



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
CENTRO DE BIOCÊNCIAS

RYAN CORDEIRO SILVA

AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DANO CEREBRAL E ASSOCIAÇÃO
COM SINTOMAS NEUROLÓGICOS E GRAVIDADE NA COVID-19

Recife

2022

RYAN CORDEIRO SILVA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DANO CEREBRAL E ASSOCIAÇÃO
COM SINTOMAS NEUROLÓGICOS E GRAVIDADE NA COVID-19**

Dissertação de Mestrado apresentada à coordenação do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica, área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta

Coorientadores: Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa

Recife

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Silva, Ryan Cordeiro

Avaliação de biomarcadores de dano cerebral e associação com sintomas neurológicos e gravidade na COVID-19/ Ryan Cordeiro Silva- 2023.

92 f. : il., fig., tab.

Orientadora: Maira Galdino da Rocha Pitta
Coorientador: Michelle Melgarejo da Rosa

1. COVID-19 2. Biomarcadores 3. Manifestações neurológicas de doenças
I. Pitta, Maira Galdino da Rocha (orient.) II. Rosa, Michelle Melgarejo da
(coorient.) III. Título

616.91

CDD (22.ed.)

UFPE/CB - 2023 -191

RYAN CORDEIRO SILVA

**AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES DE DANO CEREBRAL E ASSOCIAÇÃO COM
SINTOMAS NEUROLÓGICOS E GRAVIDADE NA COVID-19**

Dissertação de Mestrado apresentada à
coordenação do Programa de Pós-
graduação em Inovação Terapêutica da
Universidade Federal de Pernambuco,
como parte dos requisitos necessários à
obtenção do título de mestre em Inovação
Terapêutica, área de concentração:
Fármacos, Medicamentos e Insumos
Essenciais para a Saúde

Orientadora: Profa. Dra. Maira Galdino da
Rocha Pitta

Coorientadores: Profa. Dra. Michelle
Melgarejo da Rosa

Aprovada em: 5 de Agosto de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Danielly Lima de Oliveira
Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica - UFPE (Presidente)

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão
Departamento de Patologia - UFPE

Dr. Anderson Rodrigues de Almeida
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica - Suely Galdino

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que passaram pela minha vida nesses dois anos de faculdade e que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento.

Agradeço a minha família por me incentivar nos meus sonhos, por ser porto seguro nas dificuldades, e em especial aos meus pais José Carlos e Isabel, que são minha inspiração para me tornar uma pessoa cada vez melhor, o amor deles é enorme e suficiente para me confortar em qualquer momento.

Agradeço aos meus irmãos, Rafael e Vinícius, pelo companheirismo, por sempre estarem presentes mesmo à distância. Pelas constantes palavras de apoio e incentivo. Pela paciência, atenção e disposição.

Agradeço aos meus amigos Paulo e Bárbara, pela parceria de todas as horas, pela paz e confiança que me passam, além do respeito e carinho. Por sempre estarem presentes na minha vida em todo os aspectos.

Ao meu parceiro Paulo Fernando, por ser meu porto seguro nas horas mais difíceis. Por todas as conversas que me ajudaram a relaxar durante todo esse trabalho. Agradeço pela alegria que você traz em minha vida.

Ao meu amigo Marcos, o qual conheci a tão pouco tempo mas tempo uma grande admiração e carinho,

Às minhas orientadoras, Maíra Galdino e Michelle Melgarejo, por terem aceitado me conduzir, por compartilhar seus conhecimentos, dado oportunidade de evoluir meu pensamento científico e ter me ensinado a desenvolver uma intuição no campo, além de acreditar em mim e investir tempo para me orientar. Agradeço de todo o coração por terem me ajudado a percorrer esse caminho difícil com tanto suporte.

Aos colegas do NUPIT que com grande apreço conheci nesses dois anos e me trouxeram felicidade diária no exercer do meu trabalho, Eduardo, Heloísa,

Gedielma, Celine, Luís, Lucas Tavares, Lucas Souza, Anderson, Bárbara, e todos os outros que fazem parte da família NUPIT.

A Universidade Federal de Pernambuco, ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, a CAPES, ao Rebracovid, pela base, pelos auxílios, pelos aprendizados que levarei por toda vida, por me proporcionar experiências, mostrando novos horizontes.

E, sobretudo, agradeço a Deus, me orientando e me deixando tranquilo nas incertezas, por todas as bençãos que recebi durante essa minha jornada, por olhar por mim e pela sua misericórdia.

RESUMO

As manifestações neurológicas concomitantes à infecção pelo SARS-CoV-2 têm sido comumente relatadas durante a pandemia da COVID-19 e alertado a sociedade para possibilidade de danos neurológicos associados. Para abordagens mais complexas sobre as possíveis complicações neurológicas relacionadas à doença destaca-se a análise de diversos biomarcadores descritos na literatura como a proteína B de ligação ao cálcio (S100B) e enolase específica à neurônios (NSE). Frente a isso, o presente estudo visou determinar os níveis sorológicos da S100B e NSE por ELISA em um grupo de 141 indivíduos para COVID-19 e 36 controles saudáveis e correlacionar com dados clínicos e demográficos dos grupos. Os grupos de estudo foram divididos entre o grupo controle (G1), indivíduos positivos para a COVID-19 que apresentaram apenas sintomas leves (G2) e os indivíduos positivos para COVID-19 que apresentaram um quadro respiratório agudo com necessidade de internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) (G3). Foi realizado um estudo de seguimento com 23 pacientes do G2 após 14 (D14) e 21 (D21) após o início dos sintomas. Os níveis séricos de NSE e S100B foram medidos usando o método de imunoensaio enzimático (ELISA). Os resultados revelaram uma associação positiva significativa entre os pacientes G3 e a expressão sérica de S100B ($p = 0,0403$). Os níveis séricos de NSE também foram significativamente aumentados no grupo G3 em relação ao controle ($p < 0,0001$) e ao grupo G2 ($p < 0,0001$). Entretanto, nenhuma associação foi encontrada entre os sintomas neurológicos e a expressão sérica de NSE ou S100B. Análises de associação com o sexo demonstraram níveis séricos de NSE maiores para indivíduos do sexo masculino quando comparados ao sexo feminino ($p = 0.0473$). O estudo de seguimento demonstrou uma diminuição ao longo do tempo (21 dias) na expressão sérica de NSE ($p < 0,0001$). Os resultados sugeriram que o dano cerebral é seguido por exposição aguda ao vírus, sem efeitos em longo prazo.

Palavras chave: Biomarcador; COVID-19; NSE; Acompanhamento; S100B

ABSTRACT

The neurological manifestations concomitant with SARS-CoV-2 infection have been commonly reported during the COVID-19 pandemic and alerted society to the possibility of associated neurological damage. For more complex evaluation to assess neurological complications related to the disease, it is useful the analysis of neurologic biomarkers described in the literature such as calcium-binding protein B (S100B) and neuron-specific enolase (NSE). Given that, the present study aimed to determine the serological levels of S100B and NSE by ELISA in a group of 141 individuals for COVID-19 and 36 healthy controls and to correlate with clinical and demographic data. The study groups were divided between the control group (G1), positive individuals for COVID-19 who presented only mild symptoms (G2) and the positive individuals for COVID-19 who manifested an acute respiratory condition requiring Intensive Care (ICU) admission (G3). A follow-up study was performed with 23 patients from G2 after 14 (D14) and 21 (D21) after the onset of symptoms. Serum levels of NSE and S100B were measured using the enzyme immunoassay (ELISA) method. The results revealed a significant positive association between G3 patients and serum S100B expression ($p = 0.0403$). Serum NSE levels were also significantly increased in the G3 group compared to the control ($p < 0.0001$) and the G2 group ($p < 0.0001$). However, no association was found between neurological symptoms and serum NSE or S100B expression. Association analyses between sexes demonstrated higher serum NSE levels for males when compared to females ($p = 0.0473$). The follow-up study demonstrated a decrease over time (21 days) in serum NSE expression ($p < 0.0001$). The results suggested that brain damage is followed by acute exposure to the virus, with no long-term effects.

Keywords: Biomarker; COVID-19; NSE; Follow-up; S100B

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1-** Partícula do Coronavírus. O vírion tem um nucleocapsídeo composto de RNA e proteínas do nucleocapsídeo (N), o qual é envolto por uma bicamada lipídica e coberta por trímeros da proteína *Spike* (S). A proteína de membrana (M) (uma glicoproteína tipo III transmembrana) e a proteína do envelope viral (E) estão localizadas entre as proteínas S na estrutura viral 20
- Figura 2-** Esquema exemplificando os processos celulares envolvidos na resposta imune da COVID-19. (A) Diminuição da subpopulação de linfócitos na infecção da COVID-19. (B) Mecanismos de depleção de linfócitos T decorrentes da infecção viral pelo receptor ACE2 ou aumento de citocinas inflamatórias como IL-6 IL-10 e TNF- α . (C) Produção aumentada de citocinas como GM-CSF pelo linfócito Th1 e recrutamento de monócitos CD14⁺ com consequente liberação de IL-1 β , (D) Padrão de resposta do tipo Th17 com liberação de citocina IL-17, que concomitantemente a presença de GM-CSF promovem o recrutamento de macrófagos, monócitos e neutrófilos, os quais produzem várias citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , contribuindo para tempestade de citocinas. 27
- Figura 3-** Atividades biológicas relacionadas a interação extracelular da S100B com células neurais. 36
- Figura 4-** Delineamento do estudo dividido em três etapas: (1) Recrutamento de pacientes, (2) Processamento de amostras no NUPIT-SG e (3) Análise de biomarcadores de dano neurológico 43
- Figura 5-** Níveis séricos de S100B no grupo controle (G1), no grupo de pacientes acometidos com quadro leve da COVID-19 (G2) e grupo de pacientes com quadro grave da COVID-19 (G3)... 49

Figura 6- Níveis séricos de NSE no grupo controle (G1), em pacientes acometidos com quadro leve da COVID-19 (G2) e grupo de pacientes com quadro grave da COVID-19 (G3)	51
--	----

Figura 7- Correlação entre os níveis da NSE e o sexo dos indivíduos positivos para a COVID-19.....	53
---	----

Figura 8- Correlação entre os níveis da S100B e a idade dos pacientes com COVID-19.....	54
--	----

Figura 9- Trajetória temporal dos níveis de NSE no soro sanguíneo dos indivíduos nos três segmentos de estudo, D0, D14 e D21. Todos os pacientes apresentaram níveis de NSE acima do limite superior do intervalo de referência no D0, enquanto que 3 indivíduos no D14 e 4 indivíduos no D21. Linha tracejada = Limite superior de referência calculado para o grupo com o quadro leve do COVID-19 (G2). Limite de referência superior = 3456,5 pg/mL.....	56
--	----

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Número de países notificados para COVID-19, e números cumulativos da quantidade de casos reportados para COVID-19 em cada região durante o período de 22/02/2020 e 22/06 até 28/06/2022..... 17
- Tabela 2-** Parâmetros clínicos dos voluntários acometidos com COVID-19 e controles.....48
- Tabela 3-** Dados clínicos comparados com os níveis da NSE dosadas no soro de indivíduos positivos para a COVID-19 e os valores estatísticos de $p>0.05$ 52
- Tabela 4-** Dados clínicos e de frequência de distribuição dos participantes positivos para COVID-19 selecionados para o estudo de segmento (n=23), ajustados em grupos D0, D14 e D21, a partir do dia de coleta da primeira amostra sorológica. I.C. = Intervalo de confiança; I.I.Q. = Intervalo de Interquartil. 55
- Tabela 5-** Níveis de NSE no grupo de indivíduos com quadro leve da COVID-19. Os dados estão divididos entre os níveis apresentados durante a manifestação de sintomas (D0), no dia 14 após a primeira coleta (D14), e 21 dias após a primeira coleta (D21) 57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EPI	Equipamento de proteção individual
GC	Grupo Controle
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocitárias e mono
GGT	Gama Glutamil Transferase
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulócitos e macrófagos
HC-UFPE	Hospital das Clínicas da Universidade de Pernambuco
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LBA	Lavado broncoalveolar
LCR	Líquido cefalorraquidiano
MCP1	Proteína quimiotática de monócitos 1
MERS	Síndrome respiratória do mediterrâneo
mRNA	RNA mensageiro
NGS	Sequenciamento de nova geração
NSE	Enolase específica de neurônios
NUPIT-SG	Núcleo de inovação terapêutica Suely Galdino
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato-salino
PEP	Formação do fosfoenolpiruvato
PGA	Fosfoglicerato
RAGE	Receptor para produtos finais de glicação avançada
RAR	Receptor do ácido retinóico
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa-Reação em cadeia da polimerase
S100B	Proteína B de ligação ao cálcio
SARS	Síndrome respiratória aguda grave
SES-PE	Secretaria de Saúde de Pernambuco
SNC	Sistema nervoso central
STAT3	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
TBI	Lesão cerebral traumática

TMPRSS ₂	protease transmembranar serina 2
TNF	Fator de necrose tumoral
UTI	Unidade de terapia intensiva
Zn	Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Gerais	14
2.2	Específicos:	14
3	REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1	Pandemia da COVID-19: Primeiros relatos no Brasil e no mundo	15
3.2	Principais achados clínicos e laboratoriais na COVID-19	20
3.3	COVID-19 e neuroimplicações	28
3.4	Biomarcadores de dano neurológico	32
3.4.1	Proteína B de ligação ao cálcio (S100B)	33
3.4.2	Enolase específica aos neurônios (NSE)	38
4	METODOLOGIA	42
4.1	Delineamento do estudo	42
4.2	Recrutamento de voluntários	43
4.3	Critérios de inclusão	44
4.4	Crítérios de exclusão	44
4.5	Instrumentos de coleta de dados	44
4.6	Coleta e obtenção das amostras	45
4.7	Avaliação de biomarcadores	45
4.8	Aspectos éticos	45
4.9	Análise e interpretação dos dados	46
5	RESULTADOS	46
5.1	Avaliação clínica e demográfica dos grupos de estudo	46
5.2	Avaliação sérica de S100B e NSE nos grupos G1, G2 E G3	48
5.3	Associação e correlação de parâmetros clínicos e demográficos dos pacientes positivos para a COVID-19 com os níveis das moléculas S100B e NSE.	51
5.4	Análise segmentada dos níveis de NSE para grupo de indivíduos positivos para COVID-19	54
6	DISCUSSÃO	58
7	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
	Apêndice A - Termo de consentimento livre e esclarecido	73
	Apêndice B - Artigo submetido a revista “ JOURNAL OF NEUROVIROLOGY”	77

1. INTRODUÇÃO

No início de 2020 a população mundial começou a compartilhar esforços para conter a pandemia de COVID-19, uma doença ocasionada pelo vírus SARS-CoV-2. A maior parte dos casos da COVID-19 são leves, apresentando uma sintomatologia como tosse seca, febre, dor de garganta, porém uma parcela da população pode apresentar o quadro grave com disfunção de múltiplos órgãos, pneumonia e insuficiência respiratória aguda (GAVRIATOPOULOU et al., 2020; PARASHER, 2021). Resumida muitas vezes ao quadro de reposta imunológica exacerbada no sistema respiratório, a COVID-19 surpreende também pela alta incidência de sintomas neurológicos associados como ataxia, anosmia, ageusia, tonturas, dor de cabeça e confusão mental apontando a possibilidade que o sistema nervoso central (SNC) também sofra complicações relacionadas ao processo inflamatório associado. (GARG; PALIWAL; GUPTA, 2021).

Um conjunto de evidências tem guiado os cientistas para os possíveis caminhos de entrada do vírus no sistema nervoso central (SNC). Primeiramente, foi proposto um transporte transsináptico retrógrado ao longo de sinapses neuronais de neurônios periféricos para o bulbo olfatório (MEINHARDT et al., 2021). Em segundo lugar, a inflamação induzida por SARS-CoV-2 leva a danos na barreira hematoencefálica (BHE), fornecendo acesso ao vírus no SNC. Então, no cérebro, o SARS-CoV-2 interage diretamente com as células endoteliais de maneira dependente dos receptores da enzima conversora de angiotensina (ACE2) (BUZHDIYGAN et al., 2020).

Biomarcadores de dano cerebral passam a ser utilizados nesse cenário como um método rápido para o estudo do curso da contaminação pelo vírus SARS-CoV2 e o envolvimento neural associado. A proteína enolase específica aos neurônios ou do inglês *neuron specific enolase* (NSE) é uma enzima glicolítica localizada no citoplasma de células neurológicas e neuroendócrinas. Há evidências de uma elevação nos níveis de NSE no soro de pacientes contaminados pela COVID-19 (CIONE et al., 2021; FIORI et al., 2021). Outra

molécula encontrada em células do sistema nervoso, como os astrócitos, é a S100B, uma proteína B de ligação ao cálcio que possui um valor preditivo como biomarcador de algumas patologias neurais (KATO; SVENSSON, 2015). Na COVID-19, a proteína tem sido encontrada em elevadas quantidades em associação com moléculas pró-inflamatórias e também severidade dos sintomas (ACESAHIN et al., 2022; SAVARRAJ et al., 2021)

Assim, neste estudo investigou-se a expressão sérica dos biomarcadores de dano neuronal S100B e NSE em grupo de pacientes positivos para COVID-19 com sintomas leves e grupo de indivíduos sob internação na Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e a associação entre biomarcadores neurológicos e sintomas neurológicos durante a fase aguda da doença como também após recuperação dos sintomas relatados. Com esse estudo, é almejado que os biomarcadores de dano neuronal possam fornecer uma avaliação adicional em pacientes com COVID-19 e elucidar uma estratégia terapêutica mais refinada para acompanhar as consequências neurológicas de longo prazo da população infectada com COVID-19.

2. OBJETIVOS

Geral:

- Investigar a possibilidade de dano neurológico induzido em indivíduos acometidos com a COVID-19 através de biomarcadores de dano neurais específicos

Específicos:

- Avaliar os níveis séricos/circulantes da NSE e S100B em pacientes com COVID-19 e controles saudáveis;
- Investigar as possíveis associações e correlações dos marcadores de danos neurológicos com manifestações clínicas dos pacientes com COVID-19

- Avaliar a possibilidade de danos neurológicos a longo prazo associados a COVID-19

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PANDEMIA DA COVID-19: PRIMEIROS RELATOS NO BRASIL E NO MUNDO

A pandemia da doença causada pelo novo coronavírus 2019 (COVID- 19) é um dos acontecimentos mais relevantes e de grande desafio para a humanidade no século XXI. Atualmente têm-se notificado mais de 480 milhões de casos e mais de 6 milhões de mortes reportadas em quase 200 países ao redor do mundo (WHO, 2022). A grande disseminação da COVID-19 resultou em impactos ainda inestimáveis, mas que afetam diretamente e indiretamente a saúde e economia da maioria dos países (IASC, 2020).

Em dezembro de 2019 foram relatados em hospitais locais da cidade de Wuhan, província chinesa de Hubei, alguns casos de pacientes apresentando uma pneumonia ainda sem razão conhecida. Com o crescente número de enfermos nos hospitais foi levantado uma associação epidemiológica com o Mercado de Peixes de Frutos do Mar de Huanan, local onde também era comercializado animais não aquáticos, como pássaros, coelhos entre outros (ZHU et al., 2020). Em 31 de dezembro de 2019, a China informou a OMS do surto, e em 1 de janeiro de 2020 o Mercado de Huanan foi fechado (BRÜSSOW, 2020).

Um grupo de pesquisadores do Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) da China, utilizando a técnica de Sequenciamento de Nova Geração (NGS), analisaram algumas amostras de lavado bronco alveolar (LBA) e cultivo de células isoladas das vias aéreas superiores de pacientes que visitaram o Mercado de Huanan e obtiveram oito sequências completas de um genoma viral de RNA. Essas sequências demonstraram extrema similaridade entre si (99,98%) e uma semelhança notável (88%) com o coronavírus de

morcegos, responsável pela Síndrome Respiratória Aguda (SARS), e assim foi denominado de SARS-CoV-2 (LU et al., 2020). Posteriormente alguns objetos e amostras retiradas do Mercado de Huanan também apresentaram positivo para a presença do SARS-CoV-2 (GAO et al., 2020).

No dia 10 de janeiro de 2020, o primeiro caso fatal da COVID-19 foi notificado, à medida que novos casos foram surgindo em outras províncias Chinesas e outros países como no Japão, Coréia do Sul e Tailândia, (ZHU et al., 2020). A alta transmissão do SARS-CoV-2 para profissionais de saúde e a migração de pessoas ocasionada pelos festivais na primavera chinesa impulsionou o Governo Chinês a decretar o isolamento das fronteiras da cidade de Wuhan, no intuito de prevenir novas contaminações e evitar um colapso no seu sistema de saúde (CHEN et al., 2020b).

Na China, seguiu-se uma campanha nacional antiepidêmica, com enormes recursos acumulados para saúde e gastos na construção de hospitais de campanha e mobilização de profissionais de saúde. Medidas extraordinárias foram adotadas, principalmente baseado em medidas não farmacológicas, como o isolamento social (HE; SHI; LIU, 2020). Em termos de casos conhecidos e confirmados, a incidência da COVID-19, apresentou-se inicialmente como um surto regional restrito principalmente a China e restante do oeste pacífico (Tabela 1), o que pode ter atrasado outros países para iniciara aplicação de medidas restritivas. Como um sinal fraco, mas ameaçador do que o mês de março traria, até final de fevereiro foi relatado à OMS um número baixo de casos distribuído em 50 países fora dessa região do Pacífico (SHULTZ et al., 2020).

Tabela 1. Número de países notificados para COVID-19, e números cumulativos da quantidade de casos reportados para COVID-19 em cada região durante o período de 22/02/2020 e 22/06 até 28/06/2022.

QUANTIDADE DE PAÍSES NOTIFICADOS PARA COVID-19			CUMULATIVO DE CASOS PARA COVID-19	
REGIÃO	22/02/2020	22 à 28/06/2022	22/02/2020	22 à 28/06/2022
CHINA	1	1	79.968	304.411
OESTE PACÍFICO	9	25	4.147	522.706
EUROPA	27	55	1.457	2.421.772
AMERICAS	5	51	86	1.128.639
LESTE DO MEDITERRÂNEO	11	21	725	95.912
SUDOESTE ASIÁTICO	4	10	47	157.080
AFRICA	2	44	2	18.483
TOTAL	59	205	86.432	4.649.006

Fonte: Adaptado de SHULTZ et al. (2022)

Nesse período de tempo alguns governos demonstraram a capacidade de reduzir a transmissão ou interromper a chegada do vírus da COVID-19 em seus países (KENNEDY et al., 2020). Em 7 de Março, a OMS lançou um documento de orientação provisória para o enfrentamento da disseminação comunitária da COVID-19 nos países. No documento havia recomendações para os serviços de saúde de todos os países enfrentarem um aumento significativo de casos de COVID-19 sem que interrompa outros serviços essenciais. A construção de novos setores para triagem, tratamento e unidades de terapia intensiva (UTI) foi aconselhado pela Organização, como também o aumento do número de trabalhadores das saúdes e suprimentos como oxigênio (WHO, 2020).

No mês de março o continente europeu começou a enfrentar a nova realidade de enfrentamento do COVID-19, com um crescimento de 464.212 casos, responsável por 56,4% do total global de casos, tornando-se o epicentro global para COVID-19. O número de países infectados mais que dobrou nesse mês (27 para 60 países), com a Itália excedendo o número de 100 mil casos. O número de mortes no continente também acompanhou esse aumento, começando o mês com 31 notificações para finalizar março com mais de 30 mil mortes e uma taxa de mortalidade de 11,7%. A Itália teve seu primeiro paciente da COVID-19 identificado no dia 21 de janeiro, mas logo passou a liderar a contagem de número de casos e mortes no continente europeu, sendo o primeiro país a enfrentar a pior situação pandêmica e se tornar o epicentro da pandemia (IMMOVILLI et al., 2020).

No Brasil, o primeiro caso suspeito para COVID-19 foi um homem de 61 anos, o qual veio de viagem da região da Lombardia, norte da Itália. Ele chegou no Brasil em 21 de fevereiro e apresentando sintomas como febre, tosse seca, dor de garganta e coriza foi atendido no Hospital Albert Einstein em São Paulo. A instituição confirmou o caso de COVID-19 em 26 de fevereiro pelo método de RT-PCR protocolado pelo Instituto de Virologia Charité em Berlim, Alemanha (RODRIGUEZ-MORALES et al., 2020).

No enfrentamento da COVID-19, o Brasil instaurou no dia 3 de fevereiro de 2020 o Centro de Operações Emergenciais (COE), conforme Portaria nº 188, com objetivo de harmonizar atividades estratégicas com gestores estaduais e municipais e encaminhar ao Ministro da Saúde. As ações coordenadas pelo Ministério da Saúde para o enfrentamento ao coronavírus começaram a acontecer em março, ao passo que o número de contaminados aumentava aceleradamente até atingir o patamar de transmissão comunitária em todo o país, no dia 20 de março. Medidas incluíam aquisição de mais de 5 milhões de testes rápidos, abertura de 5.811 vagas para médicos, e criação de critérios de aplicação de isolamento e quarentena (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020).

O Governo do Estado de Pernambuco adotou algumas medidas restritivas e de isolamento social após a notificação dos dois primeiros casos de COVID-19 em 12 de março (SES-PE, 2020). Logo nesse primeiro Decreto Lei, o Estado proibiu a realização de eventos com mais de 50 pessoas, seguidos de outros decretos publicados nos meses consecutivos com suspensão de atividades de ensino, academias e ginásticas, comércio e serviços não essenciais (SOUZA et al., 2020). O Governo de Pernambuco priorizou a adoção de medidas em conformidade com a ciência e recomendadas pela OMS, e de modo a acelerar a tomada de decisões no enfrentamento da pandemia, o Estado passa a integrar o Comitê Científico de Combate a pandemia do novo Coronavírus criado pelo Consórcio Nordeste (CONSÓRCIO, 2020).

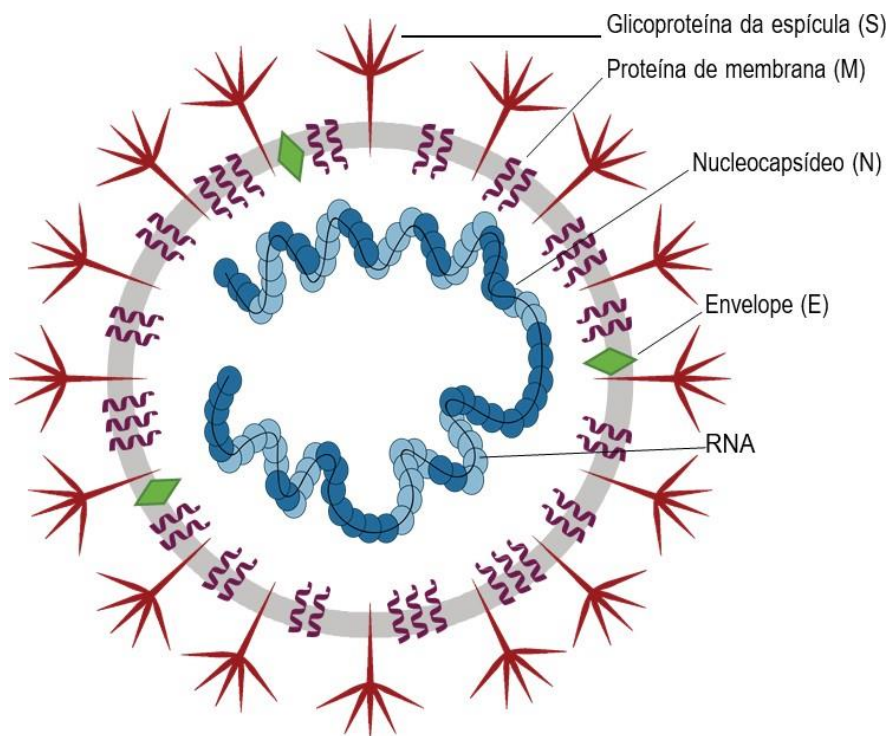
O Comitê foi composto com nomes indicados por cada um dos nove estados para uma adoção de medidas conjuntas para redução da curva de contágio da pandemia, como: aquisição de equipamentos hospitalares, modo e tempo de implementação do isolamento social, orientações de uso e fabricação de máscaras e outros EPI, realização de barreiras sanitárias e o fomento a soluções inovadoras entre indústria, startups, laboratórios e grupos de pesquisa. Esse movimento inaugurou uma rede de articulação entre dezenas de universidades, pesquisadores nacionais e internacionais e municípios da região (FERNANDEZ; PINTO, 2020)

Em novembro de 2020 a Fiocruz iniciou as atividades de recrutamento para o Rebracovid, um Consórcio harmonizado de estudos clínicos aplicados à COVID-19, no intuito de descrever a progressão da COVID-19 em indivíduos do Brasil, e visando a constituição de um biobanco sobre a doença. A pesquisa ocorre de forma simultânea em 8 Estados do Brasil, incluindo Pernambuco, e consiste na coleção de amostras de swab nasal e oral, soro, sangue total, além de extratos de células mononucleares do sangue periférico (SOARES, 2020).

3.2 PRINCIPAIS ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS NA COVID-19

O agente causador da COVID-19 é um novo coronavírus, SARS-CoV-2. Os vírus da família *coronaviridae* podem causar quadros de pneumonias graves como a síndrome respiratória aguda grave (SARS, do inglês *Severe Acute Respiratory Syndrome*) e a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS, do inglês *Middle East Respiratory Syndrome*), respectivamente causadas pelo SARS-CoV e MERS-CoV. O SARS-CoV-2 é composto por uma fita simples de RNA, envolta por um nucleocapsídeo helicoidal (N). Outras proteínas participam da estrutura, como a proteína de membrana (M) e também a proteína do envelope (E) que se dispõem envoltas na estrutura do nucleocapsídeo. A glicoproteína *Spike* também participa da estrutura viral, prolongando espículas através do envelope viral e dando forma ao nomeado 'coroa' do vírus (Figura 1) (ASTUTI; YSRAFIL, 2020).

Figura 1. Partícula do Coronavírus. O vírion tem um nucleocapsídeo composto de RNA e proteínas do nucleocapsídeo (N), o qual é envolto por uma bicamada lipídica e coberta por trímeros da proteína *Spike* (S). A proteína de membrana (M) (uma glicoproteína tipo III transmembrana) e a proteína do envelope viral (E) estão localizadas entre as proteínas S na estrutura viral.



Fonte: O autor

A contaminação pelo SARS-CoV-2 pode ser direta de pessoa para pessoa, através da dispersão no ar de gotículas de saliva de uma pessoa infectada. A aglomeração de pessoas dentro de um espaço pode aumentar o risco de infecção pelo vírus. O vírus pode ter como porta de entrada a via respiratória ou via oral, se disseminar massivamente pelos pulmões ou intestino e a partir da liberação de partículas virais na circulação sanguínea atingir múltiplos órgãos como rins, fígado, músculos, sistema nervoso e baço (LI et al., 2020). As células epiteliais do sistema respiratório podem ser a principal fonte de contaminação pelo SARS-CoV-2 por possuírem o receptor de enzima conversora de angiotensina II (ACE2) amplamente expresso na membrana celular (WALLS et al., 2020).

As proteínas ACE2 e TMPRSS₂ são fundamentais para a entrada do SARS-CoV-2 nas células do hospedeiro. A Enzima Conversora de Angiotensina 2 (ACE2) é uma metaloproteinase transmembranar expressa na

superfície de diversas células no corpo, e seu papel fisiológico está relacionado com regulação da vasoconstrição e pressão sanguínea (PATEL et al., 2014). Já serinoprotease transmembrana II humana (TMPRSS2) é responsável pela clivagem a proteína S do coronavírus, ativando a ligação ao receptor ACE2 na superfície celular hospedeira. Essa ativação inicia a fusão da membrana plasmática com o envelope viral e permitindo assim a entrada direta do SARS-CoV-2 nas células (SENAPATI et al., 2021)

A identificação dos tipos celulares que possuem as proteínas ACE2 e TMPRSS₂ expostas na membrana podem apontar uma possível rota de interação do vírus com variados órgãos, evidenciando a necessidade de estudos distintivos sobre possíveis implicações da COVID-19 nesses sítios de infecção. É visto que o ACE-2 pode ser expresso em células epiteliais do trato respiratório inferior, principalmente nos pneumócitos tipo II, na parte superior do esôfago (células epiteliais estratificadas), em células absorptivas do intestino delgado e grosso (XU et al., 2020). A TMPRSS₂ é encontrada principalmente nos rins, pâncreas, ovários, próstata, estômago e pulmão. Nesses órgãos os achados da proteína e do mRNA foram detectados principalmente nas células epiteliais (ANTALIS; BUGGE; WU, 2011).

A COVID-19 vem sendo caracterizada como uma doença com possibilidade de manifestar alterações em diversos órgãos a partir da destruição de células que possuem o receptor ACE2 e da patogênese de cada órgão decorrente da infecção. A invasão de células alveolares tipo II (AT2) pelo SARS-CoV-2 é uma circunstância importante para o quadro geral apresentado na COVID-19, pois, quando são danificadas, as células AT2 liberam moléculas quimioatraentes de células fagocitárias, induzindo uma resposta inflamatória complexa, incluindo recrutamento de outras células inflamatórias e expressão alterada de citocinas como a família do interferon (CONNORS; LEVY, 2020).

Apesar de a patogênese da infecção por SARS-CoV-2 ser marcada inicialmente pelo quadro respiratório agudo, é estabelecido que ocorre posterior envolvimento de diversos órgãos, como lesões aos rins, coração, disfunção

hepática e pneumotórax foi relatada na maioria dos quadros severos em pacientes com COVID-19, caracterizando uma síndrome de disfunção em múltiplos órgãos (LOPES-PACHECO et al., 2021). Alterações cardiológicas têm acompanhado alguns quadros severos da COVID-19, com achados como elevação de marcadores cardíacos (especialmente troponina I e T), e anormalidades em eletro ou ecocardiograma (ECG) (SHI et al., 2020; WANG et al., 2020). Achados no ECG podem aparecer após 20 a 30 dias depois do início dos sintomas e mesmo quando o paciente já não apresenta mais o vírus detectável por testes de diagnóstico para detecção do vírus (ANGELI et al., 2020).

A rotina de testes laboratoriais feitos nos pacientes internados pela COVID-19 tem frequentemente revelado achados sugestivos de disfunção renal nesses indivíduos, incluindo hematúria, proteinúria, elevado nível de creatinina e ureia, como também diminuição da taxa de filtração glomerular em pacientes hospitalizados. Um número significativo de pacientes que desenvolveram problemas renais durante a COVID-19 necessitou de diálise (LI et al., 2020). Através de análises histopatológicas de biópsias do rim é possível identificar um perfil de lesão tubular difusa, com perda da integridade da borda de escova, degeneração hidrópica e necrose (MINAMI; IWATA; WADA, 2020). No tecido renal, principalmente nas células tubulares e podócitos, tem sido encontrado a presença de antígenos do SARS-CoV-2, sugerindo que o tecido possa ser um alvo direto no processo infeccioso da doença (DIAO et al., 2021).

Entretanto, ainda é incerto a patogenia diretamente envolvida nos problemas renais em casos severos. Evidências demonstram que a lesão renal aguda é uma condição bastante encontrada, sendo a complicação extrapulmonar mais comum (29%) dentre 52 pacientes admitidos para Unidade de Terapia Intensiva (UTI) num hospital de Wuhan (YANG et al., 2020). Diferente do coração, as alterações renais acontecem durante o surgimento de problemas respiratórios graves, principalmente aqueles que necessitam passar por respiração mecânica (SU et al., 2020) Além do que, a resposta imune

instaurada pulmões, caracterizada pela expressão aumentada de citocinas pró inflamatórias, pode causar danos diretos ao rins através da interação fisiológica pulmão-rim(LIM et al., 2020)

O fígado também pode apresentar complicações durante a COVID-19, sendo observado um aumento de transaminases ASL e ALT (aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase) bilirrubina total (BT) (GUAN et al., 2020) e γ -glutamil transpeptidase (GGT) (FAN et al., 2020) no soro dos indivíduos acometidos com o quadro grave da doença, indicando uma lesão hepática ou do ducto biliar. Embora as células epiteliais do ducto biliar expressam ACE2 em grande quantidade, trabalhos recentes sugerem que o SARS-CoV-2 não causa uma infecção direta nessas células (CHAI et al., 2020). Portanto, ainda não está claro se a lesão hepática no COVID-19 é devido à infecção por SARS-CoV-2, inflamação sistêmica, relacionada a medicamentos ou multifatorial.

Caracterizando-se nos casos mais severos como uma doença multisistêmica, a COVID-19 apresenta também um impacto significativo no sistema imunológico dos indivíduos, com um achado laboratorial de linfopenia que muitas vezes pode apresentar um potencial valor prognóstico na doença(GUAN et al., 2020). O quadro linfopênico apresentado pelos pacientes da COVID-19 pode ter associação com a entrada direta do SARS-CoV-2 em subpopulações de linfócitos que possuem o receptor ACE2 em suas membranas, provocando um quadro de replicação viral ativa na célula e aumentando a susceptibilidade à exaustão celular de várias subpopulações de linfócitos (Figura 2A) (PONTELLI et al., 2020).

Esse quadro de exaustão e senescência linfocítica pode decorrer principalmente da expressão aumentada de citocinas como IL-6 IL-10 e TNF- α , prejudicando uma diferenciação de células T CD4+ CD8+ efectoras durante a infecção viral (Figura 2B) (DAVIGNON et al., 2018) O TNF- α por si só já é um importante contribuinte nesse quadro por ser uma citocina pró-inflamatória com ação direta em linfócitos T através do receptor TNFR1. Essa via de ativação

pode induzir a apoptose de linfócitos T e é um dos principais mecanismos de regulação de linfócitos senescentes por apoptose celular (GUPTA et al., 2005).

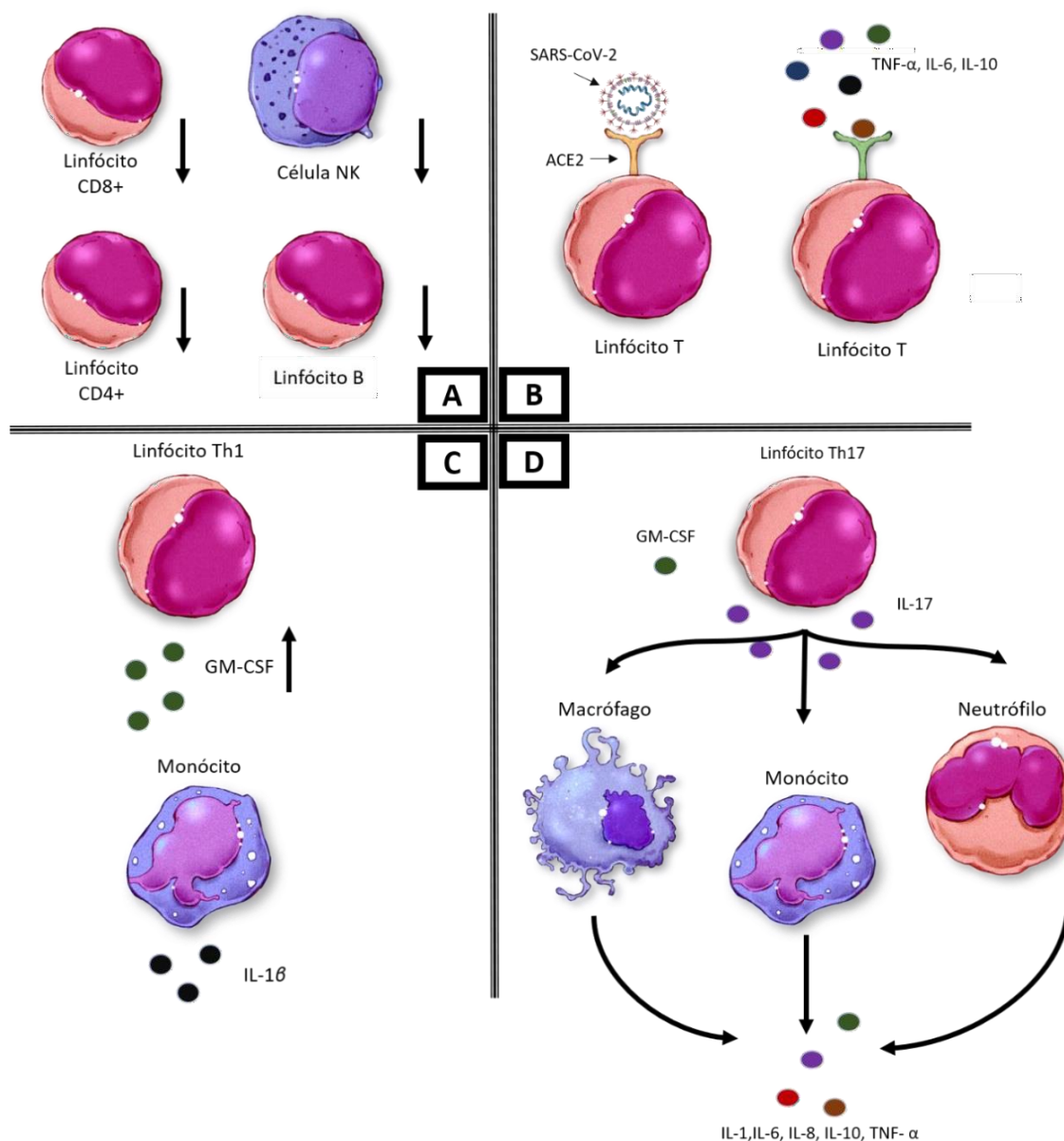
Além disso, os casos mais graves da COVID-19 exibem uma resposta imunológica sustentada de citocinas como IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF), fator estimulante de colônia de macrófagos de granulócitos (GM-CSF), proteína induzível por interferon-10 (IP10), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP1), proteína de inflamação de macrófagos-1 α , IFN- γ e TNF- α representando uma “tempestade de citocinas”(CHEN et al., 2020a; HUANG et al., 2020; QIN et al., 2020).

Alguns mecanismos com potencial de induzir essa tempestade de citocinas são propostos. Um exemplo é a resposta por células TH1, responsável pela erradicação de patógenos intracelulares, incluindo vírus, e também pela produção de citocinas como IFN- γ e linfotoxinas. Frente a resposta imunológica contra o SARS-CoV-2, é visto que pode existir uma diferenciação de linfócitos TCD4 para células TH1, as quais são capazes de gerar GM-CSF e induzir produção de IL-1 β em monócitos CD14⁺ (Figura 2C). Essas células apresentam um potencial citotóxico tanto para células infectadas como células saudáveis e assim contribuir para o quadro clínico de inflamação sistêmica em múltiplos órgãos (ZHOU et al., 2020).

Acredita-se que a IL-6 pode apresentar um papel significativo na indução e manutenção desse quadro de hipercitonemia. Isso pode decorrer principalmente da interação do TNF α com monócitos CD14⁺ de pacientes da COVID-19. A ação sinérgica do TNF α com a IL-6 pode aumentar a expressão do receptor órfão gama relacionado ao RAR (ROR γ) em células T, promovendo a diferenciação em células TH17. Essas células TH17 são responsáveis por produzir citocinas como IL-10, IL-17, IL-23(Figura 2D). Esses fatores são associados a um aumento GM-CSF, podem induzir um recrutamento de outros tipos de células do sistema imune como neutrófilos, macrófagos para o local da inflamação, gerando uma liberação exacerbada e induzindo um quadro de

inflamação crônica e desenvolvimento dos sintomas clínicos associados aos casos severos (MARTONIK et al., 2021)

Figura 2. Esquema exemplificando os processos celulares envolvidos na resposta imune da COVID-19. (A) Diminuição da subpopulação de linfócitos na infecção da COVID-19. (B) Mecanismos de depleção de linfócitos T decorrentes da infecção viral pelo receptor ACE2 ou aumento de citocinas inflamatórias como IL-6, IL-10 e TNF- α . (C) Produção aumentada de citocinas como GM-CSF pelo linfócito Th1 e recrutamento de monócitos CD14⁺ com consequente liberação de IL-1 β , (D) Padrão de resposta do tipo Th17 com liberação de citocina IL-17, que concomitantemente a presença de GM-CSF promovem o recrutamento de macrófagos, monócitos e neutrófilos, os quais produzem várias citocinas como IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , contribuindo para tempestade de citocinas.



Fonte: O autor

3.3 COVID-19 E NEUROIMPLICAÇÕES

Ao estudar sobre as manifestações clínicas causadas pelo coronavírus, é possível mapear inicialmente as experiências registradas pelo primeiro surto causado pelo SARS-CoV em 2002-2003, com diversos relatos de complicações neurológicas nos pacientes (MATÍAS-GUIU et al., 2020). A evolução dos casos tornou os sintomas neurológicos da COVID-19 mais expressivos. As manifestações neurológicas mais comuns relacionadas a COVID-19 são anosmia e ageusia, cefaleias, tonturas e alteração de consciência, como também transtornos neurocognitivos como dificuldade de concentração e problemas de memória (DE FELICE et al., 2020; RITCHIE; CHAN, 2021).

Diversos estudos comprovam a causalidade entre a infecção por alguns vírus e o aparecimento de várias doenças ou manifestações neurológicas. O Vírus Sincicial Respiratório é conhecido por infectar o trato respiratório inferior de crianças e estudos in vivo demonstra a capacidade de tropismo pela via nasal até alcançar o SNC e causar convulsões juntamente com sinais de ataxia e encefalopatia (BOHMWALD et al., 2018). Outro caso é o vírus Influenza causador de numerosas epidemias sazonais de gripe com milhões de casos por ano. A infecção pelo vírus pode atingir via nervo vago ou rota olfatória e ter acesso ao cérebro, afetando a homeostase do órgão e causando encefalopatia necrosante aguda e síndromes como a síndrome de Reye e a síndrome de Guillain-Barré (BLACKMORE et al., 2017; HENRY et al., 2010)

O vírus SARS-CoV-2, diferente do SARS-CoV-1, pode infectar diretamente o cérebro e provocar uma infecção viral ativa com produção de proteínas virais em células neuroprogenitoras e na parte cortical do cérebro.

Para atingir o cérebro, algumas rotas para entrada do SARS-CoV-2 no SNC estão sendo propostas, como um transporte transsináptico do vírus ao longo de sinapses nervosas, a partir dos neurônios mais periféricos numa direção retrógrada para o bulbo olfatório até chegar ao encéfalo, o que é corroborado por achados de anosmia e hiposmia em uma parcela considerável dos pacientes (PLATT et al., 2020).

A via olfativa é aceita como um mecanismo provável para entrada viral no SNC, a exemplo de outros vírus neurotrópicos como herpes vírus e influenza (DURRANT; GHOSH; KLEIN, 2016). Para o SARS-CoV-2, Baig *et al.*, (2020) propõem esse modelo de via transsináptica indireta (ou transcricional), na qual o vírus pode migrar para o SNC primeiramente infectando os cílios dos neurônios olfativos e ser transportado sentido retrógrado pela proteína dineína- 2 para a base do cílio. A organização anatômica dos nervos e bulbo olfatório tornam-se um importante via de entrada viral e se estabelecida logo nos primeiros dias da infecção, o vírus pode rapidamente evoluir para diferentes áreas encefálicas e invadir o líquido cefalorraquidiano em 7 dias e causar inflamação e reação desmielinizante (LECHIEN *et al.*, 2020).

Depois da infecção do bulbo olfatório, o vírus pode acessar as outras regiões do SNC através da interação do vírus com o receptor ACE2. O conhecimento da expressão dos receptores ACE2 e TMPRSS2 em diferentes células pode contribuir para traçar o caminho de entrada viral (LECHIEN et al., 2021). A proteína Spike pode interagir com os receptores ACE2 e TMRPSS2 expressos em células olfatórias ciliadas e o vírus invade neurônios periféricos e podendo comunicar-se com neurônios do SNC. Uma vez no SNC, o vírus pode infectar outras células que possuem ambos os receptores como células gliais e células-tronco neuronais (BRANN et al., 2020b).

Algumas partículas virais do SARS-CoV-2 presentes na corrente sanguínea podem também atingir diretamente o cérebro através da BHE por infecção direta de células endoteliais com expressão de receptor ACE2(HUERTAS et al., 2020). A ruptura da BHE é um importante contribuinte

para esse tipo de transporte viral. A barreira hematoencefálica é formada por células endoteliais, células murais, astrócitos, pericitos, matriz extracelular e proteínas. Ela apresenta propriedades únicas da microvasculatura do sistema nervoso central em manter a homeostase e proteger contra a ação de patógenos, drogas, toxinas, lesões (DANEMAN; PRAT, 2015)

O contato direto da partícula viral com as células endoteliais da BHE pode provocar uma citotoxicidade prejudicial para a integridade da barreira, como visto para subunidades S1 e S2 da proteína Spike em um modelo 3D in vitro da BHE (BUZHDIYGAN et al., 2020). Essa resposta inflamatória causada pela infecção das células endoteliais pelo vírus também favorece uma disfunção da barreira por meio do aumento de moléculas de adesão, citocinas pró-inflamatórias e lise celular no microambiente da BHE (CONDE; SCHUTT; GORBUNOVA, 2020).

Outra possibilidade de entrada no SNC se constrói a partir da intensa resposta inflamatória com um quadro sistêmico de elevação de proteínas e fatores pró-inflamatórios, citocinas, quimiocinas, proteínas de fase aguda e modificação do perfil leucocitário, sendo caracterizado como uma síndrome de tempestade de citocinas. É visto um aumento plasmático de citocinas como IL-1 β , IL-6, TNF- α , IFN- γ , quimiona como a CCL2, proteína C reativa e D-dímero (LUO et al., 2020; MEHTA; FAJGENBAUM, 2021). Algumas dessas citocinas também foram detectadas o cérebro de pacientes que apresentaram manifestações neurológicas. Todavia, essa resposta pode levar à inflamação da BHE, danificando-a e aumentando a permeabilidade da barreira para células infectados pelo vírus (REYNOLDS; MAHAJAN, 2021).

Com o avanço da pandemia da COVID-19 vêm aumentando o número de casos de pacientes com implicações neurológicas e neuropsiquiátricas durante e pós recuperação da doença. Entretanto os mecanismos envolvidos nesses sintomas ainda não estão totalmente esclarecidos, podendo ser decorrente da infecção direta pelo vírus, ou manifestações decorrentes da doença sistêmica associada e inflamação do sistema nervoso. É visto que

aproximadamente 90% das pessoas acometidas com COVID-19 apresentem pelo menos um sintoma neurológico (LIGUORI et al., 2020).

Alguns sintomas neurológicos mais relatados, como dor de cabeça, precedem ou acompanham os sintomas respiratórios e pode ser o único sintoma relatado em casos de COVID-19 que passam despercebidos sem o diagnóstico. Um quadro de edema, hipóxia-isquemia e infiltrados inflamatórios foram relatados em análises histológicas do cérebro de pacientes que apresentaram sintomas neurológicos durante a COVID-19 em comparação com pacientes sem sintomas neurológicos. Essa evidência pode demonstrar que o processo de hipóxia-isquêmica e a reação inflamatória envolvida pode ser mais responsável por danos aos cérebros do que a ação direta do vírus no encéfalo (WU et al., 2020).

A lesão causada no tecido pulmonar pelo SARS-CoV-2, em contribuição da inflamação associada, provoca uma inflamação nas células AT2 e formação de edema nos alvéolos pulmonares, prejudicando a hematose. Nesse quadro, o suprimento de oxigênio para o cérebro pode ser descontínuo, causando uma vasodilatação, hiperemia e edema. Nos casos mais leves da COVID-19 pode acontecer um quadro de hipoxemia silenciosa causado por um desarranjo dos mecanismos de detecção de oxigênio sanguíneo e uma capacidade reduzida no transporte de oxigênio no sangue (SOLIZ et al., 2020).

A anosmia (perda de olfato) e ageusia (perda de paladar) surgiram como um dos sintomas mais relatados para a COVID-19, com um perfil heterogêneo de grau de comprometimento entre as pessoas acometidas, e esses sintomas têm contribuído para uma triagem inicial para o diagnóstico da doença (MAO et al., 2020). É comum as infecções virais que atingem as vias aéreas provocarem um quadro de anosmia e/ou ageusia, porém acontecem por um curto espaço de tempo coexistente com outros sintomas como congestão nasal e coriza e recuperação espontânea em 4-5 dias. Porém, com o SARS-CoV-2 o surgimento da anosmia e ageusia independe do comprometimento respiratório,

podendo até ser o único sintoma de quem apresenta resultado positivo para o coronavírus (FLUMIGNAN, 2020; QIU et al., 2020).

O epitélio que compõe as narinas é formado por três tipos de células: células de sustentação, que possuem microvilos que se projetam para dentro da camada mucosa; células olfatórias, que são neurônios que se distribuem entre a camada epitelial, são dilatadas nas extremidades e com cílios longos, mas com função receptora e sem movimentação; e células basais, que formam uma camada única entre as células olfatórias e as de sustentação. As células de sustentação possuem alta expressão dos receptores ACE2 e TMPRSS2, apresentando-se como uma porta de entrada para o SARS-CoV-2. Dessa forma, danifica as células de sustentação e afeta neurônios sensoriais olfativos, indiretamente, causando a anosmia.

Estudos da rota de infecção do epitélio nasal em modelo animal indicou recrutamento acentuado de células imunes para o epitélio olfatório e uma rápida regulação de genes virais logo nos dois primeiros dias de infecção. Através de scRNA-seq foi observado uma presença majoritária da partícula viral em células de sustentação, acompanhado de um dano severo e perda dos microvilos dispostos no epitélio, mas com recuperação geral no décimo dia pós infecção (KHAN et al., 2021). Pela baixa presença dos receptores de ACE2 e TMPRSS2 em neurônios olfativos, é sugerido que a infecção pelo SARS-CoV-2 seja insuficiente para explicar a perda de olfato, podendo haver outros mecanismos reguladores como uma expressão diminuída de receptores olfatórios (BRANN et al., 2020a).

3.4 BIOMARCADORES DE DANO NEUROLÓGICO

Marcadores biológicos, ou biomarcadores, são indicadores biológicos quantificáveis resultantes de processos de biotransformação ou qualquer alteração bioquímica imprevista, cuja quantificação em fluídos biológicos avalie a intensidade de uma lesão ou exposição à algum fator prejudicial ao organismo. Os biomarcadores podem ser tipos celulares específicos,

moléculas, genes, proteínas e enzimas, ou hormônios. Eles podem fornecer informações sobre processos biológicos, um estado de doença ou sobre a resposta ao tratamento, intervenções clínicas, fornecendo assim uma visão além da clínica, necessária para tomada de decisões médicas a partir de informações únicas sobre diagnóstico, tratamento e prognóstico para muitos distúrbios e doenças debilitantes (BENOZZI; CONIGLIO, 2010).

Para a avaliação de um biomarcador é necessário levar em consideração vários critérios de medição de forma a ajudar na atenção médica. Para essa avaliação é interessante determinar os valores de relevância e validade desse biomarcador. A relevância está relacionada com a capacidade do biomarcador de fornecer informações clínicas de interesse público, dos profissionais de saúde ou contribuintes para políticas adotadas na saúde em geral. A caracterização da validade clínica refere-se a mensuração do biomarcador e associação com desfechos clinicamente relevantes (STRIMBU; TAVEL, 2010).

Uma classe excepcional de biomarcadores são os referentes às condições neurológicas. O cérebro é estritamente protegido pela Barreira hematoencefálica (BBB) e um estudo bioquímico dessa área torna-se restrito ao líquido cefalorraquidiano (LCR) que requer um procedimento invasivo e doloroso de punção lombar. Entretanto, alguns marcadores neurológicos sorológicos estão ganhando destaque com avanços tecnológicos que torna capaz a detecção sanguínea dessas moléculas através de técnicas como o ELISA, do inglês *Enzyme-linked immunosorbent assay*. O benefício da alta sensibilidade desta técnica torna capaz detectar moléculas a níveis de fentograma por mililitro. Exemplos clínicos são o uso de biomarcadores neurológicos em doenças neurodegenerativas, esclerose múltipla, traumatismo cranioencefálico, neuropatias periféricas ou danos neurológicos associados à COVID-19 (LLEÓ, 2021).

3.4.1 Proteína B de ligação ao cálcio (S100B)

A proteína S100 foi originalmente identificada por eletroforese como uma “banda de proteína que move mais rápido no gel de poliacrilamida do que outras proteínas encontradas em amostras de cérebro” (MOORE, 1965). O cérebro foi o único órgão que essa proteína foi extraída através de eletroforese e cromatografia de diferentes órgãos das espécies analisadas, e então nomeada S100 por causa de sua solubilidade 100% em solução saturada de sulfato de amônio. Baseado em sua distribuição é suposto que seja então uma proteína neuronal com localização restrita em células nervosas que compõem o sistema central e periférico (SORCI, 2013)

Desde então, um grupo de proteínas com estruturas similares foram descobertas pela ciência e o termo S100 passou a definir uma família multigênica de homodímeros contendo mais de 20 membros com diferente homologia entre as sequências de aminoácidos. As primeiras proteínas caracterizadas foram S100B e S100A e possuem similaridade de 56% entre suas estruturas. Essas proteínas demonstram possuir atividade biológica relevante, principalmente pela capacidade de ligação com o cálcio intracelular, e também afinidade com outros íons metálicos como Zn^{2+} e Cu^{2+} (WEBER; ZIMMER, 2010).

A S100B é um homodímero ácido, com massa molecular de 10,713 Da, e com estrutura cristalina que revela dois domínios de afinidade com o Ca^{+} . Após a ligação com o cálcio, a molécula muda de conformação expondo suas estruturas hidrofóbicas externamente de modo a facilitar ligações com outras biomoléculas. A interação o íon Ca^{+} pode ser modulada também pelos níveis de cálcio intracelular. A expressão da S100B acontece principalmente em células gliais (astrócitos no sistema nervoso central e células de Schwann) e devido as suas características funcionais podem participar de processos bioquímicos de células neuronais e ter implicações relevantes para o estudo de algumas doenças (ARRAIS et al., 2020).

Predominantemente encontrada no citoplasma de astrócitos, a S100B participa de alguns processos celulares relacionados à regulação do

metabolismo energético, crescimento e divisão celular, homeostase do cálcio, comunicação intra e intercelular e neuroplasticidade (BUSCHERT et al., 2013; COSTA; SILVA; COERTJENS, 2013; STOCCHERO et al., 2010). Quando presente em ambiente extracelular, a proteína pode ser um fator neurotrófico para o crescimento celular em estágios iniciais da neurogênese de roedores (TRAMONTINA et al., 2008). Essa proteína também possui um potencial efeito de neuroproteção sobre alterações no metabolismo energético, principalmente relacionado a toxicidade relacionada a grandes quantidades de glicose extracelular (KUBIS-KUBIAK; WIATRAK; PIWOWAR, 2021).

Quando encontrada em altas concentrações no meio extracelular, a S100B pode apresentar uma toxicidade celular por desencadear deliberadamente a liberação de citocinas inflamatórias no microambiente e liberação continuada de óxido nítrico por astrócitos e micróglia (CIRILLO et al., 2011). Esse efeito pode ser regulado através da interação direta com o receptor para produtos finais de glicação avançada (RAGE) em micróglia e propagação de conjunto de citocinas como IL-1 β , TNF- α , CCL3, CCL5, CXCL12 com consequente disfunção celular (Figura 3) (BIANCHI et al., 2011; BIANCHI; GIAMBANCO; DONATO, 2010). Considerando essas características, é tido que a S100B apresenta um perfil molecular associado a danos celulares (DAMPs), e pode ser induzida prontamente por alguns tipos celulares como micróglia, macrófagos e células epiteliais do brônquio em sinal a algum dano ou processo inflamatório tecidual (SORCI et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

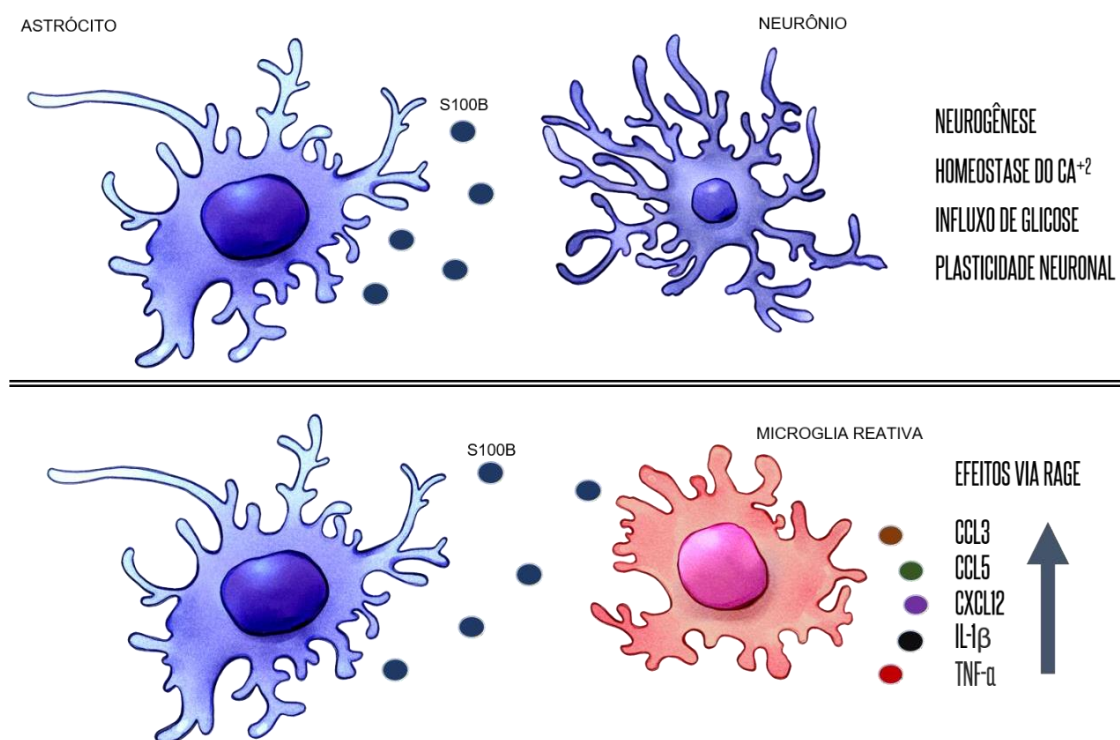


Figura 3. Atividades biológicas relacionadas a interação extracelular da S100B com células neurais. Adaptado de MICHETTI et al. (2019)

É visto também que os astrócitos podem liberar a S100B no meio extracelular quando condicionados a modelo *in vitro* de isquemia, sugerindo um

processo ativo de resposta através da S100B sob condições de estresse metabólico (GERLACH et al., 2006). Danos cerebrais secundários a outros processos fisiopatológicos acompanham um aumento na concentração de mRNA S100B, o que pode ser indicativo de uma síntese intracelular contínua da proteína acontecendo nos astrócitos (ZHOU et al., 2018).

O maior compartimento corporal extracelular para detecção da S100B é o Líquido cefalorraquidiano (LCR), podendo apresentar uma concentração 100 vezes maior do que no soro sanguíneo (PETZOLD et al., 2003). O aumento da concentração da proteína no LCR em comparação com o soro apresentar ser proporcional a gravidade do dano cerebral determinante.

A presença da S100B no soro sanguíneo é consecutiva ao aumento da molécula no LCR, e esse extravasamento da S100B para circulação sanguínea pode ser decorrente de disfunção da barreira hematoencefálica (BHE) em alguns processos inflamatórios (GOYAL et al., 2013). Vários tipos de lesão cerebral cursam com o aumento de S100B no soro sanguíneos dos indivíduos acometidos (THELIN; NELSON; BELLANDER, 2017). A proteína apresenta uma rápida depuração plasmática e um curto tempo de meia vida (60-120 min), apontando um valor preditivo positivo da concentração no soro para processos neuroinflamatórios e de dano cerebral (KLEINDIENST et al., 2009).

Há evidências suficientes para confirmar a participação da S100B como uma molécula relevante para o entendimento de vários processos patogênicos de diversas doenças do sistema nervoso. Para um grupo de doenças neurodegenerativas incluindo o Alzheimer, Parkinson e Esclerose amiotrófica, a concentração de S100B no LCR e soro sanguíneo tem relacionada com o grau de severidade das manifestações clínicas associadas (CHAVES et al., 2010; CHEN et al., 2016; SCHAF et al., 2005). O avanço dessas doenças e o nível de comprometimento da barreira entre o LCR e o sangue podem determinar a elevação na concentração de S100B das pessoas acometidas (TARASIUK et al., 2019)

É importante pensar como a meia-vida da S100B no meio extracelular pode afetar a mensuração dela para aplicação clínica. Fatores como trauma cerebral recente, dano ou ruptura temporária da BHE e síntese contínua e/ou secreção ativa por outros tipos celulares devem ser levadas em conta antes da quantificação. Como a S100B não é afetada por hemólise, a coleta sanguínea pode ser um tipo de amostra menos invasiva para quantificação da molécula. Para a detecção existem vários kits de ensaios disponíveis para medir S100B o ELISA tornou-se o padrão-ouro para medir S100B em laboratórios. Em ambientes clínicos, os dois sistemas mais usados são o imunoensaio luminométrico quantitativo automatizado LIAISON-mat S100 system (Diasorin, Sangtec, Itália) e o imunoensaio eletroquimioluminescente (Elecsys S100B®; Roche Diagnostics, Penzberg, Alemanha)(ASTRAND; UNDÉN, 2019).

3.4.2 Enolase específica aos neurônios (NSE)

A enolase é uma enzima da via glicolítica responsável pela reação de desidratação do 2-fosfoglicerato (PGA) e formação do fosfoenolpiruvato (PEP), como também pela reação reversa de hidratação de PEP para formação de PGA na gliconeogênese. No ano de 1934 a proteína foi isolada pela primeira vez por Lohman e Mayerho em amostras de tecido muscular, porém em estudos subsequentes foi revelado a existência de outras isoenzimas encontradas em mamíferos e sendo classificado de tal forma: α -enolase (ENO1) está presente em quase todos os tecidos, β -enolase (ENO3) existe principalmente no tecido muscular e γ -enolase (ENO2) encontra-se em células do sistema nervoso e neuroendócrino (RIZWANI, 2021)

Estruturalmente as enolases são formadas de dímeros. Essas subunidades podem formar um homodímero, com a junção de subunidades α , β ou γ , ou ainda um heterodímero formado pela interação não covalente da subunidade α com qualquer um dos outros tipos, formando $\alpha\beta$ ou $\alpha\gamma$. O subtipo $\alpha\alpha$ é mais presente no tecido fetal e na maioria dos tecidos no adulto, e o

subtipo $\gamma\gamma$ e $\alpha\gamma$ da enolase é encontrado principalmente no tecido nervoso e em células neuroendócrinas, por tal razão é comumente chamado de enolase específica ao neurônio, ou *neuron specific enolase* (NSE) (PIAST et al., 2005).

Predominante no tecido fetal, a α -enolase vai sendo substituída por outras isoformas com a maturação dos tecidos. Na formação neural do embrião, por exemplo, é localizado nas células neurais uma grande quantidade de α -enolase, entretanto no decorrer da maturação do sistema nervoso completo é visto uma conversão para enzima γ -enolase no citoplasma dos neurônios. Todavia, a forma da NSE composta por $\gamma\gamma$ é restrita a neurônios, enquanto que a forma $\alpha\gamma$ dessa proteína é encontrada em outras células do SNC como micróglia, oligodendrócitos e astrócitos (HAFNER et al., 2013).

A participação na via glicolítica parece não ser a única atribuição da NSE em células neuronais, visto que a localização intracelular da enzima pode ser associado a diferentes condições fisiopatológicas de células como neurônios, células gliais e astrócitos (HAFNER; OBERMAJER; KOS, 2010). Nessas células a NSE pode estar localizada na membrana plasmática ou aparecer na superfície celular, e interagir com várias moléculas presentes no SNC, indicando para os pesquisadores que pode haver participação da enzima na ativação de células gliais e no processo de inflamação neural (ONDRUSCHKA et al., 2013).

A presença da NSE na membrana de células neuronais pode ser um forte estímulo para início de reação inflamatória no microambiente. As enolases podem funcionar como um receptor de plasminogênio quando expostas nas membranas celulares, catalisando uma reação de degradação da matriz extracelular e ativação de metaloproteinases (FLODEN; WATT; BRISSETTE, 2011). Por outro lado, a exposição da NSE na membrana celular pode contribuir para uma produção de citocinas/ quimiocinas como IL-1 β , INF- γ , MCP-1 e fatores metabólicos como TNF- α , TGF- β , responsáveis por ativação de outras células gliais e danos aos neurônios (HAQUE et al., 2017; POLCYN et al., 2017).

A localização prevalente da NSE em células neuronais e neuroendócrinas pressupõe que um aumento dessa enzima em fluídos biológicos como LCR, soro sanguíneo e urina pode denotar a ocorrência de desordens metabólicas ou extravasamento citoplasmático desses tipos celulares. Em lesões cerebrais traumáticas (TBI), o aumento da NSE no LCR e soro pode atingir picos logo após 6-12 horas do traumatismo. Além do mais, têm sido vistos que a elevação do nível sorológico da enzima pode ter associação com a morte ou duração das comorbidades associadas após uma lesão traumática (MERCIER et al., 2016).

Além do mais, vem sendo mais frequente estudos associando o nível da NSE no soro sanguíneo com as implicações neurológicas que um ataque cardíaco pode provocar. A parada cardíaca e a hipoperfusão associada podem provocar um estado de hipóxia no cérebro que pode tornar-se responsável pelo lançamento de altos níveis de NSE no LCR e no sangue. Com isso, a enzima vem sendo estabelecida como um bom biomarcador capaz de prever informações a respeito da severidade do dano neural no quadro de anoxia provocado pela parada cardiorrespiratória (BEZEK; BIBERTHALER; BOGNER-FLATZ, 2020).

A mensuração dos níveis da NSE em eventos isquêmicos com hipóxia cerebral pode apresentar um valor preditivo para desfechos que apresentam piora clínica. Nesse estudo prospectivo com crianças com hipóxia neonatal detectou-se uma alta concentração (108 ng/mL) de NSE no LCR do grupo de pior prognóstico, mais que o dobro do valor apurado (50 ng/mL) para o grupo com um bom desfecho em 2 anos do episódio hipóxico (LEÓN-LOZANO et al., 2020).

Algumas encefalopatias são de origem genética, como as neurodegenerativas causadas pelo acúmulo de Ferro no cérebro (DNACF), a qual é caracterizada por atraso no desenvolvimento intelectual e demência progressiva de pessoas que a possuem. Um aumento persistente da NSE no LCR tanto quanto no soro sanguíneo foi detectado durante 3 meses em uma

criança portadora dessa condição genética, apresentando a importância da molécula no acompanhamento de distúrbios neurológicos com perfil biológico de dano neuronal agudo associado.

Recentemente, com o aparecimento da pneumonia grave desenvolvida na COVID-19 e os sintomas neurológicos associados, é manifestada a utilização da detecção da NSE na investigação de possíveis quadros de dano cerebral agudo e encefalopatia associados à infecção pelo SARS-CoV-2. Um relato de caso durante a pandemia indicou o quadro de uma paciente de 80 anos da região da Lombardia, norte da Itália, com baixa saturação de O₂ (<90%) e neuroimagens sugerindo um quadro crônico de doença cerebrovascular (FIORI et al., 2021). Níveis sorológicos de NSE >30 ng/mL foram detectados na paciente, próximo ao valor de referência calculado pela Academia Americana de Neurologia (>33 ng/mL) para um desfecho neurológico ruim após parada cardíaca (WIJDICKS et al., 2006).

Uma investigação mais detalhada mostrou alterações de um conjunto de biomarcadores de dano cerebral MAP2, NSE e S100B e endotelial sICAM1 e sVCAM1, realizada por Savarraj et al. (2021). O estudo agrupou indivíduos do Texas, Estados Unidos, hospitalizados com COVID-19 e sem histórico de distúrbios neurológicos relatados. Os valores de NSE (16.9 vs. 4.9, pg/ml) e S100B (113 vs. 43 pg/ml) encontraram-se elevados quando comparados a um grupo de indivíduos negativos para COVID-19 e com mesma distribuição de idade e sexo entre os grupos.

Alguns estudos destacam uma acentuada elevação nos níveis da NSE associado a uma maior severidade do quadro da COVID-19 e das complicações associadas. No trabalho de Ganti, et al (2020) é relatado o caso de um paciente de 77 anos, do Estado da Flórida no Estados Unidos, com quadro severo de pneumonia associado à COVID-19, apresentando um elevado nível (> 30ng/mL) de NSE no LCR, acompanhado de um quadro de meningoencefalite e insuficiência hepática e renal decorrente de um processo de sepse. Na busca de possíveis sinais ou sintomas respiratórios indicativos de

um possível envolvimento cerebral na COVID-19, Cione et al. (2021) encontrou uma forte associação do relato de dispneia de 128 indivíduos infectados com um aumento sorológico na NSE (25,85 vs. 16,64 ng/ml).

4. METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal de caráter exploratório, o qual apresenta uma análise de biomarcadores de dano cerebral em um grupo de pacientes da COVID-19 advindos da Triagem COVID do Hospital das Clínicas da UFPE e da UTI do Hospital Mestre Vitalino em Caruaru no período do 2º semestre de 2020. Após aceitação de participação da pesquisa pelo indivíduo ou seus familiares (para indivíduos sob sedação) e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE, seguiu-se a coleta de sangue e swab nasofaríngeo para análise de biomarcadores e diagnóstico da COVID-19, respectivamente. O tempo de coleta para os indivíduos com o quadro leve da COVID-19 se deu até o quinto dia após manifestação do primeiro sintoma associado à infecção. Para os participantes internados na UTI as amostras clínicas foram coletadas no primeiro dia de admissão. As amostras foram recebidas e processadas no Núcleo de Pesquisas em Inovação Terapêutica Suely Galdino - NUPIT-SG e armazenadas em ultrafreezers -80°C para formação do Biobanco pertencente ao estudo REBRACOVID, sob comando da fundação Oswaldo Cruz- Fiocruz. Após classificação dos grupos de estudo, seguiu-se para análise de biomarcadores de dano neurológico através da técnica de ELISA e consequentes análises estatísticas dos resultados e dados clínicos associados. As etapas do estudo encontram-se resumidas na Figura 4.



Figura 4. Delineamento do estudo dividido em três etapas: (1) Recrutamento de pacientes, (2) Processamento de amostras no NUPIT-SG e (3) Análise de biomarcadores de dano neurológico

4.2 RECRUTAMENTO DE VOLUNTÁRIOS

A avaliação clínica e convite de participação dos voluntários foram realizadas no setor Triagem COVID-19 do HC-UFPE pelos profissionais do setor e a coleta de material biológico foi realizada no NUPIT-SG, ou no próprio HC-UFPE quando pertinente à situação do paciente. Para os pacientes do Hospital Mestre Vitalino, em Caruaru, as amostras foram coletadas por um profissional de saúde do hospital e no primeiro dia após admissão à UTI. O grupo controle foi obtido por amostras de Biobanco pertencente ao NUPIT-SG, advindas de indivíduos sem comorbidades ou sintomatologia presente e selecionados randomicamente no período do 2º semestre de 2019. Todos esses indivíduos foram selecionados para o estudo de acordo com os critérios de inclusão e exclusão. A amostra final do trabalho foi composta por 36 indivíduos negativos para COVID-19 (G1) e 141 indivíduos positivos à COVID-19 pelo método RT-PCR e divididos em 76 casos leves e moderados (G2) e 65 com internação à Unidade de Terapia Intensiva (G3). Foi possível ao estudo

realizar um acompanhamento com 23 indivíduos incluídos no G2 durante 21 dias, realizando coleta de sangue após 14 dias (D14) e 21 dias (D21) do início dos sintomas associados à COVID-19.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Como critérios de inclusão para todos os grupos foi obrigatório para os indivíduos possuírem idade acima de 18 anos e concordarem em participar de pesquisa clínica através da assinatura do TCLE. Além disso, para o grupo G2 os critérios de inclusão foi manifestar alguns dos sintomas como febre, tosse, dor de cabeça, mialgia, e/ou perda de olfato e paladar nos últimos 5 dias.

4.4 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão para todos os grupos foi a presença de doenças neurológicas crônicas e história familiar de doenças neurológicas e psiquiátricas. Para o Grupo G1 foi definido como critério de exclusão a presença de alguma comorbidade ou sintomatologia no período da coleta.

4.5 INSTRUMENTOS DE COLETA DE DADOS

As amostras dos indivíduos sintomáticos com diagnóstico laboratorial positivo para COVID-19 foram analisadas para busca de biomarcadores imunológicos durante o curso da doença. A partir da seleção, os pacientes foram convidados a participar do estudo e, ao aceitar foi disponibilizado para leitura e assinatura o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A). Após a assinatura do documento, foi então realizado o preenchimento da ficha clínica do estudo pelo profissional de saúde habilitado, e, após validação dos critérios de exclusão e assinatura do TCLE, as amostras foram colhidas e armazenadas no NUPIT-SG. O sexo, idade, comorbidades, sintomas e tempo de início do primeiro sintoma também foram informados.

Para diagnóstico da COVID-19 foi necessário realizar a coletas de amostras de orofaringe com swabs (cotonetes), e após remover o swab do nariz do paciente introduzi-lo imediatamente no meio de transporte (PBS), rotulando a amostra no tubo de transporte com o nome completo do paciente. Para coleta de sangue e pesquisa de biomarcadores, o profissional de saúde solicita ao participante que estique seu braço e coloca o garrote para encontrar a veia. Feito isso, o técnico punciona a veia do participante com a agulha do adaptador e rapidamente se coloca o tubo seco com gel separador (9mL) Assim, rapidamente o tubo se enche com o sangue e é homogeneizado. As amostras foram processadas no laboratório NUPIT-SG.

4.6 COLETA E OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram coletados 9 mL de sangue venoso por punção venosa periférica à vácuo, um tubo seco com gel separador. Após a coleta, o soro foi separado por centrifugação a 2000 rpm, aceleração 6, freio 4 por 10 minutos, e aliquotado em microtubos de fundo cônico de 1,5 mL e armazenado a temperatura de - 80°C em freezers dispostos no NUPIT-SG.

4.7 AVALIAÇÃO DE BIOMARCADORES

As moléculas foram quantificadas pelo método ELISA, do tipo sanduíche. Foram dosadas a S100B (Catalog number DY1820-05) e NSE (Catalog number DY5169-05) (R&D Systems®) no soro dos pacientes acometidos com COVID-19 e no grupo controle. Os limites de detecção dos kits utilizados foram 23,45 e 39,05 pg/mL, respectivamente.

4.8 ASPECTOS ÉTICOS

Em conformidade com o disposto no item IX.10 da Resolução do Conselho Nacional de Saúde n.466, de 12 de dezembro de 2012 e em

consonância com as orientações emitidas pela CONEP na plenária do 31 de janeiro de 2020 em virtude da pandemia global de COVID-19, o presente projeto de pesquisa foi submetido e aprovado no Comitê De Ética Em Pesquisa Em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Pernambuco. O parecer consubstanciado do trabalho no CEP tem o registro de número 5.313.888 e o CAAE: 53343121.7.0000.5208 (Apêndice B).

4.9 ANÁLISE E INTERPRETAÇÃO DOS DADOS

As análises foram realizadas com o software GraphPad Prism 8.4.2 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA). O teste D de Cohen foi utilizado para analisar o tamanho do efeito entre os grupos a serem comparados. Os resultados das variáveis contínuas foram expressos em mediana, máxima e mínima. Para a avaliação estatística dos grupos G1, G2 e G3 e comparação entre sexos foi utilizado o teste t não paramétrico de Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ são considerados significantes. A correlação entre duas variáveis como idade e níveis das moléculas foi avaliada pelo teste de Spearman e Pearson, sendo considerada uma correlação de determinação fraca de $0 < r \leq 0,35$, moderada $0,35 < r \leq 0,67$ e forte se $0,67 < r \leq 1$.

A comparação entre os dados amostrais dos diferentes tempos de coleta é feita através do teste ANOVA para dados paramétricos e teste de Friedman para dados não paramétricos onde não é encontrado uma distribuição normal dos dados.

5. RESULTADOS

5.1 AVALIAÇÃO CLÍNICA E DEMOGRÁFICA DOS GRUPOS DE ESTUDO

O estudo incluiu 141 pacientes voluntários diagnosticados positivos para a COVID-19 pelo método RT-PCR, apresentando uma média de idade de 43

(± 13) anos, dividindo-se em 44% (n=62) de mulheres e 56% (n=79) de homens. Os voluntários saudáveis para composição do grupo controle (G1) consistiram em 36 pessoas, dividindo-se entre 39% (n=14) de mulheres e 61% (n=22) com uma média de idade de 53 anos. Os pacientes positivos para COVID-19 foram divididos entre Grupo 2 (G2) (53%, n=76), os quais apresentaram apenas sintomas não específicos como dor de cabeça, mialgia, ageusia, anosmia, e Grupo 3 (47%, n=65), os quais necessitaram de internação na Unidade de Terapia Intensiva por decorrência do quadro de grave da COVID-19 (explicar o que significa). Entre os sintomas avaliados, a dor de cabeça foi o sintoma mais relatado pelos grupos G2 (66%, n=50), enquanto que a dispneia foi o sintoma mais relatado para os pacientes admitidos para UTI (G3) (69%, n=45). A anosmia foi o segundo sintoma mais relatado pelo grupo G2 (59%, n=45). Os demais dados clínicos e demográficos dos voluntários recrutados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Parâmetros clínicos dos voluntários acometidos com COVID-19 e controles saudáveis.

Parâmetros clínicos	Grupo controle (G1) (n=36)	COVID-leve (G2) (n=76)	UTI (G3) (n=65)
Mulheres, n (%)	14 (39%)	41 (54%)	21 (32%)
Homens, n (%)	22 (61%)	35 (46%)	44 (68%)
Idade em anos, mediana (Mín-Máx)	53 (22-77)	37 (22-73)	51 (21-81)
Sintomas, n (%)			
Dispneia	-	11 (17%)	45 (69%)
Mialgia	-	28(43%)	16 (24%)
Febre	-	40 (53%)	28 (37%)
Dor de cabeça	-	50 (66%)	19 (30%)
Anosmia	-	45 (59%)	-
Ageusia	-	38 (50%)	-

Foi calculado o tamanho de efeito (d) entre as idades dos grupos G1, G2 e G3, obtendo resultados de (d=1,23) entre os grupos G1 e G2, (d=0,09) entre os grupos G1 e G3 e (d=1,15) entre os grupos G2 e G3.

5.2 AVALIAÇÃO SÉRICA DE S100B E NSE NOS GRUPOS G1, G2 e G3

O soro de 141 pacientes da COVID-19 e 36 indivíduos saudáveis recrutados para o estudo foi utilizado para as dosagens séricas de S100B e NSE por Elisa.

A S100B foi detectada em concentrações acima do limite de detecção do kit Elisa no soro de 8 (22%) dos 36 indivíduos participantes do G1, apresentando valor de mediana [58,50,00 (38,5 – 121,73) pg/mL]. Os grupos G2 e G3 foram comparados aos controles saudáveis e entre si e os resultados

podem ser vistos na Figura 5. No G2, a S100B foi detectada em 5 (6%) dos 76 pacientes, apresentando uma mediana de [64,10 (47,62-279,05) pg/mL], porém sem diferença estatística quando comparado ao G1 ($p = 0,4126$), enquanto que no G3 a molécula foi detectada em 6 (9%) dos 65 pacientes admitidos à UTI, apresentando mediana [144,00 (59,36-510,07) pg/mL] e valores estatisticamente maiores quando comparado ao G1 ($p = 0,0403$). Não foram encontrados níveis significativamente aumentados para os pacientes do G3 quando comparados aos pacientes do G2 ($p = 0,4286$).

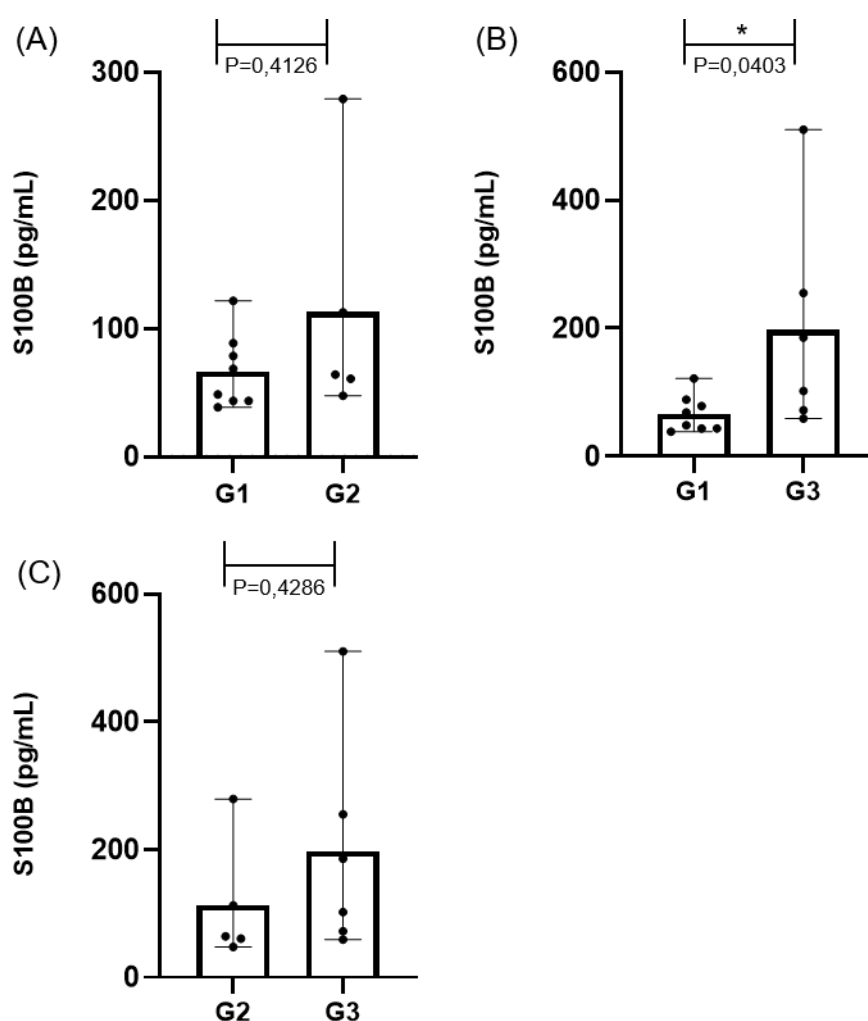


Figura 5. Expressão sérica de S100B entre pacientes positivos para COVID-19 e controles saudáveis. A Figura 5A demonstra a comparação entre os níveis séricos de S100B em G1 e

G2. A Figura 5B demonstra a comparação entre os níveis séricos de S100B em G1 e G3. A Figura 5C demonstra a comparação entre os níveis séricos de S100B em G2 e G3. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A NSE foi detectada em concentrações acima do limite de detecção em 140 das 141 (99%) amostras de soro dos indivíduos acometidos com COVID- 19 e participantes do estudo. No grupo controle a NSE foi detectada em 26 (70%) das 36 amostras de soro do grupo de indivíduos saudáveis. Assim como feito para a molécula S100B, os grupos 2 (G2) e 3 (G3) foram comparados aos controles saudáveis e entre si. No G1 foi encontrado um valor de mediana [3440,00 (395,56-8862,22) pg/mL]. Para os grupos 2 e 3 foram encontrados valores de mediana [3438,00 (578,00-11438,00) pg/mL] ($p = 0,2136$), e [5439,00 (432,67-13739,33) pg/mL] ($p < 0.0001$), respectivamente. A comparação entre os grupos G2 e G3 teve um aumento significativo ($p < 0.0001$) dos níveis de NSE no soro dos indivíduos admitidos na UTI.

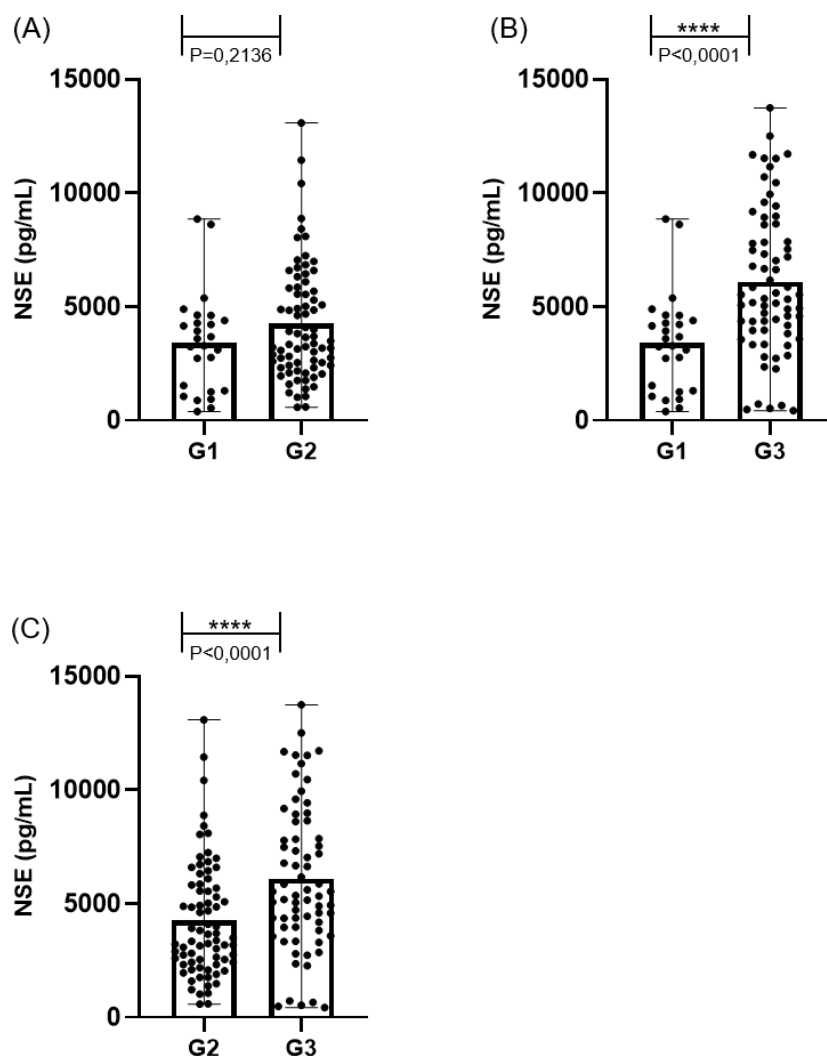


Figura 6. Expressão sérica de NSE entre pacientes positivos para COVID-19 e controles saudáveis. A Figura 6A demonstra a comparação entre os níveis séricos de NSE em G1 e G2. A Figura 6B demonstra a comparação entre os níveis séricos de NSE em G1 e G3. A Figura 6C demonstra a comparação entre os níveis séricos de NSE em G2 e G3. * $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5.3 ASSOCIAÇÃO E CORRELAÇÃO DE PARÂMETROS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES POSITIVOS PARA A COVID-19 COM OS NÍVEIS DAS MOLÉCULAS S100B E NSE.

Buscou-se encontrar associações e correlação da expressão de S100B e NSE com os dados clínicos e laboratoriais solicitados dos pacientes no

momento do atendimento e da coleta de amostras biológicas. Estão expressos na Tabela 3 as comparações dos níveis da NSE com os dados clínicos dos pacientes, porém sem nenhuma significância estatística. Os dados referentes a S100B também não apresentaram resultados relevantes de correlação com sintomas dos indivíduos durante a manifestação de COVID-19 (dados não apresentados).

Tabela 3. Dados clínicos comparados com os níveis da NSE dosadas no soro de indivíduos positivos para a COVID-19 e os valores estatísticos de $p > 0.05$.

Sintomas	G2		G3		P <0.05
	SIM	NÃO	SIM	NÃO	
Ageusia	3698	3218	-	-	0.2628/-
Anosmia	3498	3438	-	-	0.9937/-
Dor de cabeça	3358	3238	4373	5866	0.8451/ 0.0835
Dispneia	-	-	6633	5039	0.1463/-
Febre	4898	3178	-	-	0.1537-
Mialgia	3738	3338	4366	5696	0.839/0.1023

Para análise de dados demográficos foram divididos os grupos entre os 141 positivos para COVID-19 e os 36 voluntários incluídos no grupo controle e negativos para a COVID-19. Foi analisado o padrão de concentração sérica das moléculas NSE e S100B entre homens (sexo masculino - Masc) e mulheres (sexo feminino- Fem) positivos para o grupo CV-19. A S100B não apresentou uma diferença significativa entre os sexos, com valor de mediana para o sexo masculino [Masc: 72,21(47,62-279,05); e para o sexo feminino de [Fem: 149,20 (59,36-510,07 pg/mL] ($p = 0,5273$). Os níveis da NSE foram significativamente maiores em homens do que em mulheres positivos para COVID-19 como mostrado na Figura 7 [Masc: 5075 (432,6-13739,3); Fem: 3819,12 (578,2-13078,0 pg/mL] ($p = 0,0473$).

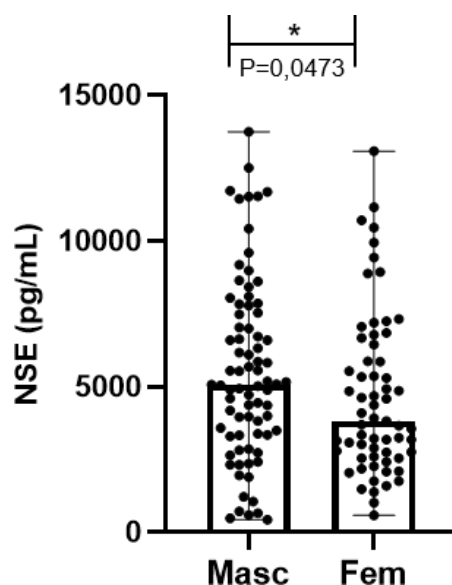


Figura 7. Associação entre os níveis da NSE e o sexo dos indivíduos positivos para a COVID- 19.

Foi também analisado a correlação dos níveis de NSE e S100B com a idade dos participantes positivos para COVID-19 e do grupo controle. Os valores de S100B nos 11 indivíduos que apresentaram a molécula obtiveram uma correlação positiva com a idade dos mesmos, ou seja, os níveis de S100B encontrados para os participantes positivos para a COVID-19 apresentaram uma comunalidade estatisticamente relevante com o aumento da idade dos mesmos (Figura 8). Porém os dados não apresentaram significância estatística ($p=0,0565$). A idade não apresentou correlação com os níveis da NSE em nenhum dos grupos CV-19 ou GC (dados não apresentados)

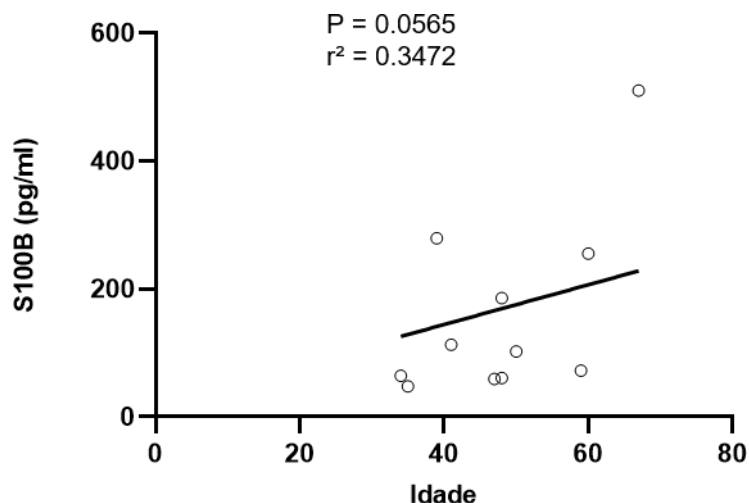


Figura 8. Correlação entre os níveis da S100B e a idade dos pacientes com COVID-19.

5.4 ANÁLISE SEGMENTADA DOS NÍVEIS DE NSE PARA GRUPO DE INDIVÍDUOS POSITIVOS PARA COVID-19

Foram acompanhados 23 pacientes do grupo que apresentou o quadro leve para COVID-19 (G2) para um estudo de segmento de coorte. Foi mensurado os níveis de NSE no soro dos indivíduos durante a manifestação de sintomas da doença (D0), e também no 14º (D14) e 21º (D21) após a entrada do indivíduo no estudo. Não houve perda de segmento entre os pacientes incluídos. Para a S100B não foi realizado esse tipo de estudo porquê apenas 4 participantes apresentaram níveis detectáveis da molécula no soro. Os dados clínicos dos grupos estão expressos na Tabela 4, como também os níveis de NSE em mediana para cada tempo de estudo.

Tabela 4. Dados clínicos e de frequência de distribuição dos participantes positivos para COVID-19 selecionados para o estudo de segmento (n=23), ajustados em grupos D0, D14 e D21, a partir do dia de coleta da primeira amostra sorológica. I.C. = Intervalo de confiança; I.I.Q. = Intervalo de Interquartil

Paramêtros clínicos	N		
Mulher, N (%)	9 (40%)		
Homem, N (%)	14 (60%)		
Mediana (DP)	35 (22-44)		
Tempo de estudo	NSE (pg/mL)	I.C. 95%	I.I.Q
D0	5748,0	[5852,0-5784,0]	[905-2075]
D14	762,6	[814,8-776,3]	[478-806]
D21	1018	[596,0-550,7]	[809-1300]

Na Figura 9 é possível estimar os valores individuais de NSE para cada um dos 23 participantes. Todos os pacientes, exceto o paciente n° 12, exibiram os maiores valores sorológicos para a NSE durante a manifestação de

sintomas da COVID-19 (D0). No segundo tempo do segmento (D14) 7 pacientes não apresentaram níveis detectáveis da NSE, enquanto que no segmento D21 esse número foi de 9 participantes. As comparações feitas entre os grupos de segmentos D0, D14 e D21 foi significativamente relevante para ambas as comparações aos segmentos D14 e D21 ($p < 0.0001$), mas não entre os grupos D14 e D21 ($p > 0.999$). Na tabela 5 está representado em dados numéricos os níveis da NSE de cada paciente para cada segmento do estudo.

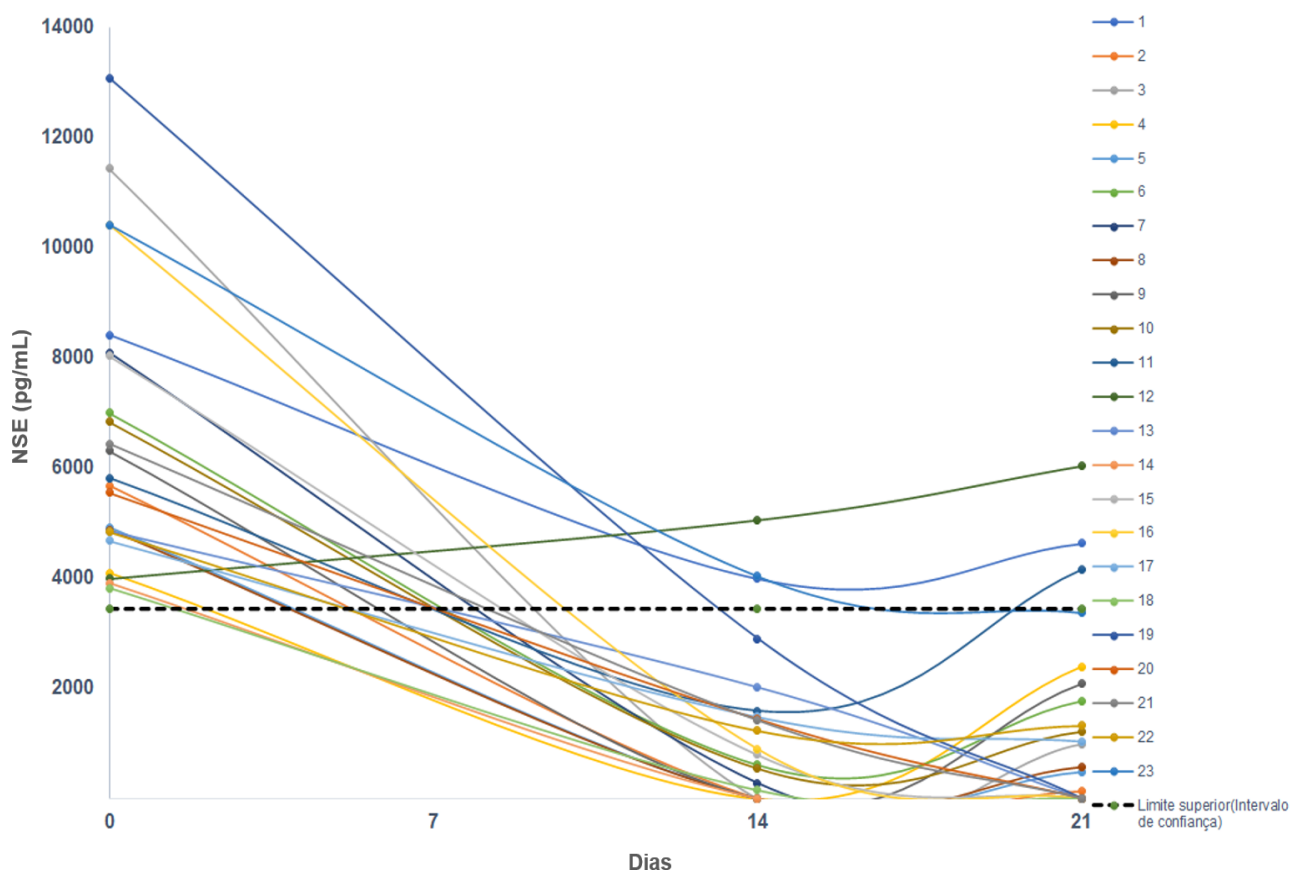


Figura 9. Trajetória temporal dos níveis de NSE no soro sanguíneo dos indivíduos nos três segmentos de estudo, D0, D14 e D21. Todos os pacientes apresentaram níveis de NSE acima do limite superior do intervalo de referência no D0, enquanto que 3 indivíduos no D14 e 4

indivíduos no D21. Linha tracejada = Limite superior de referência calculado para o grupo com o quadro leve do COVID-19 (G2). Limite de referência superior = 3456,5 pg/mL.

Tabela 5. Níveis de NSE no grupo de indivíduos com quadro leve da COVID-19. Os dados estão divididos entre os níveis apresentados durante a manifestação de sintomas (D0), no dia 14 após a primeira coleta (D14), e 21 dias após a primeira coleta (D21).

Nº do paciente	Sexo	Idade	D0	D14	D21
1	M	39	8418,2	3999,3	4632,6
2	M	38	5678,4	0	128,9
3	M	40	11438,3	0	995,6
4	F	34	4098,0	0	2395,6
5	F	41	4918,0	0	484,4
6	M	35	6998,5	617,8	1773,3
7	M	26	8098,3	284,4	0
8	M	37	4,9	0	573,3
9	M	35	6318,7	0	2084,4
10	F	23	6838,1	551,1	1217,8
11	M	25	5818,0	1595,6	4151,1
12	M	29	3998,0	5062,2	6040,0
13	F	37	4858,5	2017,8	0
14	F	24	3918,0	0	0
15	M	25	8038,8	795,6	0
16	M	22	10418,6	906,7	0
17	F	29	4678,3	1484,4	1040
18	M	38	3818,0	151,1	0
19	F	36	13078,0	2906,7	0
20	M	43	5558,0	1440,0	0
21	F	44	6438,0	1417,8	0
22	F	22	4838,4	1240,0	1328,8
23	M	22	10418,0	4040,0	3373,3

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, confirmamos a associação de casos graves de COVID-19 com aumento da expressão sérica dos biomarcadores de dano cerebral NSE e S100B no Nordeste do Brasil. Além disso, pacientes com sintomas leves da COVID-19 (G2) também apresentaram elevação nos níveis séricos de NSE em comparação com voluntários saudáveis (G1). No entanto, os não houve uma associação entre sintomas neurológicos específicos da COVID-19 e NSE. Comparando os níveis da NSE entre o sexo de pacientes positivos para COVID-19, os níveis séricos de NSE foram maiores em pacientes do sexo masculino com COVID-19. Finalmente, um estudo de acompanhamento mostrou que após 21 dias de infecção pós-COVID-19, os níveis de NSE diminuíram significativamente, sugerindo que não há disfunção neurológica de longo prazo associada à doença.

Os sintomas neurológicos mais comuns aos indivíduos do grupo com sintomas leves (G2) foram dor de cabeça (66%), anosmia (59%) e ageusia (50%), e no grupo de internados na UTI (G3) o sintoma mais descrito foi dispneia (69%). Embora sintomas como anosmia e ageusia possam ser utilizados pelos hospitais como um sintoma indicador de COVID-19 (KAYE et al., 2020) eles não são exclusivos a exposição ao vírus SARS-CoV-2 (ZAYET et al., 2020). No presente estudo não encontramos associação positiva entre as manifestações neurológicas no grupo de positivos para COVID-19 e a detecção de NSE no soro, corroborando com outros estudos que também investigaram essa associação (BLANCO-PALMERO et al., 2021; SAHIN et al., 2022)

A NSE é uma proteína amplamente encontrada no citoplasma de células neurais, principalmente nas regiões da substância cinzenta e a amígdala. Já a S100B é concentrada em áreas no citoplasma e em componentes do citoesqueleto de células da glia, ocupando os prolongamentos dentro da substância branca do corpo caloso (STREITBÜRGER et al., 2012). Comprovado o potencial neuro invasivo do SARS-CoV-2, é fundamental traçar rota do SARS-CoV-2 ao longo do SNC para compreender os principais alvos cerebrais da infecção, de modo a descobrir se o vírus atinge as regiões cerebrais responsáveis pelos sintomas neurológicos associados a COVID-19.

Já é conhecido que os neurônios olfativos do epitélio e bulbo olfatório não possuem os receptores ACE2, diferente das células de sustentação do epitélio (BRANN et al., 2020). De tal modo, a infecção viral dessas células de sustentação pode provocar uma perturbação no microambiente próximo aos nervos, alterando o transcriptoma e expressão de receptores e genes olfativos. Esse fenômeno é capaz de atrapalhar a sinalização neuronal e ter como consequência a perda de olfato, afastando a teoria que os nervos sensoriais seriam diretamente atacados pelo SARS-CoV-2 ou que esses sintomas possam indicar um certo nível de comprometimento cerebral (ZAZHYTSKA et al., 2022).

Apesar de Cione et al., (2021) relatar uma forte correlação do sintoma de dispneia com níveis da NSE, não foi encontrado nenhuma associação dos biomarcadores do presente estudo esse sintoma. A verdadeira incidência da dispneia nos indivíduos da COVID-19 é um pouco controversa, com alguns estudos apontando a ausência desse sintoma em casos mais graves e sugerindo essa ausência com um possível comprometimento associado ao vírus no SNC (BERTRAN RECASENS et al., 2020; HENTSCH et al., 2021)

A origem dessa alta incidência dos sintomas neurológicos avaliados (dor de cabeça, mialgia, anosmia, ageusia) ainda é um assunto a ser esclarecido e pode não apresentar relações diretas com algum nível de dano neuronal da doença. A dor de cabeça, outro sintoma bastante relatado por ambos os grupos

G2 e G3, pode não indicar algum comprometimento neurológico, apresentando características de enxaqueca e sendo acionada por fatores ambientais, genéticos e psicológicos (TOPTAN et al., 2020).

No presente estudo foi encontrado um baixo número de indivíduos dos grupos G2 e G3 apresentando níveis detectáveis da S100B, o que pode ocorrer devido a uma ausência de infecção direta do vírus em células da glia, pois proteínas que compõem a estrutura viral têm sido amplamente encontradas nas células endoteliais da vasculatura cerebral, mas em baixa quantidade nos neurônios e células da glia (MEINHARDT et al., 2021). Para valores negativos de S100B no soro as diretrizes do Comitê Escandinavo de Neurotrauma descarta uma possibilidade de comprometimento neural mesmo com evidências clínicas sugestivas (ANANTHAHARAN; KRAVDAL; STRAUME- NAESHEIM, 2018).

Este mesmo Comitê ainda aponta que níveis da S100B ≥ 100 pg/mL podem indicar lesão cerebral decorrente de um trauma leve. Um total de 4 indivíduos do G3 apresentaram níveis de S100B acima desse valor, com o maior valor encontrado sendo 510 pg/mL. Tal resultado pode apontar um nível leve de lesão neural leve segundo valores do Comitê, realçando a necessidade de melhor acompanhamento do estado cerebral dos indivíduos com COVID-19 que necessitaram de internação na UTI.

Um caminho possível percorrido pelo vírus capaz de provocar os níveis detectáveis encontrados nos indivíduos do G2 pode consistir na infecção de células endoteliais que compõem a vasculatura cerebral através dos receptores ACE2 (KANEKO et al., 2021). A depender da duração da infecção, da carga viral ou do perfil da resposta imune do indivíduo, a infecção dessas células endoteliais pode mediar um perfil de ativação e exaustão de células da glia, com consequente liberação de biomarcadores de dano cerebral como a S100B.

Para a Sociedade Europeia de Medicina Intensiva deve ser considerado um valor de NSE ≥ 60000 pg/mL para prever um ruim desfecho neurológico

após um ataque cardíaco (MOSEBY-KNAPPE; CRONBERG, 2020). Nenhum dos grupos desse estudo apresentaram valores de NSE maiores do que ≥ 60000 ng/mL. Porém, alguns indivíduos do G2 e G3 apresentaram valores de NSE ≥ 10000 pg/mL, o que pode ser próximo ao nível médio de NSE (15.260 pg/mL) encontrado em um grupo de 114 pacientes admitidos num hospital com suspeita de traumatismo cerebral, em Vienna, Itália (WOLF et al., 2013). Nesse estudo em Vienna foram encontrados os valores maiores para NSE para os pacientes com diagnóstico por imagem de hemorragia cerebral, o que reforça a adição de outros tipos de diagnóstico para acompanhamento neurológico dos pacientes da COVID-19 que apresentaram níveis elevados de NSE.

Foi investigado nesse trabalho a relação da S100B e NSE com características demográficas (idade e sexo) do grupo de positivos para a COVID-19. A idade não foi um determinante relevante para o nível da NSE do soro dos pacientes da COVID-19 ($P > 0.05$), como também estudos com diferentes faixas etárias não encontraram nenhuma correlação com os níveis sorológicos da NSE (LIU et al., 2019).

No caso da S100B é visto na literatura uma correlação negativa dos níveis sorológicos da proteína com a idade dos indivíduos, com o grupo de neonatos até crianças 9 apresentando as maiores concentrações em comparação a indivíduos mais velhos (PORTELA et al., 2002). Já para a S100B em pacientes COVID-19 foi visto uma correlação positiva moderada com a idade dos indivíduos que apresentaram essa molécula no soro, entretanto, sem relevância estatística. Essa correlação positiva difere de outros trabalhos com grupos de indivíduos saudáveis (RAJEWSKA-RAGER et al., 2021). O nível elevado de S100B em indivíduos mais jovens é possivelmente esperado por razão de funções dessa proteína na maturação e proliferação de células gliais que estão mais ativas nessa fase de desenvolvimento (SCHROETER; STEINER; MUELLER, 2011). Porém, a propensão de quadros mais graves da COVID-19 é vista para indivíduos com idade avançada e pode mudar esse perfil de baixa expressão de S100B já que

essa proteína possui associação com quadro mais severo da COVID-19 (ACETI et al., 2020; SULLIVAN; FISCHER, 2021)

O grupo de 141 pacientes positivos para COVID-19 foi formado por uma maioria de indivíduos do sexo masculino (56%), apresentando uma maior porcentagem de homens (68%) no grupo de internados na UTI (G3). A literatura relata que o gênero não influencia os níveis sorológicos da NSE, assim como visto para o nosso grupo controle (CASMIRO et al., 2005). Entretanto, alguns estudos demonstram que homens possuem maiores níveis de receptores ACE2 (BWIRE, 2020), o que pode gerar um quadro mais suscetível de infecção de células endoteliais pelo vírus e assim um possível envolvimento neural associado.

Neste trabalho também se realizou um acompanhamento com 23 indivíduos do grupo de positivos com sintomas leves para COVID-19 (G2). As coletas de soro sanguíneo foram segmentadas ao tempo de manifestações dos sintomas (D0), em 14 dias após a primeira coleta (D14) e 21 dias após a primeira coleta (D21). Em acordo, a proteína NSE possui um tempo de meia-vida de 48-72 h, então é esperado o declínio nos níveis sorológicos em detrimento do tempo de segmento de 14 dias e 21 dias após início dos sintomas utilizado no presente trabalho(MOSEBY-KNAPPE; CRONBERG, 2020).

De acordo com a literatura, o aumento no nível sorológico da NSE com o decorrer do tempo após algum fenômeno pode apontar um persistente dano a integridade de neurônios e alguns estudos vem investigando o valor da identificação dessa proteína para uma avaliação neurológica de 72 h até uma semana após trauma cerebral, AVC e parada cardíaca(KANG et al., 2021; PARK; PARK; HWANG, 2019). Em todas essas condições os pacientes apresentaram maiores valores da NSE sorológica no momento de admissão em comparação com os dias seguintes analisados. Para o grupo de positivos para COVID-19 também foi relevante estatisticamente a diferença da NSE durante o processo agudo da COVID-19 (D0) em comparação com o D14 e

D21, o que pode refletir o lançamento da NSE no soro sanguíneo e seu tempo de meia vida no ambiente extracelular.

A queda dos níveis de NSE pode também marcar uma recuperação neuronal como é visto no soro de pacientes pediátricos com uma semana após trauma cerebral, em que essa queda é associada com uma predição de boa recuperação para esse grupo de indivíduos após 6 meses de acompanhamento (PARK; PARK; HWANG, 2019). Portanto, vale destacar que no presente trabalho observou-se que a NSE apresentou uma queda nos níveis sorológicos após a manifestação da COVID-19, sugerindo algum dano agudo a células neuronais e neuroendócrinas, mesmo que em um grau menor de severidade quando comparado a valores dessa proteína em outras doenças ou fenômenos com envolvimento neurológico.

A queda dos níveis de NSE nos segmentos pós recuperação da COVID-19 (D14; D21) pode também indicar uma estabilização da molécula para níveis compreensíveis à população de estudo. Por ausência de um estudo robusto predizendo intervalos de confiança para detecção da molécula no soro sanguíneo na população de Pernambuco, fica limitado ao estudo apontar uma completa recuperação pós-covid associada a essa queda encontrada, como também vários grupos étnicos ao redor do mundo podem possuir limites diferentes para a NSE (MIAO et al., 2020).

7. CONCLUSÃO

Em conjunto, este estudo forneceu uma compreensão biológica inicial do papel de S100B e NSE em pacientes positivos para COVID-19. A elevação de S100B e NSE no soro de pacientes graves sugere danos no SNC relacionados à exposição aguda ao vírus. O estudo de acompanhamento com NSE não confirmou lesão do SNC a longo prazo. Os sintomas neurológicos do COVID-19 não se associaram à expressão de NSE e S100B. Além disso, a população masculina apresentou maior suscetibilidade a danos neurológicos agudos em

comparação às mulheres. O mecanismo que sustenta a vulnerabilidade do SNC à infecção por SARS-CoV2 tem sido difícil de dissecar. Apesar disso, o presente estudo é o primeiro a caracterizar a expressão dessas moléculas em habitantes do Nordeste do Brasil, bem como é o mais longo estudo de coorte prospectivo realizado com biomarcadores de dano cerebral em pacientes com COVID-19. Embora nosso estudo tenha algumas limitações de acordo com o número de pacientes inscritos e pequeno número de pacientes expressando S100B no soro, os resultados sugerem um monitoramento da sinalização cerebral em resposta à infecção aguda por SARS-CoV-2. Além disso, os resultados também mostraram que o NSE pode fornecer informações sobre a recuperação dos pacientes do COVID-19. Estudos futuros devem investigar melhor as alterações neurológicas causadas pela infecção por COVID-19 de curto e longo prazo.

REFERÊNCIAS

- ACETI, A. et al. **Serum S100B protein as a marker of severity in Covid-19 patients** *Scientific Reports*, 2020.
- ANANTHAHARAN, A.; KRAVDAL, G.; STRAUME-NAESHEIM, T. M. Utility and effectiveness of the Scandinavian guidelines to exclude computerized tomography scanning in mild traumatic brain injury - A prospective cohort study. **BMC Emergency Medicine**, v. 18, n. 1, p. 1–8, 2018.
- BENOZZI, S.; CONIGLIO, R. I. Atherosclerosis: biomarcadores plasmáticos emergentes
Atherosclerosis: emerging plasma biomarkers. **Acta bioquímica clínica latinoamericana**, v. 44, n. 3, p. 317–328, 2010.
- BERTRAN RECASENS, B. et al. Lack of dyspnea in patients with Covid-19: another neurological conundrum? **European Journal of Neurology**, v. 27, n. 9, p. e40, 2020.
- BLANCO-PALMERO, V. A. et al. **Serum and CSF alpha-synuclein levels do not change in COVID-19 patients with neurological symptoms** *Journal of Neurology*, 2021.
- BUZHDIYAN, T. P. 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**, v. 146, n. September, p. 105131, 2020.
- BWIRE, G. M. Coronavirus: Why Men are More Vulnerable to Covid-19 Than Women? **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, n. 7, p. 874–876, 2020.
- CASMIRO, M. et al. Cerebrospinal fluid and serum neuron-specific enolase concentrations in a

normal population. **European Journal of Neurology**, v. 12, n. 5, p. 369–374, 2005.

CIONE, E. et al. Neuron-specific enolase serum levels in COVID-19 are related to the severity of lung injury. **PLoS ONE**, v. 16, n. 5 May, p. 1–9, 2021.

ERICKSON, M. A. et al. Interactions of sars-cov-2 with the blood–brain barrier. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 5, p. 1–28, 1 mar. 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, 2020.

HENTSCH, L. et al. Breathlessness and COVID-19: A call for research. **Respiration**, v. 100, n. 10, p. 1016–1026, 2021.

HUERTAS, A. et al. Endothelial cell dysfunction: A major player in SARS-CoV-2 infection (COVID-19)? **European Respiratory Journal**, v. 56, n. 1, 2020.

KANEKO, N. et al. **Flow-Mediated Susceptibility and Molecular Response of Cerebral Endothelia to SARS-CoV-2 Infection** *Stroke*, 2021.

KANG, C. et al. Comparison of prognostic performance between neuron-specific enolase and s100 calcium-binding protein b obtained from the cerebrospinal fluid of out-of-hospital cardiac arrest survivors who underwent targeted temperature management. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 7, 2021.

KAYE, R. et al. **COVID-19 Anosmia Reporting Tool: Initial Findings** *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*, 2020.

LI, H. et al. Transmission Routes Analysis of SARS-CoV-2: A Systematic Review and Case Report. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 8, n. July, p. 1–11, 2020.

LIU, Q. et al. **Distribution of serum neuron-specific enolase and the establishment of a population reference interval in healthy adults** *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2019.

LLEÓ, A. Biomarkers in neurological disorders: a fast-growing market. **Brain Communications**, v. 3, n. 2, p. 1–2, 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, 2021.

MIAO, Q. et al. **The establishment of neuron-specific enolase reference interval for the healthy population in southwest China** *Scientific Reports*, 2020.

MOSEBY-KNAPPE, M.; CRONBERG, T. Blood biomarkers of brain injury after cardiac arrest – A dynamic field. **Resuscitation**, v. 156, p. 273–276, 2020.

PARK, D. W.; PARK, S. H.; HWANG, S. K. Serial measurement of S100B and NSE in pediatric traumatic brain injury. **Child's Nervous System**, v. 35, n. 2, p. 343–348, 2019.

PORTELA, L. V. C. et al. The serum S100B concentration is age dependent. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 950–952, 2002.

RAJEWSKA-RAGER, A. et al. **Longitudinal assessment of S100B serum levels and clinical factors in youth patients with mood disorders** *Scientific Reports*, 2021.

SAHIN, B. E. et al. Plasma biomarkers of brain injury in COVID-19 patients with neurological symptoms. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 439, n. June, p. 120324, ago. 2022.

SCHROETER, M. L.; STEINER, J.; MUELLER, K. Glial pathology is modified by age in mood disorders - A systematic meta-analysis of serum S100B in vivo studies. **Journal of Affective Disorders**, v. 134, n. 1–3, p. 32–38, 2011.

SENAPATI, S. et al. Contributions of human ACE2 and TMPRSS2 in determining host–pathogen interaction of COVID-19. **Journal of Genetics**, v. 100, n. 1, 2021.

STREITBÜRGER, D.-P. et al. Validating Serum S100B and Neuron-Specific Enolase as Biomarkers for the Human Brain – A Combined Serum, Gene Expression and MRI Study. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, p. e43284, 14 ago. 2012.

STRIMBU, K.; TAVEL, J. A. What are biomarkers? **Current Opinion in HIV and AIDS**, v. 5, n. 6, p. 463–466, nov. 2010.

SULLIVAN, B. N.; FISCHER, T. **Age-Associated Neurological Complications of COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis** *Frontiers in Aging Neuroscience*, 2021.

TOPTAN, T. et al. **Case Series of Headache Characteristics in COVID-19: Headache Can Be an Isolated Symptom** *Headache*, 2020.

WOLF, H. et al. Predictive value of neuromarkers supported by a set of clinical criteria in patients with mild traumatic brain injury: S100B protein and neuron-specific enolase on trial. **Journal of Neurosurgery**, v. 118, n. 6, p. 1298–1303, 2013.

ZAYET, S. et al. Clinical features of COVID-19 and influenza: a comparative study on Nord Franche-Comte cluster. **Microbes and Infection**, v. 22, n. 9, p. 481–488, 2020.

ZAZHYTSKA, M. et al. Non-cell-autonomous disruption of nuclear architecture as a potential cause of COVID-19-induced anosmia. **Cell**, v. 185, n. 6, p. 1052–1064.e12, 2022.

ANGELI, F. et al. Electrocardiographic features of patients with COVID-19 pneumonia. **European Journal of Internal Medicine**, v. 78, n. May, p. 101–106, 2020.

ANTALIS, T. M.; BUGGE, T. H.; WU, Q. **Membrane-anchored serine proteases in health and disease**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2011. v. 99

ARRAIS, A. C. et al. S100B protein: general characteristics and pathophysiological implications in the Central Nervous System. **International Journal of Neuroscience**, v. 0, n. 0, p. 000, 2020.

ASTRAND, R.; UNDÉN, J. Clinical Use of the Calcium-Binding S100B Protein, a Biomarker for Head Injury. In: **L'Ameto**. [s.l.: s.n.]. v. 1929p. 679–690.

ASTUTI, I.; YSRAFIL. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2): An overview of viral structure and host response. **Diabetes and Metabolic Syndrome: Clinical Research and Reviews**, v. 14, n. 4, p. 407–412, 2020.

BEZEK, S.; BIBERTHALER, P.; BOGNER-FLATZ, V. **Pathophysiology and clinical implementation of traumatic brain**. [s.l.] INC, 2020.

- BLACKMORE, S. et al. Influenza infection triggers disease in a genetic model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 30, p. E6107–E6116, 2017.
- BOHMWALD, K. et al. Neurologic alterations due to respiratory virus infections. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 12, n. October, p. 1–15, 2018.
- 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, 31 jul. 2020b.
- BRÜSSOW, H. The Novel Coronavirus – A Snapshot of Current Knowledge. **Microbial Biotechnology**, v. 13, n. 3, p. 607–612, 2020.
- BUZHDYGAN, T. P. 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**, v. 146, n. September, p. 105131, 2020.
- CHAI, X. et al. **Specific ACE2 expression in cholangiocytes may cause liver damage after 2019-nCoV infection** bioRxiv, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1101/2020.02.03.931766>>
- CHAVES, M. L. et al. Serum levels of S100B and NSE proteins in Alzheimer’s disease patients. **Journal of Neuroinflammation**, v. 7, n. 1, p. 6, 2010.
- CHEN, N. et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020a.
- CHEN, X. et al. Assessment of a multiple biomarker panel for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. **BMC Neurology**, v. 16, n. 1, p. 1–7, 2016.
- CHEN, Z. L. et al. Distribution of the COVID-19 epidemic and correlation with population emigration from Wuhan, China. **Chinese medical journal**, v. 133, n. 9, p. 1044–1050, 2020b.
- CIRILLO, C. et al. Proinflammatory stimuli activates human-derived enteroglia cells and induces autocrine nitric oxide production. **Neurogastroenterology and Motility**, v. 23, n. 9, p. 10–12, 2011.
- CONDE, J. N.; SCHUTT, W. R.; GORBUNOVA, E. E. Infect Primary Human Endothelial Cells and Induce Inflammatory and Procoagulative Responses. v. 11, n. 6, p. 1–7, 2020.
- CONNORS, J. M.; LEVY, J. H. Thromboinflammation and the hypercoagulability of COVID-19. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 18, n. 7, p. 1559–1561, 2020.
- COSTA, D. C. A.; SILVA, L. R. DOS S.; COERTJENS, M. Mecanismos e funções da proteína S100B durante a hipóxia: Uma revisão de literatura. **Revista Neurociências**, v. 21, n. 3, p. 408–419, 2013.
- DANEMAN, R.; PRAT, A. The Blood–Brain Barrier. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 7, n. 1, p. a020412, 5 jan. 2015.
- DAVIGNON, J.-L. et al. Modulation of T-cell responses by anti-tumor necrosis factor treatments in rheumatoid arthritis: a review. **Arthritis Research & Therapy**, v. 20, n. 1, p. 1–9, 2018.

DE FELICE, F. G. et al. Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) and the Central Nervous System. **Trends in Neurosciences**, v. 43, n. 6, p. 355–357, 2020.

DIAO, B. et al. Human kidney is a target for novel severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021.

DURRANT, D. M.; GHOSH, S.; KLEIN, R. S. The Olfactory Bulb: An Immunosensory Effector Organ during Neurotropic Viral Infections. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 7, n. 4, p. 464–469, 20 abr. 2016.

FAN, Z. et al. Clinical Features of COVID-19-Related Liver Functional Abnormality. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 18, n. 7, p. 1561–1566, 2020.

FANG, X. et al. Epidemiological, comorbidity factors with severity and prognosis. **Aging**, v. 12, n. 13, p. 12493–12503, 2020.

FERNANDEZ, M. V.; PINTO, H. A. Estratégia intergovernamental de atuação dos estados brasileiros: o Consórcio Nordeste e as políticas de saúde no enfrentamento à Covid-19. **Saúde em Redes**, v. 6, n. 2, p. 7–21, 2020.

FIORI, P. et al. Neuron specific enolase in a SARS CoV2 patient. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 429, n. 2021, p. 119815, 2021.

FLODEN, A. M.; WATT, J. A.; BRISSETTE, C. A. Borrelia burgdorferi Enolase Is a Surface-Exposed Plasminogen Binding Protein. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27502, 8 nov. 2011.

FLUMIGNAN, V. Z. Timeline and Outcome of Anosmia and Ageusia Associated with Covid-19 Infection: A Case Report. **Advancements in Case Studies**, v. 2, n. 4, p. 2–5, 12 maio 2020.

GANTI, L.; SERRANO, E.; TOKLU, H. Z. Can Neuron Specific Enolase Be a Diagnostic Biomarker for Neuronal Injury in COVID-19? **Cureus**, v. 12, n. 10, p. 10–13, 2020.

GAO, G. et al. Surveillance of SARS-CoV-2 in the environment and animal samples of the Huanan Seafood Market. [s.d.].

GERLACH, R. et al. Active secretion of S100B from astrocytes during metabolic stress. **Neuroscience**, v. 141, n. 4, p. 1697–1701, 2006.

GOYAL, A. et al. S100b as a Prognostic Biomarker in Outcome Prediction for Patients with Severe Traumatic Brain Injury. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 11, p. 946–957, jun. 2013.

GUAN, W. et al. Clinical Characteristics of Coronavirus Disease 2019 in China. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 18, p. 1708–1720, 30 abr. 2020.

GUPTA, S. et al. Role of NF- κ B signaling pathway in increased tumor necrosis factor- α -induced apoptosis of lymphocytes in aged humans. **Cell Death and Differentiation**, v. 12, n. 2, p. 177–183, 2005.

HAFNER, A. et al. Neuroprotective role of γ -enolase in microglia in a mouse model of Alzheimer's disease is regulated by cathepsin X. **Aging Cell**, v. 12, n. 4, p. 604–614, 1 ago. 2013.

HAFNER, A.; OBERMAJER, N.; KOS, J. Gamma-1-Syntrophin Mediates Trafficking of Gamma-Enolase towards the Plasma Membrane and Enhances Its Neurotrophic Activity. **Neurosignals**, v. 18, n. 4, p. 246–258, 2010.

HAQUE, A. et al. **Targeting Enolase in Reducing Secondary Damage in Acute Spinal Cord Injury in Rats** *Neurochemical Research*, 2017.

HE, A. J.; SHI, Y.; LIU, H. Crisis governance, Chinese style: distinctive features of China's response to the Covid-19 pandemic. *Policy Design and Practice*, v. 3, n. 3, p. 242–258, 2020.

HENRY, J. et al. Parkinsonism and neurological manifestations of influenza throughout the 20th and 21st centuries. *Parkinsonism and Related Disorders*, v. 16, n. 9, p. 566–571, 2010.

HUANG, C. et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. *The Lancet*, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

HUTTUNEN, H. et al. ... outgrowth and cell survival by amphotericin and S100 proteins through RAGE *J Biol Chem*, v. 56, n. Viikinkaari 5, 2000.

IASC. Interim guidance: public health and social measures for COVID-19 preparedness and response in low capacity and humanitarian settings. *Inter - Agency Standing Committee*, n. 1, p. 1–29, 2020.

IMMOVILLI, P. et al. COVID-19 mortality and ICU admission : the Italian experience. p. 9–11, 2020.

KALICIŃSKA, E. et al. Immunosuppression as a hallmark of critical covid-19: Prospective study. *Cells*, v. 10, n. 6, p. 1–13, 2021.

KATO, J.; SVENSSON, C. I. **Role of extracellular damage-associated molecular pattern molecules (DAMPs) as mediators of persistent pain**. 1. ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2015. v. 131

KENNEDY, D. M. et al. Modeling the effects of intervention strategies on COVID-19 transmission dynamics. *Journal of Clinical Virology*, v. 128, n. May, p. 104440, 2020.

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, 2021.

KLEINDIENST, A. et al. Dynamics of S100B release into serum and cerebrospinal fluid following acute brain injury. *Acta Neurochirurgica, Supplementum*, v. 106, n. 106, p. 247–250, 2009.

LECHIEN, J. R. et al. ACE2 & TMPRSS2 Expressions in Head & Neck Tissues: A Systematic Review. *Head and Neck Pathology*, v. 15, n. 1, p. 225–235, 2021.

LEE, J. et al. Lymphopenia as a biological predictor of outcomes in COVID-19 patients: A nationwide cohort study. *Cancers*, v. 13, n. 3, p. 1–15, 2021.

LEÓN-LOZANO, M. Z. et al. **Cerebrospinal fluid levels of neuron-specific enolase predict the severity of brain damage in newborns with neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy treated with hypothermia** *PLoS ONE*, 2020.

LI, Z. et al. Caution on Kidney Dysfunctions of COVID-19 Patients. *SSRN Electronic Journal*, p. 1–25, 2020.

LIAO, M. et al. Title page The landscape of lung bronchoalveolar immune cells in COVID-19 revealed by single-cell RNA sequencing. 2020.

LIGUORI, C. et al. Brain , Behavior , and Immunity Subjective neurological symptoms frequently occur in patients with SARS- CoV2 infection. **Brain Behavior and Immunity**, v. 88, n. May, p. 11–16, 2020.

LIM, M. A. et al. Multiorgan Failure With Emphasis on Acute Kidney Injury and Severity of COVID-19: Systematic Review and Meta-Analysis. **Canadian Journal of Kidney Health and Disease**, v. 7, 2020.

LOPES-PACHECO, M. et al. Pathogenesis of Multiple Organ Injury in COVID-19 and Potential Therapeutic Strategies. **Frontiers in Physiology**, v. 12, n. January, p. 1–23, 2021.

LU, R. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020.

LUO, X. et al. Prognostic Value of C-Reactive Protein in Patients With Coronavirus 2019. v. 71, 2020.

MAO, L. et al. Neurological Manifestations of Hospitalized Patients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Case Series Study. **SSRN Electronic Journal**, 2020.

MARTONIK, D. et al. The role of th17 response in COVID-19. **Cells**, v. 10, n. 6, 2021.

MATÍAS-GUIU, J. et al. Should we expect neurological symptoms in the SARS-CoV-2 epidemic? **Neurología (English Edition)**, v. 35, n. 3, p. 170–175, 2020.

MEHTA, P.; FAJGENBAUM, D. C. Is severe COVID-19 a cytokine storm syndrome: a hyperinflammatory debate. **Current opinion in rheumatology**, v. 33, n. 5, p. 419–430, 2021.

MERCIER, E. et al. Predictive value of neuron-specific enolase for prognosis in patients with moderate or severe traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis. **CMAJ Open**, v. 4, n. 3, p. E371–E382, 22 jul. 2016.

MINAMI, T.; IWATA, Y.; WADA, T. Renal complications in coronavirus disease 2019: a systematic review. **Inflammation and Regeneration**, v. 40, n. 1, 2020.

MOORE, B. W. A soluble protein characteristic of the nervous system. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 19, n. 6, p. 739–744, 1965.

ONDRUSCHKA, B. et al. S100B and NSE as useful postmortem biochemical markers of traumatic brain injury in autopsy cases. **Journal of Neurotrauma**, v. 30, n. 22, p. 1862–1871, 2013.

PATEL, S. K. et al. From gene to protein-experimental and clinical studies of ACE2 in blood pressure control and arterial hypertension. **Frontiers in Physiology**, v. 5 JUN, n. June, p. 1–13, 2014.

PETZOLD, A. et al. Cerebrospinal fluid (CSF) and serum S100B: Release and wash-out pattern. **Brain Research Bulletin**, v. 61, n. 3, p. 281–285, 2003.

PIAST, M. et al. Molecular evolution of enolase. **Acta biochimica Polonica**, v. 52, n. 2, p. 507–513, 2005.

PLATT, M. P. et al. Th17 lymphocytes drive vascular and neuronal deficits in a mouse model of

postinfectious autoimmune encephalitis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 117, n. 12, p. 6708–6716, 2020.

POLCYN, R. et al. Enolase and Acute Spinal Cord Injury. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 08, n. 06, p. 139–148, 2017.

PONTELLI, M. C. et al. Infection of human lymphomononuclear cells by SARS-CoV-2. 2020.

PORTELA, L. V. C. et al. The serum S100B concentration is age dependent. **Clinical Chemistry**, v. 48, n. 6, p. 950–952, 2002.

QIN, C. et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 2020.

QIU, C. et al. Olfactory and Gustatory Dysfunction as an Early Identifier of COVID-19 in Adults and Children: An International Multicenter Study. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)**, v. 163, n. 4, p. 714–721, 2020.

REYNOLDS, J. L.; MAHAJAN, S. D. SARS-COV2 Alters Blood Brain Barrier Integrity Contributing to Neuro-Inflammation. p. 4–6, 2021.

RITCHIE, K.; CHAN, D. **The emergence of cognitive COVIDWorld Psychiatry**, 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J. et al. COVID-19 in Latin America: The implications of the first confirmed case in Brazil. **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 35, n. January, 2020.

SCHAF, D. V. et al. S100B and NSE serum levels in patients with Parkinson's disease. **Parkinsonism and Related Disorders**, v. 11, n. 1, p. 39–43, 2005.

SHEN, L. W. et al. TMPRSS2: A potential target for treatment of influenza virus and coronavirus infections. **Biochimie**, v. 142, p. 1–10, 2017.

SHI, S. et al. Association of Cardiac Injury with Mortality in Hospitalized Patients with COVID-19 in Wuhan, China. **JAMA Cardiology**, v. 5, n. 7, p. 802–810, 2020.

SHULTZ, J. M. et al. Pandemic March: 2019 Coronavirus Disease's First Wave Circumnavigates the Globe. **Disaster Medicine and Public Health Preparedness**, v. 14, n. 5, p. e28–e32, 2020.

SOLIZ, J. et al. Coping with hypoxemia: Could erythropoietin (EPO) be an adjuvant treatment of COVID-19? **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 279, n. June, p. 103476, 2020.

SORCI, G. et al. The Danger Signal S100B Integrates Pathogen– and Danger–Sensing Pathways to Restrain Inflammation. **PLoS Pathogens**, v. 7, n. 3, p. e1001315, 10 mar. 2011.

SOUZA, W. V. DE et al. Cem dias de COVID-19 em Pernambuco, Brasil: a epidemiologia em contexto histórico. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, n. 11, 2020.

STOCCHERO, C. M. A. et al. A Proteína S100B e o exercício físico Protein S100B and physical exercise. **Rev Bras Cineantropom Desempenho Hum**, v. 12, n. 1, p. 77–81, 2010.

SU, H. et al. Renal histopathological analysis of 26 postmortem findings of patients with COVID-19 in China. **Kidney International**, v. 98, n. 1, p. 219–227, 2020.

TAKANO, K. et al. Elevation of neuron specific enolase and brain iron deposition on

susceptibility-weighted imaging as diagnostic clues for beta-propeller protein-associated neurodegeneration in early childhood: Additional case report and review of the literature.

American Journal of Medical Genetics, Part A, v. 170, n. 2, p. 322–328, 2016.

TARASIUK, J. et al. The comparisons of blood plasma and cerebrospinal fluid S100B protein concentrations in patients with Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, and multiple sclerosis. **Progress in Health Sciences**, v. 1, n. 1, p. 22–27, 2019.

THELIN, E. P.; NELSON, D. W.; BELLANDER, B. M. **A review of the clinical utility of serum S100B protein levels in the assessment of traumatic brain injury** *Acta Neurochirurgica*, 2017.

TRAMONTINA, A. C. et al. Secretion of S100B, an astrocyte-derived neurotrophic protein, is stimulated by fluoxetine via a mechanism independent of serotonin. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 32, n. 6, p. 1580–1583, 2008.

WALLS, A. C. et al. Structure, Function, and Antigenicity of the SARS-CoV-2 Spike Glycoprotein. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 281–292.e6, 2020.

WANG, D. et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients with 2019 Novel Coronavirus-Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020.

WEBER, D. J.; ZIMMER, D. B. The calcium-dependent interaction of S100B with its protein targets. **Cardiovascular Psychiatry and Neurology**, v. 2010, 2010.

WHO. Responding to community spread of COVID-19. **Interim Guidance 7 March**, n. March, p. 1–6, 2020.

WU, Y. et al. Nervous system involvement after infection with COVID-19 and other coronaviruses. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 87, n. March, p. 18–22, 2020.

XU, H. et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. **International Journal of Oral Science**, v. 12, n. 1, p. 1–5, 2020.

YANG, X. et al. Clinical course and outcomes of critically ill patients with SARS-CoV-2 pneumonia in Wuhan, China : a single-centered , retrospective , observational study. **The Lancet Respiratory**, v. 8, n. 5, p. 475–481, [s.d.].

ZHANG, L. et al. **S100B attenuates microglia activation in gliomas: Possible role of STAT3 pathway** *Glia*, 2011.

ZHOU, S. et al. **S100B promotes microglia M1 polarization and migration to aggravate cerebral ischemic inflammation** *Inflammation Research*, 2018.

ZHOU, Y. et al. Pathogenic T-cells and inflammatory monocytes incite inflammatory storms in severe COVID-19 patients. **National Science Review**, v. 7, n. 6, p. 998–1002, 1 jun. 2020.

ZHU, N. et al. **A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019** *New England Journal of Medicine*, 2020.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
NÚCLEO DE PESQUISA EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA
SUELY GALDINO NUPIT-SG

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS)

IDENTIFICAÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES PARA INFECCIOSIDADE,
PATOGENIA E TRANSMISSIBILIDADE DA COVID-19

Convidamos o (a) Sr. (a) para participar como voluntário (a) da pesquisa “Identificação de novos biomarcadores para infecciosidade, patogenia e transmissibilidade da COVID-19”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa, CPF: 01458350061, Av. Conselheiro Rosa e Silva 1829, Tamarineira-Recife-PE, (81) 9 9813-0818, michelle.rosa@ufpe.br. Também participam desta pesquisa os pesquisadores Profa Dra. Maira Galdino da Rocha Pitta (mgrpitta@gmail.com), Profa Dra. Michelly Cristiny Pereira (michelly.pereira@ufpe.br), Profa Dra. Rosa Amália Firemann Dutra, (rosa.dutra@ufpe.br), Dr. Marcos Vinícius Foguel (mvfoguel@gmail.com), Ryan Cordeiro Silva (ryan.cordeiro@ufpe.br).

Todas as suas dúvidas podem ser esclarecidas com o responsável por esta pesquisa. Apenas quando todos os esclarecimentos forem dados e você concorde com a realização do estudo, pedimos que rubrique as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma via lhe será entregue e a outra ficará com o pesquisador responsável.

O (a) senhor (a) estará livre para decidir participar ou recusar-se. Caso não aceite participar, não haverá nenhum problema, desistir é um direito seu, bem como será possível retirar o consentimento em qualquer fase da pesquisa, também sem nenhuma penalidade.

A pandemia de coronavírus (Covid-19) terá impactos significativos e ainda não completamente dimensionados sobre a sociedade. Trata-se de um evento inédito na história, dado que, no passado, epidemias parecidas se desenvolveram em um cenário de muito menor integração entre países e pessoas, divisão do trabalho e densidade populacional. Em tal contexto, a ciência e inovação se encontra na busca de novas formas de estudo e enfrentamento da pandemia da COVID19. Sabe-se que a COVID-19 provoca tosse seca, febre e, nos casos mais grave, dificuldade de respirar, podendo evoluir para o óbito. Portanto, nós solicitamos a sua colaboração, como infectado ou não de COVID-19, neste

estudo cujo objetivo principal é aumentar o conhecimento sobre desse vírus e, dessa forma, podermos desenvolver estratégias eficazes para diminuir o número de casos novos, prevenir as complicações pulmonares e neurais e desenvolver novos medicamentos.

Para isso, precisamos coletar um pouco de sangue de alguma veia do braço. A coleta será feita no braço, e a quantidade coletada é equivalente a duas colheres de sopa (10-15 ml). Você permanecerá em uma posição adequada para o procedimento, nós limparemos o braço com álcool, e todo material usado na coleta é descartável. A coleta será feita por profissionais treinados, competentes e orientados para reduzir os riscos. Caso o senhor (a) apresente resultado positivo para infecção pelo vírus, nós solicitamos que a coleta do seu sangue possa ser realizada em outros momentos da sua doença e recuperação, para podermos compreender melhor como a COVID-19 altera ou não seu sistema imunológico. As coletas de sangue serão realizadas durante o decorrer da doença, nos dias 0, 7, 14 e 21 dias após o primeiro encontro com a equipe do projeto.

Para a coleta de Swab (cotonete específico), uma enfermeira capacitada irá posicionar o participante em uma cadeira de forma a ficar com a cabeça inclinada para a parte de trás. Em seguida irá de forma cuidadosa inserir o cotonete em ambas as cavidades nasais (orifícios do nariz) para a coleta de material. Para a coleta de saliva, a enfermeira irá oferecer um recipiente para que o participante “cuspa” 10 vezes até cobrir o fundo do recipiente. Em seguida, o próprio participante fechará o recipiente e entregará a enfermeira para a devida higienização.

Os riscos envolvidos nesse projeto se referem à coleta de sangue, este procedimento é incomodo e o seu braço pode ficar dolorido ou apresentar um hematoma, que é uma área arroxeadada no local da coleta, a qual pode ser minimizada com compressas de gelo. A coleta de swab pode causar sangramento momentâneo, derivado de um machucado na mucosa, dor local por até algumas horas e crise de espirros em caso de pessoas alérgicas. Para tal, será fornecido suprimentos (lenço descartável, álcool, etc.) e orientações para higiene respiratória/etiqueta da tosse e espirros. A coleta de saliva não apresenta riscos ao paciente. Pode ocorrer também constrangimento ao responder as perguntas da ficha clínica. No entanto, esse constrangimento será minimizado uma vez que iremos garantir local reservado e liberdade para não responder questões constrangedoras. Também asseguramos a confidencialidade e a privacidade, a proteção da imagem e a não estigmatização, garantindo a não utilização das informações em prejuízo das pessoas e/ou das comunidades, inclusive em termos de auto-estima, de prestígio e/ou econômico – financeiro.

Com relação aos benefícios, o senhor (a), além de saber o seu diagnóstico do coronavírus, será submetido a uma avaliação completa acerca das células e moléculas do seu sistema imunológico e, caso seja detectada alguma alteração, o senhor (a) será comunicado e orientado a procurar atendimento clínico adequado. Ademais, o tema traz como benefício para a sociedade, a construção do conhecimento a respeito do tema COVID-19.

Esclarecemos que os participantes dessa pesquisa têm plena liberdade de se recusar a participar do estudo e que esta decisão não acarretará penalização por parte dos pesquisadores. Todas as informações desta pesquisa serão

confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa provenientes das amostras coletadas, ficarão armazenados em arquivos digitais, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Michelle Melgarejo da Rosa, no endereço acima informado, pelo período de mínimo 5 anos após o término da pesquisa.

Nada lhe será pago e nem será cobrado para participar desta pesquisa, pois a aceitação é voluntária, mas fica também garantida a indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extra-judicial. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação).

Um biobanco (armazenamento de amostras) será formado no laboratório de Imunomodulação (controle das reações no organismo) e novas Abordagens Terapêuticas (LINAT-UFPE), onde o soro proveniente do sangue desses pacientes positivos para COVID-19 será armazenado em congelador a -80°C para posteriores análises. Essas amostras além de serem utilizados no projeto em questão, serão utilizadas para qualquer projeto que se utilizem da temática e proporcione avanços científicos na área e contribua de forma positiva para a sociedade.

O participante será comunicado do armazenamento de sua amostra previamente e da utilização da sua amostra para esse projeto entre outros que virão, além de informado sobre a perda ou destruição de sua amostra ou o encerramento do biobanco.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, o (a) senhor (a) poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n - 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 - e-mail: cepccs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO (A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo “Identificação de novos biomarcadores para infecciosidade, patogenia e transmissibilidade da COVID-19” como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pelo(a) pesquisador (a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento).

Local e data _____

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome:

Nome:

Assinatura:

Assinatura:

APÊNDICE B - ARTIGO SUBMETIDO A REVISTA “ JOURNAL OF
NEUROVIROLOGY”

BRAIN DAMAGE BIOMARKERS INDUCED IN THE SERUM BY COVID-19 IN
PATIENTS FROM NORTHEAST, BRAZIL

Ryan C. Silva¹, Michelle M. da Rosa^{1,2*}, Heloísa I. Leão¹, Eduardo D. L. Silva¹ Nathália
T. Ferreira¹, Amanda P. B. Albuquerque¹, Gisele S. Duarte⁴, André M. Siqueira⁴, Michelly
C. Pereira^{1,3}, Moacyr J. B. M. Rêgo^{1,2}, Maira G. R. Pitta^{1,2}.

¹ Laboratory of Immunomodulation and New Therapeutic Approaches (LINAT),
Research Center in Immunomodulation and New Therapeutic Approaches Suely Galdino
(Nupit SG), Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE, Brazil.

² Biochemistry Department, Federal University of Pernambuco (UFPE), Recife-PE,
Brazil.

³ Physiology and Pharmacology Department, Federal University of Pernambuco (UFPE),
Recife-PE, Brazil.

⁴ Instituto Nacional de Infectologia Evandro Chagas: INI - Fiocruz

*Correspondent Author: michelle.rosa@ufpe.br

ABSTRACT

Neurologic symptoms have been often reported in COVID-19 infection. In the present study, we evaluated brain damage associated with COVID-19-positive patients using the neurological biomarkers S100B and neuron-specific enolase (NSE) in a population from Northeast, Brazil. A total of 36 healthy controls (G1) and 141 patients with confirmed COVID-19 were enrolled in this study. Positive-COVID-19 patients were divided into two groups following severity of illness by National Institute of Health (NIH) criteria, 76 patients with mild symptoms for COVID-19 and (G2) and 65 with acute respiratory conditions requiring supplemental oxygenation in Intensive care unit (ICU) admission (G3). A follow-up study was conducted with 23 patients from G2 after 14 (D14) and 21 (D21) after the onset of symptoms. Serum levels of NSE and S100B were measured using the enzyme-linked immunoassay method (ELISA). Results revealed a significant positive association between G3 patients and S100B serum expression ($p = 0.0403$). The serum levels of NSE were also significantly enhanced in the G3 group compared to the control ($p < 0.0001$) and G2 group ($p < 0.0001$). In addition, no association was estimated between clinical features as symptoms and oxygenation status with NSE or S100B serum expression. The follow-up study demonstrated a decrease over time (21 days) in NSE serum expression ($p < 0.0001$). The results suggested that brain damage is followed by acute virus exposure, without long-term effects. Future work examining COVID-19 recovery will shed light on chronic neurological damage of COVID-19 infection.

Keywords: Biomarker; COVID-19; Follow-up; NSE; S100B

1. INTRODUCTION

From early 2020 on, the world population has shared efforts to contain the spread of COVID-19 disease caused by the SARS-CoV-2 virus (Chen et al. 2020). The disease not only induces respiratory complications but also registers a variety of neurologic symptoms including ataxia, anosmia, ageusia, dizziness, headache, impaired consciousness, stroke, and viral encephalitis (Garg et al 2021; Flumingnan 2020; Mao et al. 2020). A handful of signalings have been reported explaining the virus's entrance to the central nervous system (CNS). Firstly, a retrograde transsynaptic transport along neuronal synapses from peripheral neurons to the olfactory bulb has been proposed (Meinhardt et al. 2021). Secondly, the SARS-CoV-2-induced inflammation leads to damage to the blood-brain barrier (BBB) providing access to the virus into the

CNS. Then, in the brain, SARS-CoV-2 directly interacts with endothelial cells in an Angiotensin Converter Enzyme receptors(ACE2)-dependent manner (Buzhdygan et al. 2020).

Biomarkers for neuronal damage have been revealing crucial insights into acute and long-term effects of brain dysfunction-related to diseases. For instance, the neuron- specific protein enolase (NSE) is a glycolytic enzyme highly specific for neurons and peripheral neuroendocrine cells. Usually, it is located in the cytoplasm of cells, but increased levels in serum or cerebrospinal fluid (CSF) are detected in cases of brain tissue damage, such as traumatic brain injury (TBI) and stroke(Lu et al. 2015; Thelin et al. 2016). S100B is a calcium-binding B protein induced by neurological inflammations and infections with robust expression in the nucleus and cytoplasm of astrocytes (Michetti et al. 2021). Both protein levels in CSF or serum have been associated with mild TBI patients and have demonstrated a good value to screen intracranial injury in the medical clinic field(Thelin et al. 2017).

In the context of the COVID-19 pandemic, the literature has shown an association between NSE serum values and COVID-19 severity (Fiori et al. 2021; Wei et al. 2020; Ganti, Serrano, and Toklu 2020). Furthermore, S100B expression in COVID-19 patients elicits inflammation-related to multiple neurological symptoms during acute infection (Aceti et al. 2020; Sahin et al. 2022).

In view of this, this study aims to investigate the serum expression of neuronal damage biomarkers S100B and NSE in COVID-19-positive patients and the association between neurological biomarkers and neurologic symptoms during the acute phase of the disease and post-contamination in a population from Northeast, Brazil. We hypothesized that markers of neuronal damage may provide advanced differentiation in COVID-19 patients and elucidate a more refined therapeutic strategy to accompany long-term neurologic consequences of the COVID-19 infected population.

2. METHODS

2.1 VOLUNTEERS RECRUITMENT

This study recruited 141 patients from COVID-19 Screening at Clinics Hospital – Federal University of Pernambuco, Brazil, and Mestre Vitalino Hospital of Caruaru to participate. Clinical information and blood samples were collected from all patients from 2nd semester of 2020 to 1st semester of 2021. The study was conducted with 76 patients positive for SARS-CoV-2 with mild neurological symptoms such as cough, headache, anosmia, ageusia, and myalgia grouped as G2. Further, 65 COVID patients with supplemental oxygenation at the Intensive care unit (ICU) were grouped in G3. Both G2 and G3 groups were classified using National Institutes of Health (NIH) symptom severity criteria as mild and severely ill, respectively. The control group engaged 36 healthy individuals and negative for COVID-19 (G1). The date of disease onset was defined as the day when symptoms appeared. A follow-up study combining 23 patients from the G2 group had serum collection after 14 and 21 days of the disease onset.

2.2 REAL-TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (RT-PCR) ASSAY FOR SARS-COV-2

Nasopharyngeal swab samples were collected to extract SARS-CoV-2 RNA from patients suspected of having COVID-19. Two target genes for SARS-CoV-2, RNA- dependent RNA polymerase (RdRP) and SARS-CoV2 envelope protein (E), were tested during the RT-PCR assay using a SARS-CoV-2 nucleic acid detection kit according to the manufacturer's protocol (Charité protocol, Biomanguinhos, Brazil). RT-PCR assay was performed under the following conditions: incubation at 50 °C for 15 min and 95 °C for 5 min, 45 cycles of denaturation at 94 °C for 15 s, and extension and collection of fluorescence signal at 55 °C for 45 s. A cycle threshold value (Ct value) of less than 39 was defined as positive.

2.3 BIOMARKERS MEASUREMENT

Peripheral venous blood was collected into a serum separator tube (SST). Samples were centrifuged at 700 ×g for 10 min to collect serum samples and right after were stored at – 80 °C. A single run of ELISA assay was carried out for NSE and S100B in serum samples. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) kits were used according to the manufacturer's instructions to determine S100B (DY1820-05) and NSE (DY5169- 05) (R&D Systems). The data was presented as median values.

2.4 STATISTICAL ANALYSIS

The Student's t-tests were used for statistical analysis and p values < 0.05 were statistically significant. Serum values for both biomarkers and demographic parameters are expressed as the median, maximum, and minimum. Friedman's test was used to evaluate whether changes in serum NSE values occurred within groups over time. All quantitative data were plotted with GraphPad Prism® 8.4.2.

3. RESULTS

3.1 RECRUITMENT, CLINICAL AND DEMOGRAPHIC EVALUATION OF RESEARCH VOLUNTEERS

The study included 141 patients with a positive diagnosis for COVID-19 by the RT- PCR method with a mean age of 43 (±13) years, divided into 44% (N=62) women and 56% (N=79) men. The control group (G1) consisted of 36 healthy volunteers with a median age of 53 years old. Positive individuals for COVID-19 were divided into Group 2 (G2) (53%, N=76), which had only mild symptoms such as headache, myalgia, ageusia, anosmia, and Group 3 (G3) (47%, N =65), which required hospitalization in the ICU due to the severe condition of COVID-19. Among G3 individuals, supplemental oxygenation was needed due to SpO₂ status, managed with tracheal intubation (TI) (N=10), nasal cannula (NC) with 6 L/min air-flow (N=13) or nonrebreathing mask (NRM) with 10 L/Min (N=42). Headache (66%, N=50) and Anosmia (59%, N=45) were the most reported symptom in group G2, while dyspnea in G3 (69%, N= 45). Table 1 shows the clinical data from patients recruited in this study.

Table 1. Clinical parameters of patients positive for COVID-19 and healthy controls.
 *Asma; **Cardiovascular disease.

Clinical parameters	Control group (G1) (N=36)	Mild COVID-19 (G2) (N=76)	Severe COVID-19(G3) (N=65)
Women, N (%)	14 (39%)	41 (54%)	21 (32%)
Men, N (%)	22 (61%)	35 (46%)	44 (68%)
Median age (SD)	53 (22-77)	37 (22-73)	51 (21-81)
Comorbidities, N (%)			
Hypertension		11 (14%)	13 (20%)
Diabetes		-	5 (8%)
Others		3 (4%)*	1 (1,5%) **
Symptoms, N (%)			
Dyspnea	-	11 (17%)	45 (69%)
Myalgia	-	28 (43%)	16 (24%)
Headache	-	50 (66%)	19 (30%)
Anosmia	-	45 (59%)	-
Ageusia	-	38 (50%)	-

3.2 SERUM MEASUREMENT OF S100B AND NSE IN CONTROL GROUP (G1), MILD COVID-19 (G2), AND ICU PATIENTS (G3)

S100B was detected in the serum samples of 8 (22%) of the 36 individuals in G1 (median value of 58.00 (38.50 – 121.73) pg/mL). In G2, S100B was detected in 5 (6%) of the 76 patients (median of 64.00 (47.62-279.05) pg/mL). The levels of S100B did not differ from G1 and G2 ($p = 0.4126$). In G3, S100B was detected in 6 (9%) of the 65 patients admitted to the ICU (median 144.00 (59.36-510.07) pg/ml). The statistical analysis showed a significant difference between the G1 and the G3 groups ($p = 0.0403$). However, no substantial increase in S100B levels was quantified among G3 patients when compared to G2 patients ($p = 0.4286$) (Figure 1).

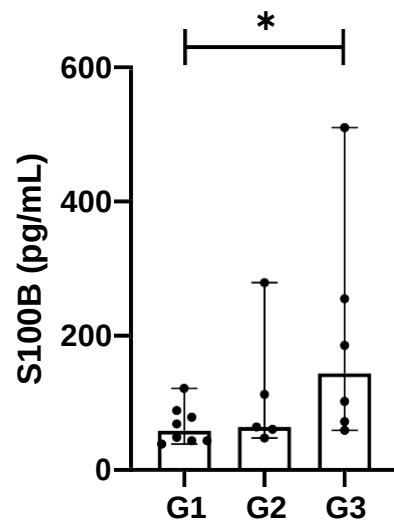


Figure 1. Serum expression of S100B among COVID-19-positive patients and healthy controls. G1 - healthy individuals, control group. G2 patients positive for COVID-19 with mild neurological symptoms. G3 patients positive for COVID-19 admitted to the ICU. * $p < 0.05$ was considered significant compared to G1.

The serum expression of NSE was detected in 140 of 141 samples from COVID-19 patients (99%). In the control group, NSE was detected in 26 (70%) of the 36 serum samples (median value 3440.00 (395.56-8862.22) pg/mL). In G2, NSE was detected in 75 of the 76 serum samples (99%) (median value 3378.00 (578.00-13078.00) pg/mL). No statistical difference was computed between G1 and G2 ($p = 0.2136$). In G3, NSE was detected in all serum samples (median value of 5523.00 (432.67-13739.33) pg/mL). A significant difference was quantified between NSE serum levels in G1 and G3 ($p < 0.0001$), and between G2 and G3 ($p < 0.0001$) (Figure 2).

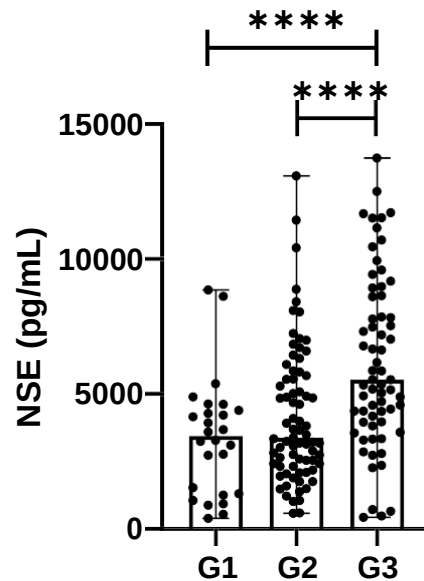


Figure 2. Serum expression of NSE among COVID-19-positive patients and healthy controls. G1 - healthy individuals, control group. G2 patients positive for COVID-19 with mild neurological symptoms. G3 patients positive for COVID-19 admitted to the ICU. **** $p < 0.0001$ was considered significant compared to G1.

3.3 ASSOCIATION AND CORRELATION OF CLINICAL PARAMETERS OF POSITIVE COVID-19 PATIENTS WITH THE LEVELS OF THE S100B AND NSE.

Table 2 associates the clinical manifestation of patients positive for COVID-19 and NSE serum levels. Nevertheless, in our population, clinical parameters did not correlate with serum expression of NSE. Due to the fewer patients that showed serum expression of S100B, the statistical analysis was not processed regarding the association between S100B serum levels and neurological symptoms of COVID-19.

Table 2. The association of serum levels of NSE and clinical parameters of COVID-19 positive patients. Values are expressed in pg/mL. $p > 0.05$ was considered significant.

Clinical features	G2		G3		P value <0.05
	YES	NO	YES	NO	
Ageusia	3,698	3,218	-	-	0.2628/-
Anosmia	3,498	3,438	-	-	0.9937/-

Headache	3,358	3,238	4,373	5,866	0.8451/ 0.0835
Dyspnea	-	-	6,633	5,039	-/0.1463
Fever	4,898	3,178	-	-	0.1537-
Myalgia	3,738	3,338	4,366	5,696	0.839/0.1023
Intubated	-	-	4,406	5,529	-/0.2771

3.4 ANALYSIS OF NSE SERUM LEVELS FOR 21 DAYS POST-COVID-19 IN INDIVIDUALS WITH MILD SYMPTOMS OF THE DISEASE

A follow-up analysis revealed a decline in NSE serum expression over time in 23 patients from G2. The NSE serum levels were measured on 14th (D14) and 21st (D21) days after the onset of COVID-19 symptoms (Table 3).

Table 3. Serum levels of NSE in COVID-19 positive individuals (n=23) on day one (D1), D14, and D21 after the onset of symptoms. C.I. = confidence interval; I.Q.R. = Interquartil range.

Clinical parameters	N		
Women, N (%)	9 (40%)		
Men, N (%)	14 (60%)		
Median (SD)	35 (22-44)		
Days of study	NSE (pg/mL)	C.I. 95%	I.Q.R
1st day (D1)	5748,0	[5852,0- 5784,0]	[905-2075]

14th day (D14)	762,6	[814,8-776,3]	[478-806]
21st day (D21)	1018	[596,0-550,7]	[809-1300]

Figure 3 disclosed the individual values of NSE for each of the 23 participants during the follow-up study. All patients except one exhibited the highest serological values for NSE during the onset of COVID-19 symptoms (D1). In D14, 7 (30%) patients did not present detectable levels of NSE, while in the D21, 9 (39%) participants did not present NSE detectable serum values. Comparisons between groups of segments D1, D14, and D21 were significantly relevant between levels on D0 and D14, and D0 and D21 ($p < 0.0001$), but not between D14 and D21 ($p > 0.999$).

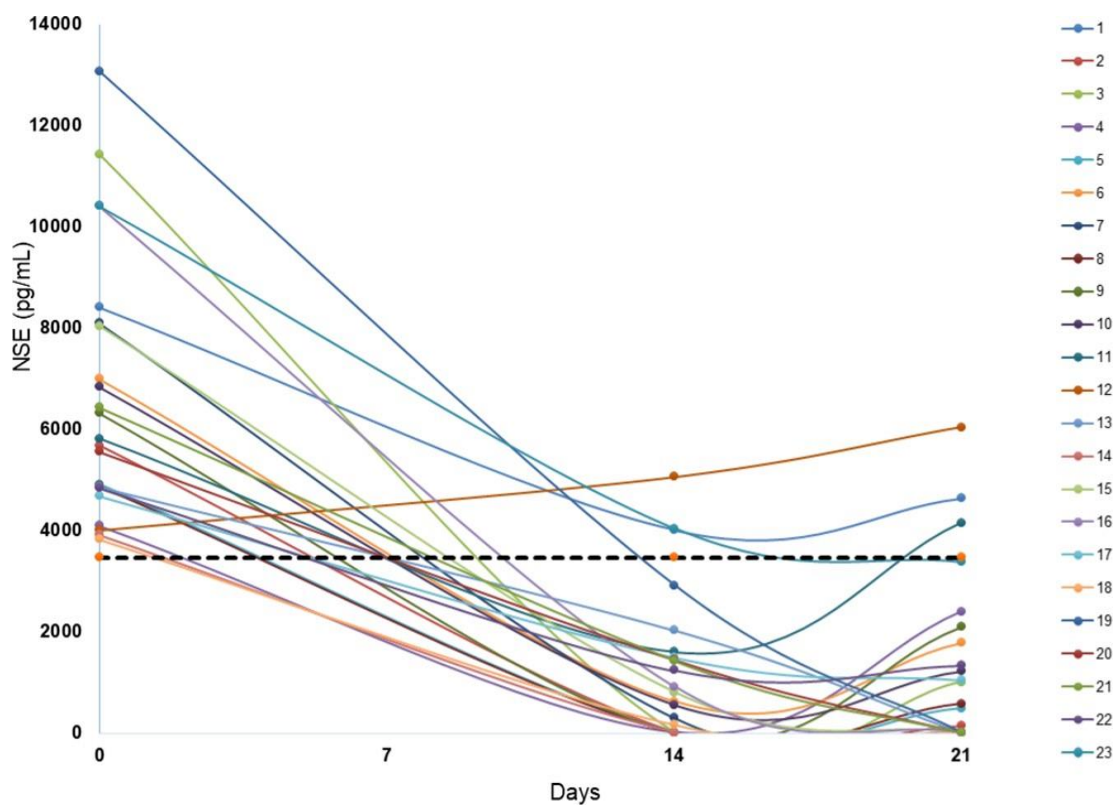


Figure 3. Twenty-one days of serum quantification of NSE after the onset of the COVID-19 disease. Time trajectory of NSE levels in the serum of participants at three different times, D0, D14, and D21. All patients had NSE levels above the upper limit of the reference range on D0, 3 individuals on D14, and 4 individuals on D21. Dashed line = Upper reference limit calculated for the group with mild COVID-19 (G2). Upper reference limit = 3456.5 pg/mL.

4. DISCUSSION

In the present study, we confirmed that patients with severe COVID-19 symptoms presented elevated serum expression of brain damage biomarkers NSE and S100B in Northeast, Brazil. On top of that, patients with mild symptoms of COVID-19 (G2) also showed elevation in NSE serum levels compared to healthy volunteers (G1). Nonetheless, the results did not demonstrate a positive association between COVID-19- specific neurological symptoms and NSE. Finally, a follow-up study showed that after 21 days of post-COVID-19 infection, the levels of NSE significantly decreased suggesting no long-term neurological dysfunction associated with the disease.

The levels of S100B has been evaluated in COVID-19 patients (Aceti et al. 2020; Sahin et al. 2022; Mete et al. 2021; Savarraj et al. 2021; Kokkoris et al. 2022). To date, S100B expression has been associated with neurological conditions and neurological damages as a marker of astrocytic injury (Arrais et al. 2020). However, the serum levels of the protein post COVID-19 infection is yet obscure. The levels of S100B did not increase in the blood across severe COVID-19 patients with neurological symptoms during infection in a population from Turkey (Sahin et al. 2022) nor Italy (Aceti et al. 2020). Consistently, patients positive for COVID-19 have revealed a minimal expression of the virus in glia cells (Meinhardt et al. 2021). In line with these findings, our study did not reveal significant expression of S100B in mild COVID-19 positive patients compared to control in a population from Northeast, Brazil.

In another hand, severe cases from G3 showed a significant increase in S100B compared to mild cases. Similarly, a study correlated S100B and NSE serum levels with enhanced inflammatory markers such as IL6 and CRP post COVID-19 infection in a population from Greece (Kokkoris et al. 2022). One must assume that the levels of S100B or NSE are related with individuals genetically variants, race, geological location, genotype and other factors (Ben Abdesselam et al. 2003; Liu et al. 2005; Miao et al. 2020). Thus, such features must be considered to the validation of biomarkers.

Of note, the Scandinavian Neurotrauma Committee guidelines determine that the absence of S100B in CSF and serum state for non neural impairment even with suggestive clinical evidence. The committee also highlights that S100B levels ≥ 0.1 ng/mL may indicate brain damage resulting from mild trauma (Ananthaharan, Kravdal, and Straume-Naesheim 2018). Here, a total of 4 individuals from G3 had S100B levels showed levels of the protein above this value (highest value of 0.51 ng/mL). Although fewer patients, this result might indicate a mild level of neural injury according to the Committee's values and therefore, restate the importance of monitorization of patients that required ICU admission.

Neuron-specific enolase (NSE) is known to be a cell-specific glycolytic enzyme and its elevation is considered to be a sensitive indicator for assessing the severity of neuronal cell damage in a few conditions (Isgrò et al. 2015). In the context of COVID-19, the levels of NSE has been found elevated in individuals hospitalized from COVID-

19(Fiori et al. 2021; Wei et al. 2020; Ganti et al. 2020; Savarraj et al. 2021; Cione et al. 2021). In the present study, we also quantified elevated serum expression of NSE post COVID-19 infection in severe patients compared to control or mild patients.

The brain susceptibility to SARS-CoV2 infection has been explained by multiple signalings(Kaneko et al. 2021; Erickson et al. 2021) . Symptoms such as anosmia and ageusia have been described as determinant characteristics of neurological manifestation (Kaye et al. 2020). Our results corroborate with Blanco-Palmero et al. that neurologic symptoms during acute COVID-19 infection did not correlate with NSE serum expression. In contrast to our results, Cione et al. reported a strong correlation between dyspnea and enhanced NSE in the serum of Italian COVID-19 positive patients. In addition, our data showed a declination in NSE serum levels after 21-day of SARS-CoV2 exposure, suggesting that the protein may represent a neuro marker for COVID-19 recovery.

The understanding of COVID-19 neurological development is yet incipient, especially concerning the diversity among populations. These findings strengthen the emerging consensus that the outlook on the effect of the virus in the CNS may optimize patient care and follow-up monitorization. Furthermore, our results unveil for the first time the role of NSE and S100B serum expression in patients positive for COVID-19 in Northeast, Brazil, and suggest that NSE lodged a capacity to monitor neurological dysfunction and the recovery of COVID-19 patients.

5. CONCLUSION

Taken together, this study has provided an initial biological understanding of the role of S100B and NSE in COVID-19-positive patients in a population from Northeast Brazil. The elevation of S100B and NSE in the serum of severe patients suggests CNS damage related to acute virus exposure. The follow-up study with NSE confirmed no long-term CNS injury. Neurological symptoms of COVID-19 did not associate with NSE and S100B expression.

The mechanism underpinning CNS vulnerability to SARS-CoV2 infection has been difficult to dissect. Nevertheless, the present study is the first to characterize the expression of these molecules in inhabitants of Northeast, Brazil, as well as is the longest prospective cohort study carried out with brain damage biomarkers in COVID-19 patients.

Even though our study has some limitations according to the number of patients enrolled, and fewer patients expressing S100B in the serum, the results shed light on the monitorization of brain signaling in response to acute and post-21 days of SARS-CoV2 infection. On top of that, the results also held the view that NSE may provide insight regarding the recovering of patients from COVID-19. Future studies must clarify the neurological alterations caused by short and long-term COVID-19 infection.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge the crucial funding of Ministries of Science and Technology and Innovations and Education of Brazil, and Public Ministry of Labor. We are also grateful to the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq), *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and the *Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco* (FACEPE) for financial support. We confirm that this work is original and has not been published elsewhere. We assume that all authors have contributed to the submitted work, and approve the manuscript and its submission to the journal.

REFERENCES

- Abdesselam, Ouardia Ben, Josette Vally, Camilo Adem, Marie-José Foglietti, and Jean-Louis Beaudeau. 2003. "Reference Values for Serum S-100B Protein Depend on the Race of Individuals." *Clinical Chemistry* 49 (5): 836–37. <https://doi.org/10.1373/49.5.836>.
- Aceti, Antonio, Lory Marika Margarucci, Elena Scaramucci, Massimiliano Orsini, Gerardo Salerno, Gabriele Di Sante, Gianluca Gianfranceschi, et al. 2020. "Serum S100B Protein as a Marker of Severity in Covid-19 Patients." *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75618-0>.
- Ananthaharan, Arurann, Gunnhild Kravdal, and Truls Martin Straume-Naesheim. 2018. "Utility and Effectiveness of the Scandinavian Guidelines to Exclude Computerized Tomography Scanning in Mild Traumatic Brain Injury - A Prospective Cohort Study." *BMC Emergency Medicine* 18 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12873-018-0193-2>.
- Arrais, Ana Cristina, Livia Helena M.F. Melo, Bianca Norrara, Marina Albuquerque B. Almeida, Kalina Fernandes Freire, Acydia Madrugá M.F. Melo, Lucidio Clebeson de Oliveira, et al. 2020. "S100B Protein: General Characteristics and Pathophysiological Implications in the Central Nervous System." *International Journal of Neuroscience* 0 (0): 000. <https://doi.org/10.1080/00207454.2020.1807979>.
- Blanco-Palmero, V. A., F. J. Azcárate-Díaz, M. Ruiz-Ortiz, M. I. Laespada-García, P. Rábano-Suárez, A. Méndez-Guerrero, M. Aramendi-Ramos, et al. 2021. "Serum and CSF Alpha-Synuclein Levels Do Not Change in COVID-19 Patients with Neurological Symptoms." *Journal of Neurology* 268 (9): 3116–24. <https://doi.org/10.1007/s00415-021-10444-6>.
- Buzhdygan, Tetyana P., Brandon J. DeOre, Abigail Baldwin-Leclair, Trent A. Bullock, Hannah M. McGary, Jana A. Khan, Roshanak Razmpour, et al. 2020. "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* 146 (September): 105131. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2020.105131>.

- Chen, Nanshan, Min Zhou, Xuan Dong, Jieming Qu, Fengyun Gong, Yang Han, Yang Qiu, et al. 2020. "Epidemiological and Clinical Characteristics of 99 Cases of 2019 Novel Coronavirus Pneumonia in Wuhan, China: A Descriptive Study." *The Lancet* 395 (10223): 507–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7).
- Cione, Erika, Antonio Siniscalchi, Pietro Gangemi, Lucio Cosco, Manuela Colosimo, Federico Longhini, Filippo Luciani, et al. 2021. "Neuron-Specific Enolase Serum Levels in COVID-19 Are Related to the Severity of Lung Injury." *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0251819>.
- Erickson, Michelle A., Elizabeth M. Rhea, Rachel C. Knopp, and William A. Banks. 2021. "Interactions of Sars-Cov-2 with the Blood–Brain Barrier." *International Journal of Molecular Sciences* 22 (5): 1–28. <https://doi.org/10.3390/IJMS22052681>.
- Fiori, Patrizia, Lia Allegorico, Guglielmo Capaldo, Antonio Corbo, Marco Massarelli, Raffaele Gizzi, Chiara Pelosi, et al. 2021. "Neuron Specific Enolase in a SARS CoV2 Patient." *Journal of the Neurological Sciences* 429 (2021): 119815. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2021.119815>.
- Flumignan, Viviane Z. 2020. "Timeline and Outcome of Anosmia and Ageusia Associated with Covid-19 Infection: A Case Report." *Advancements in Case Studies* 2 (4): 2–5. <https://doi.org/10.31031/AICS.2020.02.000544>.
- Ganti, Latha, Enrique Serrano, and Hale Z Toklu. 2020. "Can Neuron Specific Enolase Be a Diagnostic Biomarker for Neuronal Injury in COVID-19?" *Cureus* 12 (10): 10–13. <https://doi.org/10.7759/cureus.11033>.
- Garg, Ravindra Kumar, Vimal Kumar Paliwal, and Ankit Gupta. 2021. "Encephalopathy in Patients with COVID-19: A Review." *Journal of Medical Virology* 93 (1): 206–22. <https://doi.org/10.1002/jmv.26207>.
- Isgrò, Maria Antonietta, Patrizia Bottoni, and Roberto Scatena. 2015. "Neuron-Specific Enolase as a Biomarker: Biochemical and Clinical Aspects." *Advances in Experimental Medicine and Biology* 867: 125–43. https://doi.org/10.1007/978-94-017-7215-0_9.
- Kaneko, Naoki, Sandro Satta, Yutaro Komuro, Sree Deepthi Muthukrishnan, Visesh Kakarla, Lea Guo, Jennifer An, et al. 2021. "Flow-Mediated Susceptibility and Molecular Response of Cerebral Endothelia to SARS-CoV-2 Infection." *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.120.032764>.
- Kaye, Rachel, C. W. David Chang, Ken Kazahaya, Jean Brereton, and James C. Denny. 2020. "COVID-19 Anosmia Reporting Tool: Initial Findings." *Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)*. <https://doi.org/10.1177/0194599820922992>.
- Kokkoris, Stelios, Elisavet Stamataki, Giorgos Emmanouil, Christina Psachoulia, Theodora Ntaidou, Aikaterini Maragouti, Angeliki Kanavou, et al. 2022. "Serum Inflammatory and Brain Injury Biomarkers in COVID-19 Patients Admitted to

- Intensive Care Unit : A Pilot Study.” *ENeurologicalSci* 29 (July): 100434.
<https://doi.org/10.1016/j.ensci.2022.100434>.
- Liu, Jixia, Yongyong Shi, Junxia Tang, Tingwei Guo, Xiuxia Li, Yifeng Yang, Qingying Chen, et al. 2005. “SNPs and Haplotypes in the S100B Gene Reveal Association with Schizophrenia.” *Biochemical and Biophysical Research Communications* 328 (1): 335–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.12.175>.
- Lu, Kaili, Xiaofeng Xu, Shasha Cui, Feng Wang, Bin Zhang, and Yuwu Zhao. 2015. “Serum Neuron Specific Enolase Level as a Predictor of Prognosis in Acute Ischemic Stroke Patients after Intravenous Thrombolysis.” *Journal of the Neurological Sciences* 359 (1–2): 202–6. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2015.10.034>.
- Mao, Ling, Mengdie Wang, Shengcai Chen, Quanwei He, Jiang Chang, Candong Hong, Yifan Zhou, et al. 2020. “Neurological Manifestations of Hospitalized Patients with COVID-19 in Wuhan, China: A Retrospective Case Series Study.” *SSRN Electronic Journal*. <https://doi.org/10.2139/ssrn.3544840>.
- Meinhardt, Jenny, Josefine Radke, Carsten Dittmayer, Jonas Franz, Carolina Thomas, Ronja Mothes, Michael Laue, et al. 2021. “Olfactory Transmucosal SARS-CoV-2 Invasion as a Port of Central Nervous System Entry in Individuals with COVID-19.” *Nature Neuroscience* 24 (2): 168–75. <https://doi.org/10.1038/s41593-020-00758-5>.
- Mete, Ergun, Ramazan Sabirli, Tarik Goren, Ibrahim Turkcuer, Özgür Kurt, And AYLIN KOSELER. 2021. “Association between S100b Levels and Covid-19 Pneumonia: A Case Control Study.” *In Vivo* 35 (5): 2923–28. <https://doi.org/10.21873/INVIVO.12583>.
- Miao, Qiang, Bei Cai, Xuedan Gao, Zhenzhen Su, and Junlong Zhang. 2020. “The Establishment of Neuron-Specific Enolase Reference Interval for the Healthy Population in Southwest China.” *Scientific Reports*. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63331-x>.
- Michetti, Fabrizio, Gabriele Di, Maria Elisabetta, Beatrice Sampaolese, Patrizia Casalbore, Cinzia Volont, Pier Paolo, Rosa Di, Susanna Amadio, and Francesco Ria. 2021. “Neuroscience and Biobehavioral Reviews Growing Role of S100B Protein as a Putative Therapeutic Target for Neurological- and Nonneurological- Disorders” 127 (May): 446–58. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2021.04.035>.
- Sahin, B.E., A. Celikbilek, Y. Kocak, G.T. Saltoglu, N.M. Konar, and L. Hizmali. 2022. “Plasma Biomarkers of Brain Injury in COVID-19 Patients with Neurological Symptoms.” *Journal of the Neurological Sciences* 439 (June): 120324. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2022.120324>.
- Savarraj, Jude, Eun S. Park, Gabriela D. Colpo, Sarah N. Hinds, Diego Morales, Hilda Ahnstedt, Atzhiry S. Paz, et al. 2021. “Brain Injury, Endothelial Injury and Inflammatory Markers Are Elevated and Express Sex-Specific Alterations after COVID-19.” *Journal of Neuroinflammation* 18 (1): 1–12. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02323-8>.

- Thelin, Eric Peter, Emma Jeppsson, Arvid Frostell, Mikael Svensson, Stefania Mondello, Bo Michael Bellander, and David W. Nelson. 2016. "Utility of Neuron-Specific Enolase in Traumatic Brain Injury; Relations to S100B Levels, Outcome, and Extracranial Injury Severity." *Critical Care* 20 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1450-y>.
- Thelin, Eric Peter, David W. Nelson, and Bo Michael Bellander. 2017. "A Review of the Clinical Utility of Serum S100B Protein Levels in the Assessment of Traumatic Brain Injury." *Acta Neurochirurgica*. <https://doi.org/10.1007/s00701-016-3046-3>.
- Wei, Xiuqi, Jingyu Su, Kunyu Yang, Jiazhou Wei, Huimin Wan, Xiaoling Cao, Wenbin Tan, and Hui Wang. 2020. "Elevations of Serum Cancer Biomarkers Correlate with Severity of COVID-19." *Journal of Medical Virology* 92 (10): 2036–41. <https://doi.org/10.1002/jmv.25957>.