol*. 1995, 30: 127-131.
- Boyle P. A., Wilson R. S., Aggarwal N. T., Tang Y., Bennett D. A. Mild Cognitive Impairment .Risk of Alzheimer disease and rate to cognitive decline. *Neurology*. 2006, 67: 441-445.
- Cabral A. M., et al. Evaluation of Deep Brain Stimulation Effect on Motor Signs of Individuals with Movement Disorders Through Gaussian Models. *10th International IEEE/EMBS Conference on Neural Engineering (NER)*, 2021, 127(3):585–588, doi: [10.1109/NER49283.2021.9441173](https://doi.org/10.1109/NER49283.2021.9441173).
- Crunfli F., Carregari V. C., Veras F. P., Vendramini P. H., Valença A. G. F., Antunes A. S. L. M. et al. SARS-Cov-2 infects brain astrocytes of COVID-19 patients and impairs neuronal viability. *MedRxiv*. 2020. <https://doi.org/10.1101/2020.10.09.20207464>

Duan K., Premi E., Pilotto A., Cristillo V., Benussi A., Libri I., Giunta M., Bockhold J. H., Liu J., Campora R., Pezzini A., Gasparotti R., Magoni M., Padovani A., Calhoun V. Alterations of frontal-temporal gray matter volume associate with clinical measures of older adults with COVID-19. *Neurobiology of Stress*. 2021, 14. <https://doi.org/10.1016/j.ynstr.2021.100326>

Ermis U., Rust M. I., Bungenberg J., et al. Neurological symptoms in COVID-19: a cross-sectional monocentric study of hospitalized patients. *Neurological Research and Practice*. 2021, 3:17. <https://doi.org/10.1186/s42466-021-00116-1>.

Ganalopoulou A. S., Ferastraoar V., Correa D. J., et al. EEG findings in acutely ill patients investigated for SARS-CoV-2/COVID-19: A small case series preliminary report. *Epilepsia Open*. 2020;5:314–324. DOI: 10.1002/epi4.12399.

Graham E. L., Clark J. R., Orban Z. S., Lim P. H., Szymanski A. L., Taylor C., Dibiase R. M., Jia D. T., Balabanov R., Ho S. U., Batra A., Liotta E. M., Korolnik I. J. Persistent neurologic symptoms and cognitive dysfunction in non-hospitalized Covid-19 “long haulers”. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2021, 8(5): 1073-1085. <https://doi.org/10.1002/acn3.51350>

Hall P. A., Shereen P., Fong G. T., Cheah C. S. L., Oremus M., Liu-Ambrose T., Sakib M. N., Butt Z. A., Ayaz H., Jandu N., Morita P. P. Biobehavioral Aspects of the COVID-19 Pandemic: A Review. *Psychosomatic Medicine*. 2021, 83: 309-321. [https://DOI: 10.1097/PSY.0000000000000932](https://doi.org/10.1097/PSY.0000000000000932)

Hui D. S. C., Zumla A. Severe acute respiratory syndrome: historical, epidemiologic, and clinical features. *Infect Dis Clin North Am*. 2019, 33: 869–889. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2019.07.001>

Hjorth B. EEG analysis based on time domain properties. *Electroencephalography and Clinical Neurophysiology*. 1970, 29, 306-310. [https://doi.org/10.1016/0013-4694\(70\)90143-4](https://doi.org/10.1016/0013-4694(70)90143-4).

Huang C., Wang Y., Li X. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *Lancet*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30183-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30183-5).

Hwang C. S. Olfactory neuropathy in severe acute respiratory syndrome: report of A case. *Acta Neurol Taiwan*. 2006, 15(1): 26-28.

Li Q., Guan X., Wu P. et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020. 382:1199-1207. [https://DOI: 10.1056/NEJMoa2001316](https://doi.org/10.1056/NEJMoa2001316)

Lu Y., Li X., Geng D., Mei N., Wu P. Y., Huang C. C., Jia T., Zhao Y., Wang D., Xiao A., Yin B. Cerebral micro-structural changes in COVID-19 patients – an MRI-based 3 month follow-up study. *EClinicalMedicine*. 2020, 25. <https://doi.org/10.1016/j.eclinm.2020.100484>

Miners S., Kehoe P. G., Love S. Cognitive impact of COVID-19: looking beyond the short term. *Alzheimer's Research & Therapy*. 2020, 12. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00744-w>

Mao L., Wang M., Chen S. et al. Neurological manifestations of hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective case series study. *JAMA Neurol*. 2020, 77(6):683-690. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.1127>.

Nasreddine Z. S. et al : The Montreal Cognitive Assessment, MoCA,: A brief screening tool for mild cognitive impairment. *JAGS*. 2005, 53:695- 699. <https://doi.org/10.1111/j.1532-5415.2005.53221.x>.

Pensato U., Muccioli L., Cani I., Janigro D., Zinzani P. L., Guarino M., Cortelli P., Bisulli F. Brain dysfunction in COVID-19 and CAR-T therapy: cytokine storm-associated encephalopathy. *Annals of Clinical and Translational Neurology*. 2021, 8(4):968-979. <https://doi.org/10.1002/acn3.51348>

Revzin M. V., Raza S., Srivastava N. C., Warchawsky R., D'agostino C., Malhotra A., Bader A. S., Patel R. D., Chen K., Kyriakakos C., Pellerito J. S. Multisystem Imaging Manifestations of COVID-19, Part 2: From Cardiac Complications to Pediatric Manifestations. *RadioGraphics*. 2020, 40:1866-1892. <https://doi.org/10.1148/rg.2020200195>

Taquet, M.; Luciano, S.; Geddes, J. R.; Harrison, P. J. Bidirectional associations between COVID-19 and psychiatric disorder: retrospective cohort studies of 62 354 COVID-19 cases in the USA. *Lancet Psychiatry*. 2021, 8:130-140. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(20\)30462-4](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(20)30462-4)

Taquet, M.; Geddes, J.R.; Husain, M.; Luciano, S.; Harrison, P. J. 6-month neurological and psychiatric outcomes in 236379 survivors of COVID-19: a retrospective cohort study using electronic health records. *Lancet Psychiatry*. 2021, 8:416-427. [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(21\)00084-5](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(21)00084-5)

Vijjala S., Epiney, J-B., Jorh, J., Pincherle A., Meyer M. M., Pasquier R. D., Pior, J. O., Diserens K. Case Report: Behavioral Unresponsiveness in Acute COVID-19 Patients: The Utility of the Motor Behavior Tool-Revised and 18F-FDG PET/CT. *Front. Neurol.* 12:644848. doi: 10.3389/fneur.2021.644848.

Xia H, Lazartigues E. Angiotensin-converting enzyme 2 in the brain: properties and future directions. *Journal of Neurochemistry*. 2008, 107:1482-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05723.x>

Xinhua.Beijinghospitalconfirmsnervoussystem infections by novel coronavirus, http://www.china.org.cn/china/2020-03/05/content_75777888.htm. Acesso em 5 de Março de 2020.

Yeh E. A., Collins A., Cohen M. E. et al. Detection of coronavirus in the central nervous system of a child with acute disseminated encephalomyelitis. *Pediatrics*. 2004, 113:73-76. <https://doi.org/10.1542/peds.113.1.e73>.

Zhao H., Shen D., Zhou H., Liu J., Chen S. Guillain-Barré syndrome associated with SARS-CoV-2 infection: causality or coincidence? *Lancet Neurol*. 2020. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(20\)30109-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(20)30109-5).

Zigmond A. S., Snaith R. P. The hospital anxiety and depression scale. *Acta Psychiatr Scand*. 1983, 67:361-370. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0447.1983.tb09716.x>.

ANEXO 1**Ficha de Investigação de Caso confirmados de Novo Coronavírus (COVID-19)**

Data de confirmação do Caso:

Serviço de Saúde de Atendimento do Caso:

Informações Pessoais

Nome: *

Data de Nascimento: *

Idade:

Sexo:

Endereço de residência: (logradouro, nº, bairro):

País:

Estado:

Município de Residência:

Ocupação:

Local de trabalho/estudo:

Telefone de contato:

Informações Clínicas

Data de Início dos Sintomas:

Data de Atendimento:

Local de Atendimento:

Município de Atendimento:

Hospitalização: * Sim Não

Quais sintomas abaixo você teve?: *Assinalar quantos necessários

Febre/Calafrios

Fraqueza

Tosse

Dor de Garganta

Coriza

Dispneia

Diarreia

Náusea/vômitos

Comorbidades

O caso possui comorbidades?

Doença Cardiovascular/Incluir hipertensão

Diabetes

Doença Hepática

Doença Neurológica

- Doença renal
- Doença Pulmonar Crônica
- Neoplasias
- Imunodeficiências (incluir HIV)
- outras doenças hematológicas (no sangue)
- Outras

Especifique _____

Investigação Laboratorial

Realizado Coleta Laboratorial? Sim Não

- Swab Rayon Combinado
- Aspirado
- Lavado
- Outros Exames Coletados:

Positivo para Influenza? Sim Não

Positivo para Outros vírus Respiratórios? Sim Não

Você chegou a ter alguns dos quadros abaixo após a infecção do COVID-19?

- Dificuldade em sentir cheiro
- Dificuldade em sentir gosto dos alimentos
- Tontura
- Dificuldade para andar
- AVC (derrame) confirmado
- Crise epilética
- Fraqueza muscular intensa
- Alguma dificuldade na realização de movimentos, como andar, pegar um objeto

- Perda de sensibilidade em alguma região do corpo
- Dor de Cabeça
- Irritabilidade/Confusão Mental
- Outro (descreva aqui qualquer alteração que tenha observado após sua alta ou início do quadro: _____)

ANEXO 2

ESCALA HOSPITALAR DE ANSIEDADE E DEPRESSÃO

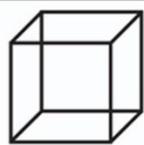
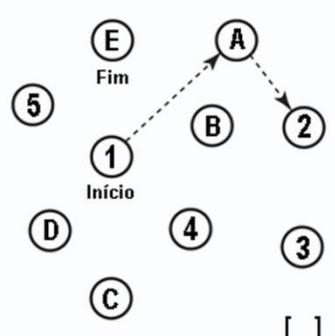
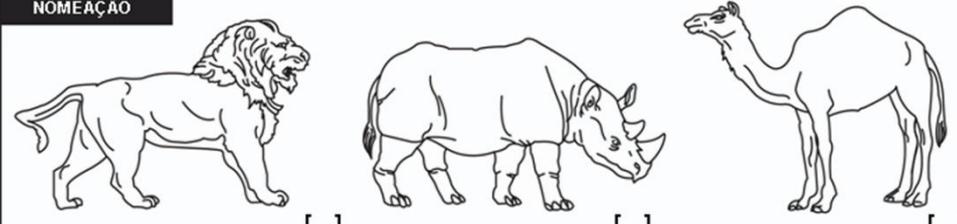
- A 1) Eu me sinto tenso ou contraído:
- 3 () A maior parte do tempo
- 2 () Boa parte do tempo
- 1 () De vez em quando
- 0 () Nunca
- D 2) Eu ainda sinto gosto pelas mesmas coisas de antes:
- 0 () Sim, do mesmo jeito que antes
- 1 () Não tanto quanto antes
- 2 () Só um pouco
- 3 () Já não sinto mais prazer em nada
- A 3) Eu sinto uma espécie de medo, como se alguma coisa ruim fosse acontecer:
- 3 () Sim, e de um jeito muito forte
- 2 () Sim, mas não tão forte
- 1 () Um pouco, mas isso não me preocupa
- 0 () Não sinto nada disso
- D 4) Dou risada e me divirto quando vejo coisas engraçadas:
- 0 () Do mesmo jeito que antes
- 1 () Atualmente um pouco menos
- 2 () Atualmente bem menos
- 3 () Não consigo mais
- A 5) Estou com a cabeça cheia de preocupações:
- 3 () A maior parte do tempo
- 2 () Boa parte do tempo
- 1 () De vez em quando
- 0 () Raramente
- D 6) Eu me sinto alegre:
- 3 () Nunca
- 2 () Poucas vezes
- 1 () Muitas vezes
- 0 () A maior parte do tempo
- A 7) Consigo ficar sentado à vontade e me sentir relaxado:
- 0 () Sim, quase sempre
- 1 () Muitas vezes
- 2 () Poucas vezes
- 3 () Nunca
- D 8) Eu estou lento para pensar e fazer as coisas:
- 3 () Quase sempre
- 2 () Muitas vezes
- 1 () De vez em quando
- 0 () Nunca
- A 9) Eu tenho uma sensação ruim de medo, como um frio na barriga ou um aperto no estômago:
- 0 () Nunca
- 1 () De vez em quando
- 2 () Muitas vezes
- 3 () Quase sempre
- D 10) Eu perdi o interesse em cuidar da minha aparência:
- 3 () Completamente
- 2 () Não estou mais me cuidando como deveria
- 1 () Talvez não tanto quanto antes
- 0 () Me cuido do mesmo jeito que antes
- A 11) Eu me sinto inquieto, como se eu não pudesse ficar parado em lugar nenhum:
- 3 () Sim, demais
- 2 () Bastante
- 1 () Um pouco
- 0 () Não me sinto assim
- D 12) Fico esperando animado as coisas boas que estão por vir:
- 0 () Do mesmo jeito que antes
- 1 () Um pouco menos do que antes
- 2 () Bem menos do que antes
- 3 () Quase nunca
- A 13) De repente, tenho a sensação de entrar em pânico:
- 3 () A quase todo momento
- 2 () Várias vezes
- 1 () De vez em quando
- 0 () Não sinto isso
- D 14) Consigo sentir prazer quando assisto a um bom programa de televisão, de rádio ou quando leio alguma coisa:
- 0 () Quase sempre
- 1 () Várias vezes
- 2 () Poucas vezes
- 3 () Quase nunca

ANEXO 3

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)

MONTREAL COGNITIVE ASSESSMENT (MOCA)
Versão Experimental Brasileira

Nome: _____ Data de nascimento: ____/____/____
Escolaridade: _____ Data de avaliação: ____/____/____
Sexo: _____ Idade: _____

VISUOESPACIAL / EXECUTIVA				Desenhar um RELÓGIO (onze horas e dez minutos) (3 pontos)		Pontos																	
		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/> Contorno <input type="checkbox"/> Números <input type="checkbox"/> Ponteiros ____/5																	
NOMEAÇÃO				<input type="checkbox"/>			____/3																
MEMÓRIA	Leia a lista de palavras, O sujeito de repeti-la, faça duas tentativas Evocar após 5 minutos	<table border="1"> <tr> <td></td> <td>Rosto</td> <td>Veludo</td> <td>Igreja</td> <td>Margarida</td> <td>Vermelho</td> </tr> <tr> <td>1ª tentativa</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td>2ª tentativa</td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> <td></td> </tr> </table>		Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho	1ª tentativa						2ª tentativa						Sem Pontuação		
	Rosto	Veludo	Igreja	Margarida	Vermelho																		
1ª tentativa																							
2ª tentativa																							
ATENÇÃO	Leia a sequência de números (1 número por segundo)	O sujeito deve repetir a sequência em ordem direta <input type="checkbox"/> 2 1 8 5 4 O sujeito deve repetir a sequência em ordem indireta <input type="checkbox"/> 7 4 2		<input type="checkbox"/>		____/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.		<input type="checkbox"/> 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		<input type="checkbox"/>		____/1																	
Subtração de 7 começando pelo 100		<input type="checkbox"/> 93	<input type="checkbox"/> 86	<input type="checkbox"/> 79	<input type="checkbox"/> 72	<input type="checkbox"/> 65	____/3																
LINGUAGEM	Repetir: Eu somente sei que é João quem será ajudado hoje.	<input type="checkbox"/>	O gato sempre se esconde embaixo do Sofá quando o cachorro está na sala.		<input type="checkbox"/>	____/2																	
Fluência verbal: dizer o maior número possível de palavras que comecem pela letra F (1 minuto).		<input type="checkbox"/> _____ (N ≥ 11 palavras)		<input type="checkbox"/>		____/1																	
ABSTRAÇÃO	Semelhança p. ex. entre banana e laranja = fruta	<input type="checkbox"/> trem - bicicleta	<input type="checkbox"/> relógio - régua		<input type="checkbox"/>		____/2																
EVOCAÇÃO TARDIA	Deve recordar as palavras SEM PISTAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	Pontuação apenas para evocação SEM PISTAS																
OPCIONAL	Pista de categoria Pista de múltipla escolha																						
ORIENTAÇÃO	<input type="checkbox"/> Dia do mês <input type="checkbox"/> Mês <input type="checkbox"/> Ano <input type="checkbox"/> Dia da semana <input type="checkbox"/> Lugar <input type="checkbox"/> Cidade					____/6																	
TOTAL Adicionar 1 pt se ≤ 12 anos de escolaridade						____/30																	

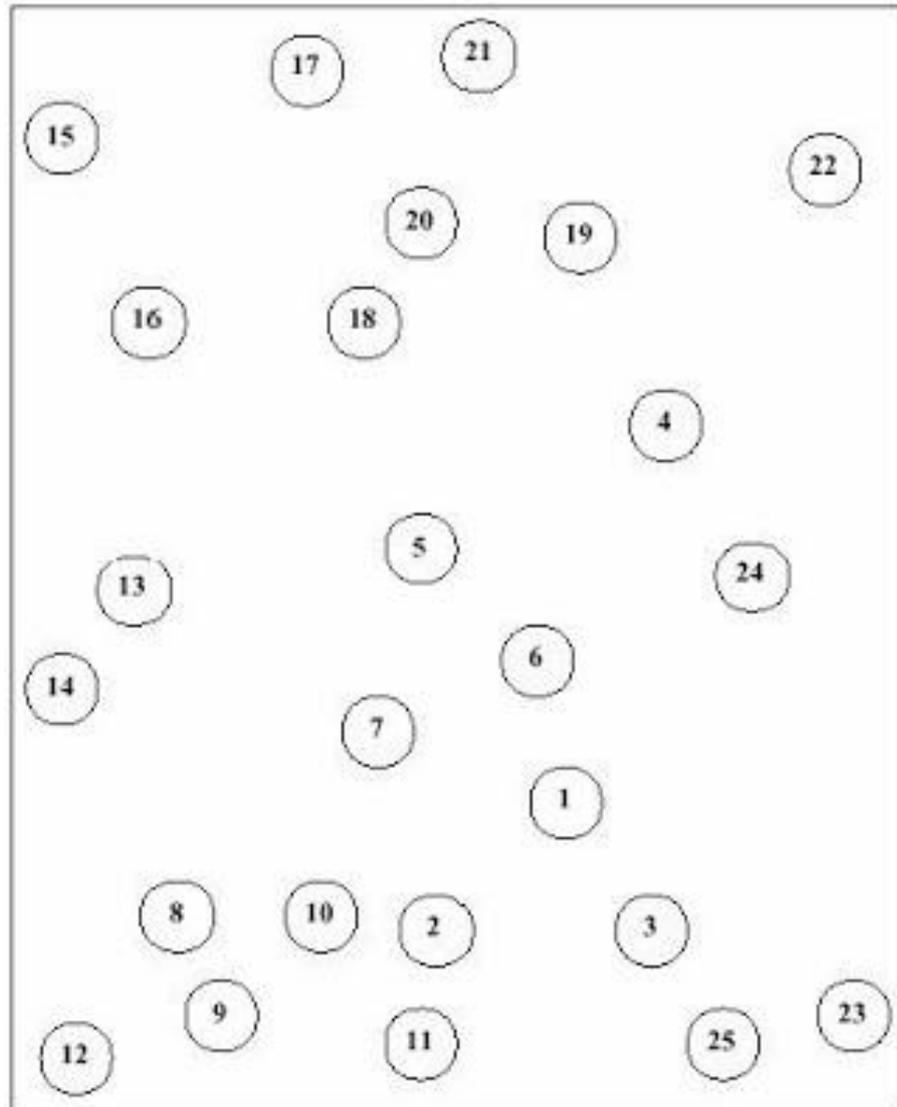
© Z. Nasreddine MD www.mocatest.org
Versão experimental Brasileira: Ana Luisa Rosas Sarmento
Paulo Henrique Ferreira Bertolucci - José Roberto Wajman

(UNIFESP-SP 2007)

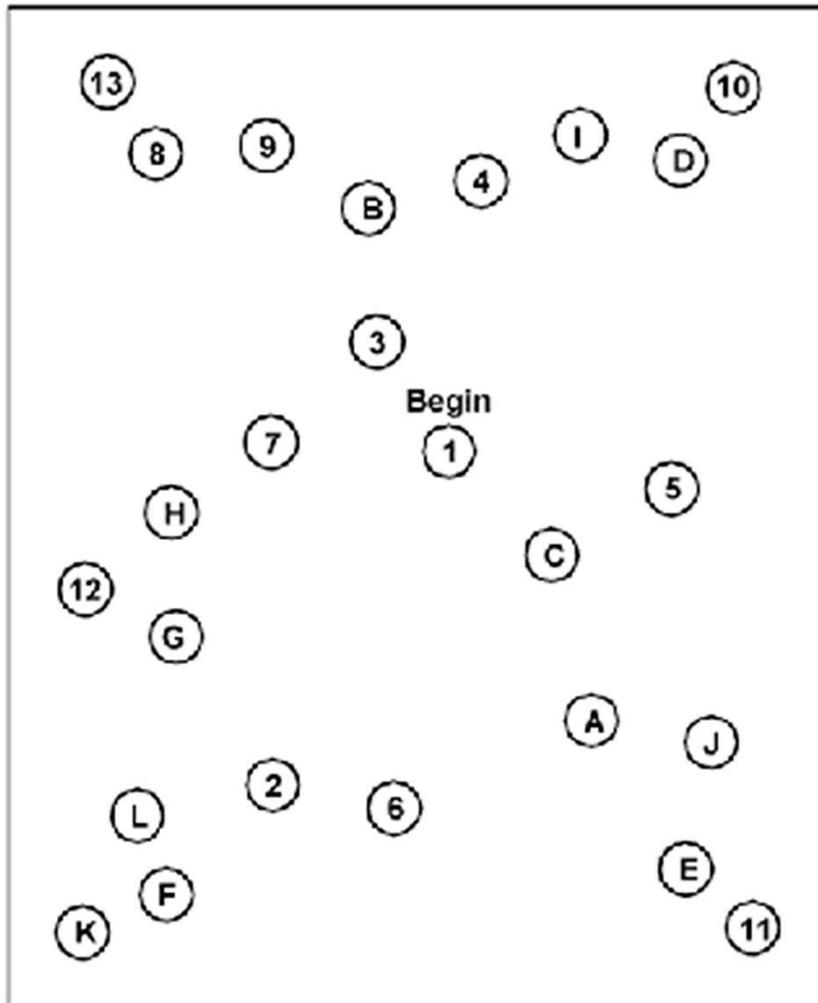
ANEXO 4

TRAIL MAKING TEST

Parte A



Parte B



ANEXO 5

DIGIT SPAN TEST

Forward	Backward
Sequences	
5, 8, 2	6, 2, 9
6, 9, 4	4, 1, 5
6, 4, 3, 9	3, 2, 7, 9
7, 2, 8, 6	1, 9, 6, 8
4, 2, 7, 3, 1	1, 5, 2, 8, 6
7, 5, 8, 3, 6	6, 1, 8, 4, 3
6, 1, 9, 4, 7, 2	5, 3, 9, 4, 1, 8
3, 9, 2, 4, 8, 7	7, 2, 4, 8, 5, 6
5, 9, 1, 7, 4, 2, 8	8, 1, 2, 9, 3, 6, 5
4, 1, 7, 9, 3, 8, 6	4, 7, 3, 9, 1, 2, 8
5, 8, 1, 9, 2, 6, 4, 7	9, 4, 3, 7, 6, 2, 5, 6
3, 8, 2, 9, 5, 1, 7, 4	7, 2, 8, 1, 9, 6, 5, 2
2, 7, 5, 8, 6, 2, 5, 8, 4	
7, 1, 3, 9, 4, 2, 5, 6, 8	