

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

ROSANGELA ALINE ANTÃO

ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E BIOQUÍMICAS DO MÚSCULO  
VASTO LATERAL DE PESSOAS COM COVID LONGA

SÃO CARLOS -SP

2025

ROSANGELA ALINE ANTÃO

Alterações Morfofuncionais e Bioquímicas do músculo vasto lateral de pessoas com  
COVID Longa

Dissertação apresentada ao  
Programa Interinstitucional de Pós-  
Graduação em Ciências Fisiológicas,  
do Departamento de Ciências  
Fisiológicas da Universidade Federal  
de São Carlos, para obtenção do título  
de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anabelle Silva  
Cornachione

São Carlos-SP

2025

Antão, Rosangela Aline

Alterações morfofuncionais e bioquímicas do músculo vasto lateral de pessoas com COVID Longa / Rosangela Aline Antão -- 2025.  
70f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos  
Orientador (a): Anabelle Silva Cornachione  
Banca Examinadora: Mônica Rosas da Costa Iêmma,  
Wladimir Rafael Beck  
Bibliografia

1. Fisiologia muscular. 2. COVID Longa. 3. Inflamação. I. Antão, Rosangela Aline. II. Título.

Ficha catalográfica desenvolvida pela Secretaria Geral de Informática  
(SIn)

DADOS FORNECIDOS PELO AUTOR

Bibliotecário responsável: Arildo Martins - CRB/8 7180



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

**Folha de Aprovação**

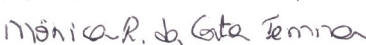
---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Rosângela Aline Antão, realizada em 04/09/2025.

**Comissão Julgadora:**

  
Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

  
Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck (UFSCar)

  
Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa lemma (UNIARA)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à minha mãe **Leoni Marta Eidt do Nascimento**, que esteve comigo em todas as indecisões e em todas as dificuldades, mas nunca duvidou do poder do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Dizem que a pós-graduação é um caminho solitário — e, de fato, muitas vezes é. Ainda assim, seria impossível percorrê-lo sozinha. Por isso, quero expressar minha profunda gratidão a todas as pessoas que estiveram comigo ao longo deste processo, desde os pequenos gestos até os momentos de crise existencial.

Primeiramente, agradeço à minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Anabelle Silva Cornachione, pela orientação generosa e pelo exemplo inspirador. Obrigada por mostrar que é possível enfrentar os altos e baixos da pós-graduação com leveza e um sorriso no rosto. Por enxergar meu potencial mesmo diante das minhas limitações, e por oferecer o incentivo certo, no momento certo.

Aos meus colegas de laboratório, meu agradecimento sincero pelo suporte — intelectual e emocional — e pelas tardes na copa, onde as conversas levantaram hipóteses mais instigantes que muitos artigos e livros. De fato, muitas cabeças pensam melhor do que uma. Em especial, obrigada à Bruna, Julia, Tatiana, Emilly e Sarah, que me ajudaram diretamente na execução das técnicas ou simplesmente me ouviram desabafar sobre minhas paranoias delirantes.

À minha família, especialmente à minha mãe, por compreender os desafios da vida acadêmica e me manter firme, mesmo quando pensei em desistir. Não há nada que eu possa fazer que compense suas incontáveis horas de trabalho duro, que me trouxeram até aqui. Sem você, nada disso faria sentido.

Aos meus irmãos, por serem inspiração diária de amor e dedicação, e por serem meu porto seguro sempre que precisei — e não, não estou falando (apenas) de dinheiro, haha.

Ao meu namorado, por me ouvir reclamar a cada experimento que deu errado (ou seja, quase todos os dias), mesmo sem entender exatamente do que eu estava falando. Por se oferecer para ficar comigo no laboratório até a uma da manhã. Enfim, por estar ao meu lado quando mais precisei.

À Amanda, por me incentivar a seguir meus sonhos, mesmo de longe, mas sempre torcendo por mim com carinho.

Aos amigos que me acompanharam nessa jornada: obrigada pelos ensaios depois dos experimentos fracassados, pelos barzinhos no fim da noite, pelas

conversas e por cada gesto que tornou esse caminho mais leve e possível.

Agradeço também aos laboratórios que colaboraram com a realização deste projeto, aos membros da banca avaliadora — Prof. Dr. Wladimir Rafael Beck e Profa. Dra. Mônica Rosas da Costa Iêmma — pelo tempo e contribuições valiosas, ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF), e à Universidade Federal de São Carlos, que me acolheu nestes nove anos e continuará sendo parte da minha trajetória por muito tempo.

A todos, meu mais sincero e emocionado obrigada!



"Para mim, é muito melhor compreender o Universo como ele realmente é do que persistir na ilusão, por mais satisfatória e reconfortante que seja."

— **Carl Sagan**, em *O Mundo Assombrado pelos Demônios*

## RESUMO

Sintomas musculares são queixas comuns e incapacitantes na COVID Longa, no entanto, a sua fisiopatologia permanece por ser elucidada. Duas hipóteses principais foram propostas: uma infecção viral local e persistente ou os efeitos de uma inflamação sistêmica crônica. Para testar estas hipóteses, foram analisadas biópsias do músculo vasto lateral de indivíduos com COVID Longa e de controles assintomáticos por meio de Western Blot, imunofluorescência e análises funcionais. Os resultados refutaram a hipótese da infecção local: não foi observado um aumento de antígenos da proteína Spike ou do receptor ACE2, e a protease pró-viral TMPRSS2 encontrava-se diminuída ( $p=0,0087$ ). O perfil imunológico revelou-se atípico, com uma diminuição de macrófagos ( $p=0,0018$ ) e sem alteração nos linfócitos T, sugerindo uma desregulação imune em vez de uma inflamação celular clássica. Esta desregulação foi associada a uma remodelação tecidual, incluindo uma atrofia seletiva das fibras do tipo I e IIA ( $p<0,0001$ ) e uma inesperada diminuição do conteúdo de colágeno ( $p<0,0001$ ). Funcionalmente, o tecido demonstrou um profundo déficit a nível celular, com uma redução significativa da força de fibra única ( $p<0,001$ ), um achado não detectado em testes de força global. Em conjunto, estes resultados sugerem que a patologia muscular na COVID Longa não é causada por dano viral direto, mas sim por uma desregulação inflamatória e imune que leva à atrofia, à remodelação da matriz e à disfunção contrátil a nível celular.

**Palavras-chave:** COVID Longa. SARS-CoV-2. Sintomas musculares. disfunção. Inflamação.

## ABSTRACT

Muscle symptoms are common and disabling complaints in Long COVID, however, their pathophysiology remains to be elucidated. Two main hypotheses have been proposed: a local and persistent viral infection or the effects of chronic systemic inflammation. To test these hypotheses, biopsies of the vastus lateralis muscle from individuals with Long COVID and healthy controls were analyzed using Western Blot, immunofluorescence and functional analyses. The results refuted the local infection hypothesis: there was no increase in Spike protein or ACE2 receptor antigens, and the pro-viral protease TMPRSS2 was decreased ( $p < 0.05$ ). The immune profile was atypical, with a decrease in macrophages ( $p < 0.05$ ) and no change in T lymphocytes, suggesting immune dysregulation rather than classic cellular inflammation. This dysregulation was associated with tissue remodeling, including selective atrophy of type I and IIA fibers and an unexpected decrease in collagen content ( $p < 0.05$ ). Functionally, the tissue showed a profound deficit at the cellular level, with a significant reduction in single fiber strength ( $p < 0.05$ ), a finding not detected in global strength tests. Taken together, these results suggest that muscle pathology in Long COVID is not caused by direct viral damage, but rather by inflammatory and immune dysregulation that leads to atrophy, matrix remodeling and contractile dysfunction at the cellular level.

**Keywords:** Long COVID. SARS-CoV-2. Muscle symptoms. dysfunction. Inflammation.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Ilustração explicativa da composição do SARS-CoV-2 .....	20
<b>Figura 2</b> - Plasticidade das fibras musculares .....	23
<b>Figura 3</b> - Linha do tempo dos procedimentos realizados .....	26
<b>Figura 4</b> - Panfleto de recrutamento de participantes .....	27
<b>Figura 5</b> - Agulha Bergström de biópsia muscular (5 mm) .....	29
<b>Figura 6</b> - Tecido coletado por meio da biópsia muscular .....	30
<b>Figura 7</b> - Configurações do dinamômetro isocinético (BIODEX).....	31
<b>Figura 8</b> - Criótomo LEICA®.....	32
<b>Figura 9</b> - Parâmetro de medição do trofismo (formato das fibras) .....	34
<b>Figura 10</b> - Filamento único de fibra muscular no equipamento Aurora .....	38
<b>Figura 11</b> - Análise da proteína Spike no músculo esquelético .....	41
<b>Figura 12</b> - Análise de western blot do receptor ECA2 .....	42
<b>Figura 13</b> - Análise de correlação entre as bandas da proteína ECA2.....	43
<b>Figura 14</b> - Análise de western blot para a enzima TMPRSS2.....	44
<b>Figura 15</b> - Análise de correlação entre as bandas da enzima TMPRSS2 .....	45
<b>Figura 16</b> - Imunomarcagem de linfócitos T e macrófagos .....	46
<b>Figura 17</b> - Análise por western blot dos níveis musculares de TNF- $\alpha$ .....	47
<b>Figura 18</b> - Análise de correlação entre as isoformas da TNF- $\alpha$ .....	48
<b>Figura 19</b> - Coloração para análise de colágeno intramuscular.....	49
<b>Figura 20</b> - Comparação da proporção de fibras e diâmetro menor das fibras musculares .....	50
<b>Figura 21</b> - Parâmetros funcionais do protocolo isocinético de fadiga.....	51
<b>Figura 22</b> - Gráfico de força de contração de fibra única dos grupos controle e COVID Longa .....	52

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Anticorpos Imunofluorescência - tipagem de fibra .....	33
<b>Tabela 2</b> - Anticorpos para marcação das células imunes.....	35
<b>Tabela 3</b> - Padronização de proteínas .....	36
<b>Tabela 4</b> - Anticorpos para o Western Blot .....	37
<b>Tabela 5</b> - Características demográficas dos participantes .....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>aprox.</b>	Aproximadamente
<b>CAAE</b>	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
<b>CRM-SP</b>	Conselho Regional de Medicina do Estado de São Paulo
<b>e.g.</b>	<i>Exempli gratia</i> (por exemplo)
<b>et al.</b>	<i>Et alii</i> (e outros)
<b>Fig.</b>	Figura
<b>i.e.</b>	<i>Id est</i> (isto é)
<b>n</b>	Número amostral
<b>N/A</b>	Não aplicável
<b>vs.</b>	<i>Versus</i> (contra)

## LISTA DE SIGLAS

- ACE / ECA** - Enzima Conversora de Angiotensina
- ACE2 / ECA2** - Enzima Conversora de Angiotensina 2
- ADAM17** - A Disintegrin and Metalloproteinase Domain 17
- AMPK** - Proteína Quinase Ativada por AMP
- BCA** - Ensaio de Ácido Bicincinínico
- CEP** - Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
- COVID-19** - *Coronavirus Disease 2019*
- DP** - Desvio Padrão
- DPP4** - Dipeptidil Peptidase 4
- DSHB** - *Developmental Studies Hybridoma Bank*
- FAPESP** - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- FoxO3** - *Forkhead box protein O3*
- FT** - Tipo de Fibra (Fyber Type; FTI, FTIIA, FTIID/IIIX, FTIID)
- HRP** - *Horseradish Peroxidase* (Peroxidase de Raiz-Forte)
- IL** - Interleucina (IL-1 $\beta$ , IL-6)
- LFBM** - Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular
- MERS-CoV** - *Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus*
- MHC / MyHC** - *Myosin Heavy Chain* (Cadeia Pesada de Miosina)
- MMPs** - Metaloproteinases de Matriz
- mTOR** - *Mammalian Target of Rapamycin* (Alvo da Rapamicina em Mamíferos)
- PBS** - *Phosphate-Buffered Saline* (Solução Salina Tamponada com Fosfato)
- PT** - Pico de Torque
- RBD** - *Receptor-Binding Domain* (Domínio de Ligação ao Receptor)
- RT-PCR** - Reação em Cadeia da Polimerase com Transcrição Reversa
- SARS** - *Severe Acute Respiratory Syndrome* (Síndrome Respiratória Aguda Grave)
- SARS-CoV** - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus*
- SARS-CoV-2** - *Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*
- SDS** - *Sodium Dodecyl Sulfate* (Dodecil Sulfato de Sódio)
- SDS-PAGE** - Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecilsulfato de Sódio
- TBS-T** - *Tris-Buffered Saline with Tween 20*

**TNF- $\alpha$**  - Fator de Necrose Tumoral Alfa

**UFSCar** - Universidade Federal de São Carlos

**VL** - Músculo Vasto Lateral

## LISTA DE SÍMBOLOS

- % - Porcentagem
- < - Menor que
- > - Maior que
- ± - Mais ou menos (usado para desvio padrão)
- °C - Graus Celsius
- °/s - Graus por segundo
- µg - Micrograma
- µL - Microlitro
- µm - Micrômetro
- kDa - Kilodalton
- M - Molar
- Mg - Miligrama
- ml - Mililitro
- mM - Milimolar
- mm - Milímetro
- mN - Milinewton
- N-M – Newton-metro
- p - Valor de p (nível de significância estatística)
- r - Coeficiente de correlação de Pearson
- rpm - Rotações por minuto

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	18
1.1. COVID-19.....	19
1.2. COVID Longa.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1.3. MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	22
1.4. HIPÓTESES PARA A PRESENÇA DOS SINTOMAS MUSCULARES	24
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	25
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	25
3.1. PARTICIPANTES.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>3.1.1. Recrutamento e biópsia muscular</b> .....	26
<b>3.1.2. Coleta do músculo</b> .....	28
<b>3.1.3. Processamento das amostras</b> .....	30
3.2. DINAMÔMETRO ISOCINÉTICO – PROTOCOLO DE FADIGA (BIODEX)	30
3.3. HISTOLOGIA .....	32
3.4. PICROSIRIUS RED .....	32
3.5. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA TIPO DE FIBRA .....	33
3.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA A CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE	34
3.7. WESTERN BLOT .....	35
3.8. TÉCNICA DE SINGLE CELL .....	37
3.9. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS .....	38
3.10. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS.....	39
<b>4. RESULTADOS</b> .....	39
4.1. DADOS DEMOGRÁFICOS .....	39

4.2. O PERFIL MOLECULAR DA VIA DE ENTRADA VIRAL NO MÚSCULO ESQUELÉTICO NÃO É ALTERADO PELA COVID LONGA .....	41
<b>4.2.1. Proteína Spike</b> .....	41
<b>4.2.2. Enzima TMPRSS2</b> .....	44
4.3. O AMBIENTE TECIDUAL NÃO APRESENTA UMA INFLAMAÇÃO CELULAR CLÁSSICA.....	45
4.4. O PADRÃO DE REGULAÇÃO DO TNF- $\alpha$ , MAS NÃO OS SEUS NÍVEIS TOTAIS, ENCONTRA-SE ALTERADO NA COVID LONGA .....	47
4.5. A COVID LONGA INDUZ UM PERFIL ATRÓFICO E DE REMODELAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO.....	48
<b>4.5.1. Picrosirius Red</b> .....	48
<b>4.5.2. Imunofluorescência</b> <b>De</b> <b>Tipo</b> <b>De</b> <b>Fibra</b>	
49	
4.6. A DISFUNÇÃO FUNCIONAL MUSCULAR NA COVID LONGA SE MANIFESTA A NÍVEL CELULAR. ....	51
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	58
<b>7. REFERÊNCIAS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 não é a única infecção causada por coronavírus registrada ao longo da história. A família *Coronaviridae* apresenta alta taxa de mutação, o que resulta na existência de diversas linhagens virais que compartilham segmentos semelhantes de RNA genômico (DHAMA et al., 2020).

Em 2002, em Guangdong, na China, foi registrado o primeiro caso de uma Síndrome Respiratório Aguda Severa (SARS), causada por um vírus denominado SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome – Corona Virus). Esse também pertence a família corona e apresenta característica zoonótica, sendo inicialmente hospedado por animais silvestres. Em determinado momento, sofreu mutações que lhe permitiram infectar seres humanos, seja de forma direta ou por meio de hospedeiros intermediários. As suspeitas são de que esse vírus se originou de morcegos, uma espécie que é portadora de diversas linhagens da família coronavírus (PEIRIS et al., 2003; LI et al., 2005; Han et al., 2006; CHENG et al., 2007).

O SARS-CoV possui em sua membrana a proteína Spike, que tem afinidade de ligação com o receptor Enzima Conversora de Angiotensina II - ECA2, muito encontrado no tecido epitelial pulmonar. Sendo assim, iniciou-se a epidemia de SARS em Hong Kong, Singapura, Vietnam e Canadá que durou até julho de 2003, com 916 mortes e 8422 infecções. Para além dos sintomas respiratórios, os indivíduos infectados apresentavam sintomas intensos associados ao sistema músculo esquelético (NG et al., 2008; HOFFMAN et al., 2020).

Seguindo o mesmo padrão epidemiológico da epidemia de SARS, a epidemia de MERS (Middle East Respiratory Syndrome) surgiu em 2012 no Oriente Médio originada pela infecção do vírus MERS-CoV. Esse vírus compartilha características estruturais com o vírus SARS-CoV, mas seu alvo não é o receptor ECA2 e sim o receptor DPP4 ou CD26, que também está presente no tecido epitelial pulmonar. Assim como o SARS-CoV ele é originário de um hospedeiro intermediário amplamente presente na região, o camelo-dromedário, frequentemente em contato com humanos por razões econômicas e culturais. De forma análoga a epidemia de SARS, a MERS também deixava sequelas musculares significativas (ZUMLA et al., 2015).

O MERS-CoV é um vírus mais agressivo que o da epidemia de SARS, sua infecção também causa síndromes respiratórias, mas o que chama a atenção é que

75% dos casos sintomáticos apresentaram algum tipo de comprometimento renal, ainda são encontrados alguns casos de infecção por MERS-CoV até os dias atuais (ALSAAD et al., 2018). Tanto a SARS quanto a MERS, levavam à liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias, desencadeando manifestações multissistêmicas, que incluíam a degradação do tecido muscular e a diminuição da capacidade de praticar atividades físicas, que apesar de em alguns casos ter grande influência do longo período de internação, não era limitado somente a esse fator (NG et al., 2006; ZUMLA et al., 2015).

Com base nos precedentes, existe uma apreensão que uma infecção associada a um coronavírus tenha um mesmo desfecho. Em dezembro de 2019, foi identificado em Wuhan – China, uma síndrome respiratória aguda grave intitulada COVID-19, que teve sua origem vinculada a um coronavírus com características semelhantes ao SARS-CoV (HOFFMAN et al., 2020). Para entender suas semelhanças às epidemias de SARS e MERS, a próxima sessão visa aprofundar os aspectos envolvidos na infecção e nas consequências dessa interação aos seres humanos.

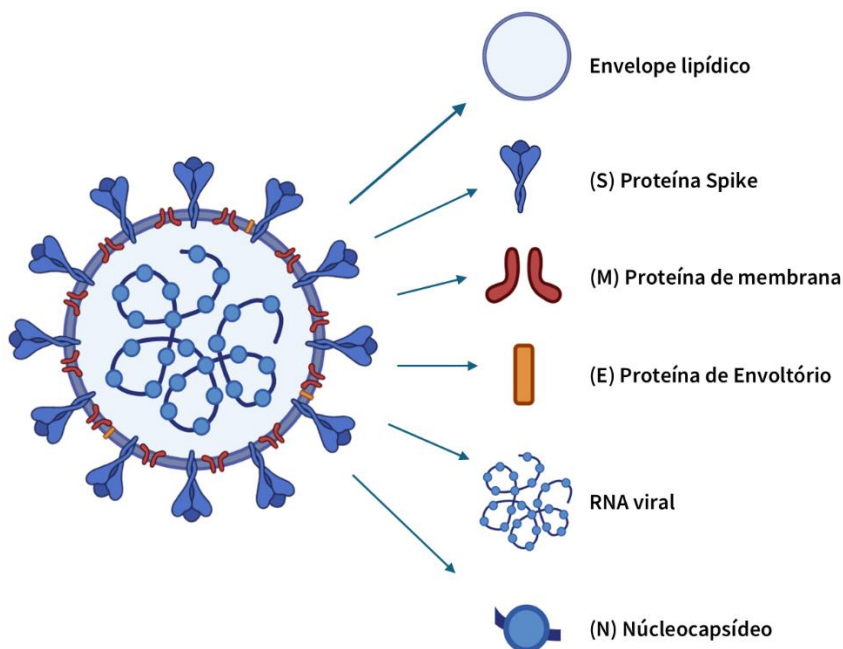
### 1.1. COVID-19 e COVID Longa

A COVID-19 (Corona Vírus Disease – 2019) é uma doença que teve seu primeiro caso reportado em dezembro de 2019, em Wuhan, na China. É uma Síndrome Respiratória Aguda Severa, causada pela infecção do vírus SARS-CoV-2, tendo ele recebido este nome visto sua semelhança genética com o vírus anteriormente citado, o SARS-CoV (DHAMA et al., 2020).

O vírus SARS-CoV-2, pertence a linhagem beta-coronavírus, possuindo em sua estrutura: um envelope lipídico, proteínas de membrana (M), nucleocapsídeo (N), proteína de envoltório (E), e a proteína Spike (S) – a porta de entrada do vírus – que dá a ele característica de coroa (Figura 1). O SARS-CoV-2, em comparação ao SARS-CoV, possui uma mutação na subunidade S1, especialmente no domínio de ligação ao receptor (RBD), que aumentou sua afinidade com a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) e contribuiu para uma maior transmissibilidade do vírus (HOFFMANN et al., 2020). Este domínio também é uma diferença com o SARS-CoV muito importante, pois permite uma maior eficácia no processo de entrada do vírus

nas células.

**Figura 1** – Ilustração explicativa da composição do SARS-CoV-2

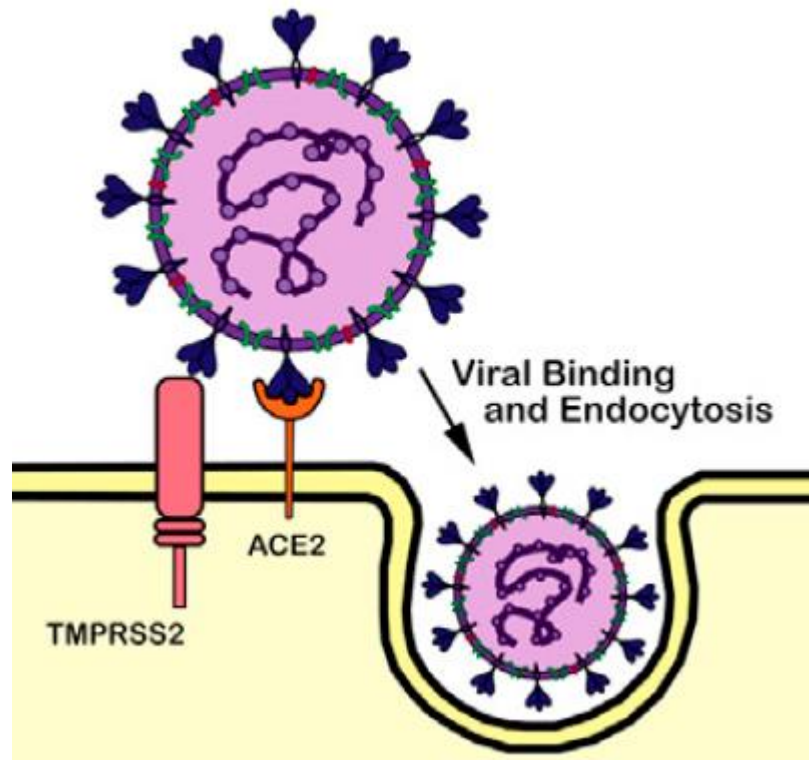


Fonte: Autoria própria

Ao infectar o organismo humano, o vírus SARS-CoV-2 tem como alvo inicial as células do tecido epitelial, especialmente devido à alta expressão da ECA2. Essa enzima, homóloga à Enzima Conversora de Angiotensina (ACE) clássica, atua fisiologicamente na conversão da angiotensina II em angiotensina 1-7, um peptídeo com importantes efeitos anti-inflamatórios e cardioprotetores (EL-ARIF et al., 2021). No contexto da infecção, a ECA2 atua primariamente como o receptor de alta afinidade para a proteína Spike do SARS-CoV-2, e a sua abundância torna o tecido suscetível à infecção.

Após a ligação da Spike à ECA2, a entrada do vírus na célula é dependente da ação da protease transmembranar de serina 2 (TMPRSS2). A função primordial da TMPRSS2 é clivar a proteína Spike num local específico, um processo que expõe os peptídeos de fusão do vírus e é fundamental para que ocorra a fusão entre o envelope viral e a membrana da célula hospedeira (SANTOS; FERNANDES; RAMOS, 2021) (Figura 2). Adicionalmente, a literatura sugere que a TMPRSS2 e a protease Domínio 17 da metalopeptidase ADAM (ADAM17) competem pela clivagem do próprio receptor ECA2. A clivagem da ECA2 pela TMPRSS2 parece favorecer a entrada viral,

enquanto a ação da ADAM17 é considerada um mecanismo protetor (HEURICH et al., 2014).



Fonte: Adaptado de Dos Santos et al. (2022).

Com a fusão das membranas o vírus consegue, pelo processo de endocitose, liberar o conteúdo de RNA viral no citoplasma da célula hospedeira. Os vírus, de modo geral, não possuem estruturas celulares essenciais para sua replicação, como ribossomos, sendo incapazes de realizar, por conta própria, a transcrição e tradução de seu material genético. Por isso, ao penetrar na célula hospedeira, o vírus passa a utilizar o maquinário celular — incluindo ribossomos, nucleotídeos e enzimas — para replicar seu genoma e sintetizar suas proteínas estruturais e não estruturais e com isso, ele inicia o processo de disseminação (V'KOVSKI et al., 2021).

A entrada e replicação do vírus nas células epiteliais ativam uma resposta imunológica complexa, caracterizada pela infiltração de células imunes como macrófagos e linfócitos T. A comunicação entre estas células e a amplificação da resposta inflamatória são mediadas pela libertação de citocinas pró-inflamatórias, tais como a interleucina-6 (IL-6), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina-1 beta (IL-1 $\beta$ ) (GARBERS et al., 2013; HUSSEL; BELL, 2014; KICIC et al., 2019).

Embora esta resposta imune vise inicialmente controlar a infecção, a disseminação intensa do vírus pode levar a uma liberação exacerbada de citocinas, fenômeno denominado 'tempestade de citocinas'. Este estado hiper inflamatório, quando prolongado, provoca danos teciduais extensos, especialmente no pulmão, além de graves efeitos sistêmicos (VAREILLE et al., 2011; V'KOVSKI et al., 2021).

A inflamação exacerbada promove alterações metabólicas e celulares que podem afetar múltiplos órgãos e tecidos, contribuindo para a gravidade da doença e a complexidade do quadro clínico, culminando em óbito em sua forma mais severa (JOSE; MANUEL, 2023; GHINI et al., 2023). De maneira geral os principais sintomas agudos são: febre, tosse, dispneia, dor de cabeça, mialgia, artralgia, fadiga e fraqueza muscular (DHAMA et al., 2020). Ainda que a maioria dos casos tenha uma resolução do processo infeccioso, uma parcela evolui para um estado crônico, com a presença de sintomas persistentes meses após a recuperação da doença. Este fenômeno pode se apresentar de forma independente da severidade da infecção inicial, sendo estes classificados como indivíduos com COVID Longa ou Síndrome Pós-COVID (MUNBLIT et al., 2023; SORARDI et al., 2021; OMS, 2025).

A COVID Longa é uma condição física associada com a infecção de COVID-19, na qual indivíduos apresentam sintomas persistentes por um período superior a 4 semanas, que envolvem diversos sistemas. Entre eles os mais comuns estão relacionados ao músculo esquelético, como mialgias, artralgias, intolerância ao exercício e fadiga. A fadiga, dentre os sinais e sintomas relatados, é o mais presente e o mais incapacitante deles (DOS SANTOS *et al.*, 2022). Estes sintomas musculoesqueléticos têm um impacto negativo na capacidade funcional de realizar as atividades do cotidiano. Conseqüentemente, isso representa um fator decisivo para determinar a qualidade de vida desses indivíduos.

## 1.2. MÚSCULO ESQUELÉTICO

A fim de elucidar a base fisiopatológica desses sintomas e a vulnerabilidade do tecido muscular para estas manifestações, é importante compreender sua estrutura e composição.

O tecido muscular esquelético compõe a maior parte do corpo humano, 40% de toda a massa corporal total, tem como função primordial a de realizar o movimento dos segmentos do corpo, além de estar envolvido no metabolismo energético

(JANSSEN *et al.*, 2000).

A heterogeneidade estrutural e funcional é uma característica fundamental do músculo esquelético. Esta heterogeneidade influencia na composição de diferentes tipos de fibras, classificadas principalmente pela isoforma da Cadeia Pesada de Miosina (MHC), que determina a velocidade de contração de cada tipo (rápida ou lenta). Por sua vez, estas propriedades contráteis estão fortemente associadas com o perfil metabólico predominante (oxidativo ou glicolítico) (Figura 2) (HORWATH *et al.*, 2023; SCHIAFFINO; REGGIANI, 2017).

**Figura 2** - Plasticidade das fibras musculares



Fonte: autoria própria

A classificação do MHC define um espectro de fibras que vão do lento e oxidativo ao rápido e glicolítico. Em um extremo as fibras do tipo I são predominantemente oxidativas, lentas e resistentes a fadiga, além de caracterizadas pela cor avermelhada, devido à presença extensa de mitocôndrias e mioglobina. Já as fibras IIA possuem uma contração rápida, no entanto, com um perfil metabólico misto (oxidativa-glicolítica) e algum nível de resistência à fadiga (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2017). No outro extremo, as fibras IIX ou IID são fibras que realizam uma contração mais rápida e possuem perfil metabólico puramente glicolítico, e por conta disso não possuem tantas mitocôndrias e mioglobinas, o que leva a uma aparência mais branca. As fibras IIB são um extremo ainda mais rápido, porém, só é expressa em mamíferos menores, como roedores (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2017; TALBOT; MAVES, 2016).

Além dos tipos “puros” o espectro de fibras é complementado pelas fibras híbridas, que se caracterizam pela co-expressão de múltiplas isoformas de MHC num mesmo sarcômero (ex: IIA/IID – IIAD ou IIDA). A presença dessas fibras é um indicador da plasticidade do músculo esquelético de se adaptar à estímulos externos,

como o treino, o desuso ou doenças sistêmicas e inflamação (SCHIAFFINO; REGGIANI, 2017).

### 1.3. HIPÓTESES PARA A PRESENÇA DOS SINTOMAS MUSCULARES

Embora a presença dos sintomas musculares chame a atenção de pesquisadores e profissionais da saúde, a causa desses sintomas é um aspecto chave na busca pela compreensão e tratamentos. Desde o início da pandemia e da apresentação desses sintomas, a comunidade científica tem investigado hipóteses que justifiquem essas condições (PESCARU et al., 2022). Dentre elas, este estudo irá investigar e testar duas das principais hipóteses concorrentes para compreender os mecanismos fisiopatológicos envolvidos neste quadro clínico.

A primeira hipótese sugere que os sintomas musculares são derivados de uma possível infecção local e persistente do vírus SARS-CoV-2 no músculo esquelético, visto que o músculo, assim como outros tecidos, expressa o receptor ECA2 e a enzima TMPRSS2, que o tornam susceptível à infecção (MAZZOLI et al., 2020; HANNAH et al., 2022). Neste cenário, o dano celular e os sintomas reportados seriam uma consequência direta da replicação viral. Alternativamente, a segunda hipótese tem como pressuposto que a inflamação sistêmica derivada da infecção aguda é a causa primária da presença dos sintomas musculares.

A característica mais marcante da infecção da COVID-19 é a presença da “tempestade de citocinas”, resultando em um aumento dos níveis de citocinas como IL-6, IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  circulante, citocinas que em algumas situações são responsáveis por alteração de função e massa muscular (SEIXAS et al., 2022; HANNAH et al., 2022). Neste caso, os danos não seriam causados diretamente pela infecção viral, mas sim pelo “eco” inflamatório sistêmico e persistente dessa infecção inicial.

Ambas as hipóteses estão sustentadas pela literatura de forma lógica, entretanto é necessária uma investigação prática para entender quais os mecanismos que culminam na presença dos sintomas musculares apresentados pelos indivíduos com COVID Longa. Além disso, ambas resultam em alterações morfológicas e funcionais que de fato repercutem na presença dos sintomas musculares.

Tendo isso em vista, este trabalho teve como foco a investigação destas duas vias fisiopatológicas para compreender qual predomina no músculo esquelético e buscou também entender qual a extensão das alterações provocadas por estas vias, a fim de promover suporte científico para futuras estratégias terapêuticas para essa população.

## **2. OBJETIVOS**

Caracterizar as alterações moleculares, estruturais e funcionais do músculo esquelético de indivíduos com sintomas de COVID Longa, a fim de identificar as vias fisiopatológicas responsáveis pelos sintomas persistentes.

### **2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Analisar o perfil de expressão da proteína Spike e das proteínas envolvidas no mecanismo de entrada viral ECA2, TMPRSS2 no músculo esquelético.
- Quantificar a infiltração de células imunes no tecido muscular, especificamente as populações de macrófagos e linfócitos T.
- Quantificar a expressão da citocina TNF- $\alpha$ , para compreender o perfil inflamatório do tecido muscular.
- Caracterizar as alterações morfológicas e estruturais do tecido muscular, analisando o tecido conjuntivo, a proporção dos tipos de fibra e seus diâmetros.
- Determinar a capacidade de geração de força do tecido muscular em nível global e celular.

## **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (CAAE: 39913520.3.0000.5504; número do parecer: 4.509.688; aprovação no dia 25/01/2021). As amostras e os dados dos participantes foram tornados anônimos no momento da coleta pelo médico e envolvidos no projeto.

### 3.1. Desenho experimental

O Desenho experimental deste estudo foi separado em cinco partes, desde o recrutamento, a Biópsia muscular, seis dias depois foi realizado o teste isocinético na mesma perna na qual foi realizada

**Figura 3** - Linha do tempo dos procedimentos realizados



Fonte: autoria própria

### 3.2. Participantes

#### 3.2.1. Recrutamento e biópsia muscular

O recrutamento foi realizado mediante divulgação de um *link online* para a inscrição de interessados na pesquisa; o formulário continha informações sobre o projeto e foi divulgado tanto no site do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar (<http://dcf.ufscar.br/pt-br>) onde ocorreu o estudo, quanto nas redes sociais do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular - LFBM (Instagram: @lfbm\_ufscar) (Figura 4).

**Figura 4** - Panfleto de recrutamento de participantes



Fonte: redes sociais do laboratório LFBM

Os critérios de inclusão e exclusão dos grupos COVID Longa e controle, abrangia:

- Faixa etária de 18 a 50 anos;
- Não realizar exercícios físicos regulares;
- Não ter comorbidades (hipertensão arterial, diabetes, doenças cardiovasculares)
- Não possuir doenças que afetam o musculo esquelético.

De critérios específicos de cada grupo, tivemos:

#### **COVID Longa:**

- Diagnóstico confirmado de COVID-19 (RT-PCR ou teste sorológico);
- Apresentar ou ter apresentado, a partir de 4 semana da infecção, sintomas músculo esqueléticos como fraqueza muscular (perda de força muscular, principalmente nas pernas, nos braços e nas costas, a qual pode ser constante), mialgia (dores musculares que manifestam-se em qualquer parte do corpo, principalmente braços, pernas e costas, causando dor temporária), fadiga (sensação debilitante de cansaço físico e mental, caracterizada por falta de energia, reações lentas, sonolência e déficit de concentração) e/ou dor nas juntas (principalmente as dos pés, tornozelos e joelhos, sendo uma dor temporária ou constante).;
- Não ter necessitado suporte respiratório na fase aguda da doença (leves e moderados).

### **Controle:**

- Ausência de diagnóstico clínico prévio ou sintomas compatíveis com COVID Longa.
- Indivíduos que, caso tenham tido infecção prévia por SARS-CoV-2, apresentaram recuperação completa do quadro agudo, sem quaisquer sequelas.
- Ausência de sintomas musculares persistentes ou de início recente (ex: mialgia, fadiga crônica, fraqueza muscular) nos últimos 6 meses.

Ainda entrou como critério de exclusão para ambos os grupos a alergia a anestésicos, problemas de cicatrização e/ou coagulação, fobia de agulha (aicmofobia), ou o uso de medicamentos que pudessem prolongar eventuais sangramentos (anticoagulantes, ex: aspirina). Mulheres gestantes também foram excluídas do estudo.

Ademais, para eliminar os riscos de transmissão da COVID-19, foram excluídos da pesquisa indivíduos COVID-19-positivos, na fase aguda da doença ou em quarentena.

Todos os participantes receberam um termo de consentimento livre e esclarecido informando todos os procedimentos da pesquisa, tais como: (a) local de desenvolvimento do projeto; (b) critérios de inclusão e exclusão; (c) objetivo do estudo; (d) procedimentos do estudo (detalhando a biópsia muscular a ser realizada); (e) riscos e desconfortos; (f) benefícios; (g) acompanhamento e responsabilidade; (h) garantia de esclarecimento; (i) participação; (j) caráter confidencial dos registros; (k) custos e reembolso; (l) dados de identificação do participante; (m) declaração de consentimento; e (n) declaração do pesquisador.

Além disso, todos receberam um questionário específico de triagem do procedimento de biópsia para que fosse certificado que o participante não possui reação adversa ao anestésico a ser utilizado ou qualquer problema de cicatrização (CORNELL UNIVERSITY ERGONOMIS WEB, 2021; COSTA *et al.*, 2011; HEDGE; MORIMOTO; MCCROBIE, 1999; KATZ; MELZACK, 2011; VAROLI; PEDRAZZI, 2006).

### **3.2.2. Coleta do músculo**

Amostras do músculo vasto lateral (quadríceps femoral) foram obtidas por meio de biópsia muscular através de uma agulha de biópsia do tipo Bergström (5 mm de diâmetro) com sucção manual (Figura 5), a qual foi realizada pela médica Dr.<sup>a</sup>

Alessandra Jungers Okuyama (CRM-SP 106.617) juntamente com a pesquisadora responsável pelo projeto, Dr.<sup>a</sup> Anabelle Silva Cornachione. A coleta foi feita no LFBM (DCF – UFSCar) em ambiente confortável e privativo.

**Figura 5** - Agulha Bergström de biópsia muscular (5 mm)

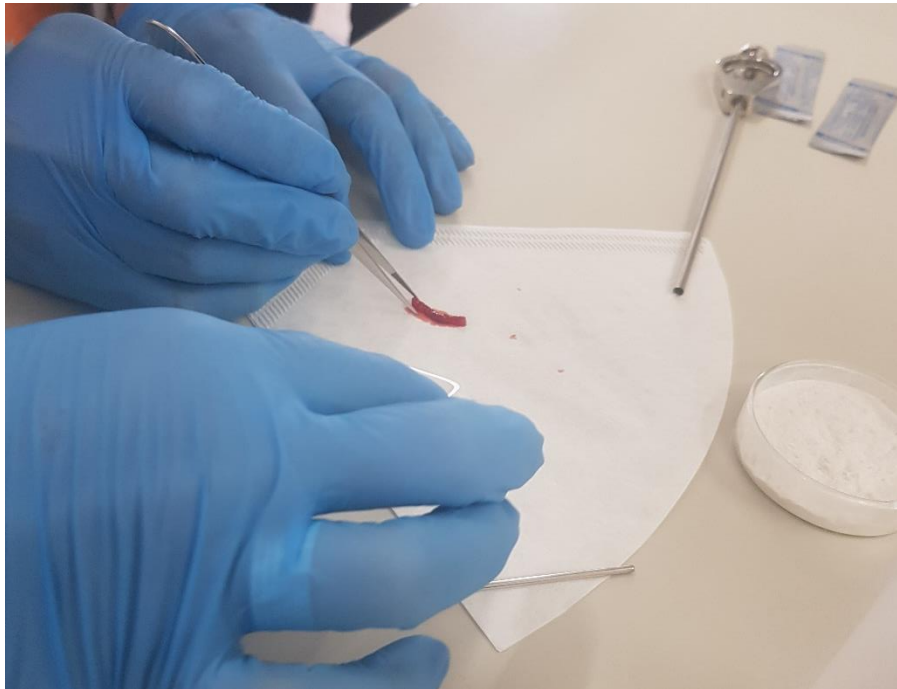


Fonte: autoria própria

Toda equipe utilizou equipamento de proteção individual estéril e a maca na qual foi realizado o procedimento foi esterilizada com álcool etílico 70% (antes e após o procedimento), seguindo todas as normas de Biossegurança vigentes para diminuir eventuais riscos de contaminação.

Inicialmente, foi realizada a assepsia da pele da região do músculo vasto lateral dos participantes, e posteriormente, aplicada a anestesia local por meio de injeção subcutânea de 3 ml de cloridrato de lidocaína a 2% sem vasoconstritor. Em condições estéreis, uma incisão cirúrgica de aproximadamente 1,0 cm foi feita por meio de bisturi na derme e fáscia muscular paralela às fibras musculares na face lateral da coxa. Em seguida, a agulha Bergström foi inserida no local (ângulo de 45°) juntamente com o dispositivo de extração e aproximadamente 100 mg de músculo foi coletado (Figura 6).

**Figura 6** - Tecido coletado por meio da biópsia muscular



Fonte: autoria própria

### **3.2.3. Processamento das amostras**

Através da técnica de biópsia de agulha, fragmentos do músculo vasto lateral (quadríceps) foram obtidos dos participantes (COVID Longa e controle). Uma porção (~30 mg) foi untada com talco neutro e congelada para a realização das análises morfológicas (Picosirius e Imunofluorescência); uma pequena porção, congelada, porém não untada, foi utilizada para as análises bioquímicas (Western Blot) e uma pequena porção separada e submersa em soluções de RIGOR e RIGOR+GLICEROL, para análises de single cell.

### **3.3. DINAMÔMETRO ISOCINÉTICO – PROTOCOLO DE FADIGA (BIODEX)**

Seis dias após a biópsia, foi realizado o teste no dinamômetro isocinético BIODEX. Primeiramente, as configurações do dinamômetro isocinético foram determinadas para cada participante de acordo com as especificações do fabricante (BIODEX System 4; BIODEX Medical Systems®). Antes das sessões de teste, todos os participantes tiveram sua altura e peso medidos. Cada participante ficou sentado na cadeira do dinamômetro com encosto em posição vertical, no qual a estabilização do corpo foi realizada por meio de duas alças de contenção cruzando o peito do

participante, uma alça na cintura e uma alça na coxa. O eixo de rotação estimado da articulação do joelho foi alinhado com o eixo de rotação do dinamômetro. A articulação do joelho fixada em um ângulo de 90° de flexão, e o membro pesado, para correções do torque, a 30° de flexão.

**Figura 7** - Configurações do dinamômetro isocinético (BIODEX)



Fonte: autoria própria

A seguir se deu a obtenção dos dados do teste isocinético, através de um protocolo de fadiga, onde foi realizada a contração para extensão/flexão de joelho no modo concêntrico/concêntrico a 240°/s durante 60 segundos. Os participantes foram instruídos a realizar o número máximo de repetições que conseguissem durante este tempo. Caso o participante relatasse fadiga antes do final do tempo, o mesmo era orientado a relaxar e aguardar o final da contagem de segundos. A tentativa com o maior torque obtido foi utilizada para análises posteriores. O índice de fadiga foi calculado utilizando o primeiro terço dos valores do Pico de Torque (PT) de cada contração, comparado com o terceiro terço da mesma.

Os parâmetros finais para comparação entre os grupos foram extraídos do relatório do equipamento BIODEX, entre eles: o número de repetições, os valores de

PT, média de PT, tempo para o PT, trabalho total e índice de fadiga do trabalho.

### 3.4. HISTOLOGIA

O processamento histológico do músculo vasto lateral previamente congelados, ocorreu a partir do seccionamento das amostras em cortes transversais (6 e 14  $\mu\text{m}$  de espessura a depender da análise, temperatura de  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) através de Criótomo CM 1850 UV (LEICA®). Os cortes para a histologia básica foram alocados em lâminas de 24x50 mm e processadas de acordo com cada protocolo.

**Figura 8** - Criótomo LEICA®



Fonte: autoria própria

### 3.5. PICROSIRIUS RED

Para a quantificação do colágeno intramuscular, cortes histológicos foram incubados por 40 minutos com a solução de picrosirius (0,1g Direct Red 80, 1,3g de ácido pícrico em 100ml de água), posteriormente lavadas duas vezes com ácido acético, desidratada em séries de álcoois, e por fim as lâminas foram fechadas com auxílio do meio de montagem (BHUTDA et al., 2017; GRILLO et al., 2025).

As lâminas foram fotografadas em um microscópio de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha), em média de 12 imagens (magnificação de 40x). Através do software ImageJ Fiji (versão 1.52), foi quantificada a porcentagem de tecido conjuntivo em cada, por meio de binarização da imagem, que permite identificação solada do tecido conjuntivo por meio da intensidade de pixel.

### 3.6. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA TIPO DE FIBRA

Para a imunomarcção dos diferentes tipos de fibra, foi realizada uma tripla marcação para as fibras tipo I e IIA e para laminina. Inicialmente os cortes musculares de 14  $\mu\text{m}$  foram incubados com os anticorpos primários por 35 minutos a 37°C (Tabela 1). Após incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas durante 5 minutos três vezes com PBS 0.1M e incubadas com os anticorpos secundários correspondentes (Tabela 1), que são conjugados com fluoróforo nos comprimentos de onda 405, 488 e 647, marcando, respectivamente as cores azul, verde e vermelho, por 40 minutos a 37°C (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2012).

Com isso as marcações das fibras musculares se apresentam como FTI em azul, FTIIA em verde claro, as fibras FTIID não foram marcadas, mas pela marcação da laminina foi possível identificá-las como fibras pretas. As fibras híbridas do tipo IIAD/IIDA apresentaram marcação verde-escuro. Pelo baixo número de fibras híbridas IC/IIC, elas não foram quantificadas.

**Tabela 1** - Anticorpos Imunofluorescência - tipagem de fibra

Anticorpo primário				
Nome	Marcação esperada	Isotipo	Marca	Diluição
BA-D5	Fibras tipo I	mouse IgG2b	DSHB	1:50
SC-71	Fibras tipo IIA	mouse IgM	DSHB	1:100
Laminina	Laminina	rabbit IgG	Abcam (ab11575)	1:1000
Anticorpo Secundário				
	Dylight 405	anti-mouse IgG2b	Jackson ImmunoResearch	1:200
	Alexa Fluor 488	anti-mouse IgM	Thermo Fisher	1:200
	Alexa Fluor 647	anti-rabbit IgG	Invitrogen	1:200

As lâminas foram fotografadas no equipamento multiusuário *ImageXpress XLS System* - Molecular Devices (Processo FAPESP 2014/50256-4) (magnificação de 10x).

Para a quantificação da proporção das fibras, foram selecionados, com o auxílio do Software ImageJ Fiji (versão 1.52), 3 campos aleatórios de 500x500 $\mu$ m, no qual o número de fibras de cada tipo foi quantificado e o total de fibras determinada para realizar a proporção fibra/fibras totais. Já para as quantificações do diâmetro, 100 fibras de cada tipo por lâmina foi mensurado, quando não havia 100 fibras era mensurado o máximo encontrado. Através do ImageJ foi identificado o diâmetro menor de Faret, que identifica a distância média entre pares de retas paralelas tangentes ao contorno projetado da célula (Figura 9).

**Figura 9** - Parâmetro de medição do trofismo (formato das fibras)

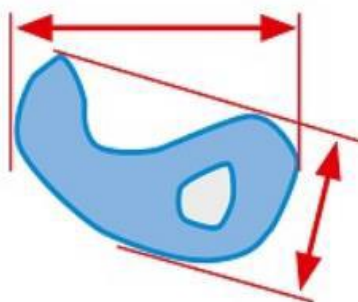


Ilustração com demonstração da obtenção do diâmetro menor de uma célula.

Fonte: (PEDRAZZANI, 2019)

### 3.7. IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA A CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE

Para verificar as mudanças patológicas do tecido muscular associadas à inflamação, lesão e necrose promovidas pela infecção viral e decorrentes de uma provável desregulação do sistema imune dos indivíduos, foi realizada a imunomarcagem de macrófagos e linfócitos T.

Os cortes histológicos foram incubados com uma solução contendo uma dupla marcação de células imunes e proteínas de membrana, com os anticorpos primários (Tabela 2) por 35 minutos a 37°C. Após esse período, as lâminas foram lavadas com PBS 0.1M por 3x de 5 minutos cada e incubadas por 40 minutos (37 °C) com os anticorpos secundários correspondentes.

Em seguida, três novas lavagens com PBS 0.1M foram realizadas e os cortes

foram selados com *FluorQuest* contendo o fluoróforo DAPI (marcação dos núcleos). Fotomicrografias foram obtidas através do equipamento multiusuário *ImageXpress XLS System* (Processo FAPESP 2014/50256-4) (magnificação de 10x e 20x; Molecular Devices) (BLOEMBERG; QUADRILATERO, 2012).

Para a quantificação das células, o número total de sobreposições de fluorescência para cada célula e o núcleo foram quantificadas, assim como o número total de fibras por corte e a proporção células/fibra foi utilizada como valor de comparação entre os grupos. Todas as mensurações foram realizadas com o auxílio do Software ImageJ Fiji (versão 1.52).

**Tabela 2** - Anticorpos para marcação das células imunes

Anticorpo primário				
Nome	Marcação esperada	Isotipo	Marca	Diluição
CD68	Macrófagos	Mouse IgG1	Abcam (ab201340)	1:200
CD3	Linfócitos T	Rabbit IgG	Abcam (ab135372)	1:100
Laminin	Laminina	Rabbit IgG	Abcam (ab11575)	1:1000
dystrophin	Distrofina	Mouse IgG1	Sigma Aldrich (D8043)	1:200
Anticorpo Secundário				
Alexa Fluor 488	anti-mouse IgG1	Jackson ImmunoResearch (115-545-205)		1:200
Alexa Fluor 488	anti-rabbit IgG	Invitrogen (A-11008)		1:200
Alexa Fluor 647	anti-rabbit IgG	Invitrogen (A-21244)		1:200

### 3.8. WESTERN BLOT

As amostras obtidas da biópsia muscular dos participantes foram homogeneizadas em tampão de extração (0,05 M Tris-HCl pH 7,4, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA pH 8,0, 0,1% SDS, 0,001 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 0,025 M NaF 0,025M, 0,0005 M pirofosfato de Na<sup>+</sup> e inibidores de proteases) com beads de aço inoxidável por três ciclos de agitação de 30 segundos em 4m/s no equipamento *Fast Prep*, com intervalos de 1 minuto entre cada ciclo em gelo (MAHMOOD; YANG, 2012).

Após a extração, os tubos com o homogenato foram centrifugados em centrífuga refrigerada a 4°C e 13000 rpm por 15 minutos. Com cuidado, era separado o sobrenadante com as proteínas totais extraídas do tecido para quantificação

proteica através de ensaio colorimétrico de BCA seguindo instruções do fabricante (Thermo Scientific). Posteriormente, as proteínas dos sobrenadantes foram preparadas com tampão *Laemmli* (diluído com  $\beta$ mercapto) e fervidas a 100 °C por 5 minutos (MAHMOOD; YANG, 2012).

Alíquotas contendo 15 $\mu$ g de proteína de cada grupo (controle e COVID Longa) foram separadas em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45  $\mu$ m; Bio-Rad), as quais foram bloqueadas de acordo com as necessidades de cada proteína pelo período de 3 horas (Tabela 3).

**Tabela 3** - Padronização de proteínas

Padronização de proteína			
Proteína	% do gel	Diluição do Ac.	Bloqueio
ECA2	10%	1:250	Caseína 1%
TMPRSS2	10%	1: 5000	BSA
SARS-CoV-2	12%	1:2000	BSA
TNF-alfa	10%	1:500	BSA

O ensaio de Western Blot foi realizado utilizando-se os anticorpos primários presentes na tabela 4 (*overnight*, 4 °C) (Tabela 4). No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T (3x de 5 minutos cada) e incubadas com anticorpos secundários específicos conjugados com HRP (*horseradish peroxidase*; Cell Signaling Technology e Abcam), disponíveis na tabela 4, durante 1 hora, à 4 °C, sob agitação basculante (MAHMOOD; YANG, 2012).

Posteriormente, as membranas de nitrocelulose foram reveladas por meio de reagente quimioluminescente (*Clarity™ Western ECL Substrate*; Bio-Rad). As bandas foram visualizadas no equipamento ChemiDoc™ XRS (Bio-Rad) e quantificadas por análise densitométrica utilizando-se o *software* ImageLab 6.1 (Bio-Rad).

As bandas da proteína de interesse foram normalizadas pelo conteúdo total de proteínas marcadas pelo Ponceau, ambos foram utilizados após a remoção do valor de fundo de cada membrana. Estes valores, por fim, foram utilizados para a

comparação entre os grupos.

**Tabela 4 - Anticorpos para o Western Blot**

Anticorpo primário			
Nome	Isotipo	Marca	Diluição
Spike	Rabbit	Abcam (ab272504)	1:3000
TMPRSS2	Rabbit	Abcam (ab109131)	1:5000
ECA2	Mouse	R&D Systems (MAB933)	1:1000
TNF- $\alpha$	Mouse	Abcam (ab1793)	1:500
Anticorpo Secundário			
HRP	Goat anti-rabbit	Abcam (ab97080)	1:10000
HRP	Horse anti-mouse	Cell Signaling (7076)	1:5000

As marcações utilizando os anticorpos para a proteína Spike, o receptor ECA2 e a enzima TMPRSS2 apresentaram marcações de forma consistente na maioria das amostras, em alturas que não correspondiam ao peso molecular informado no datasheet. Entretanto, cada caso foi analisado e foi decidido por quantificar e analisá-las. A proteína Spike apresentou marcações nas bandas de 44 e 23 kDa, o receptor ECA2 apresentou três marcações, sendo elas nas alturas de 109, 51 e 29 kDa; já a enzima TMPRSS2 apresentou bandas semelhantes, portanto, 119, 52 e 29 kDa. O peso molecular foi definido a partir da comparação das bandas com o padrão de peso molecular Dual Color (Bio-Rad), por meio do software ImageLab 6.1(Bio-Rad).

### 3.9. TÉCNICA DE SINGLE CELL

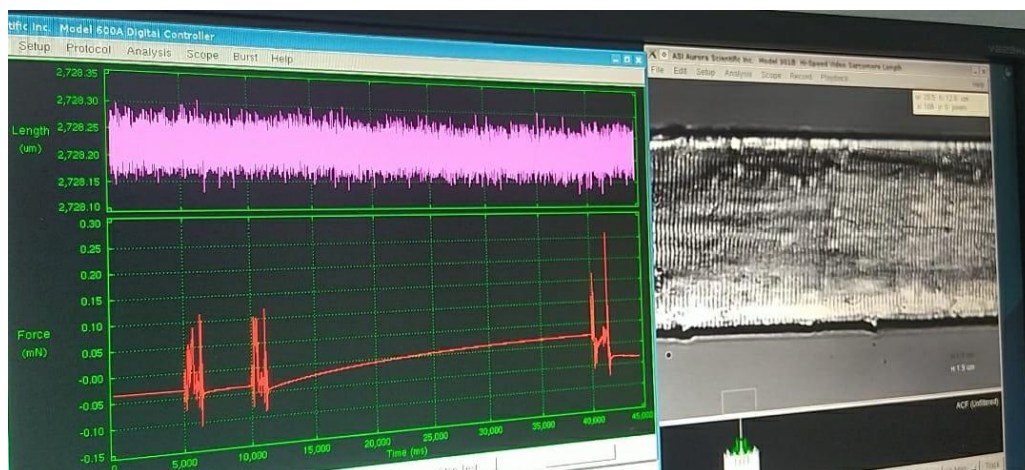
A preparação das miofibras para realização de testes biofísicos (mecânicos) através de equipamento *AURORA600* exigiu a incubação dos fragmentos obtidos na biópsia em diversas soluções (Rigor e Rigor+Glicerol) para permeabilização das miofibras segundo protocolo estabelecido (CORNACHIONE; RASSIER, 2012). Brevemente, os músculos foram incubados em solução Rigor (50 mM Tris, 100 mM NaCl, 2 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 10 mM EGTA; pH 7.0) por 4 horas, solução Rigor-Glicerol (50:50) por 15 horas e em nova solução Rigor-Glicerol (50:50) contendo coquetel de inibidores de proteases em freezer -20°C até o momento do procedimento.

No dia do experimento, uma hora antes do início, a solução contendo a amostra

é retirada do freezer e uma pequena porção (~4mm) é cortada, da qual as fibras únicas são dissecadas em solução de relaxamento (KCl 100mM, EGTA 2mM, imidazole 20mM, ATP 4mM e MgCl<sub>2</sub> 7mM; pH 7.0). As fibras são presas a 'Ts' de papel alumínio e transferidos para uma câmara com temperatura controlada, na qual a fibra é fixada entre um transdutor de força e um controlador de comprimento (Figura 10).

No início do protocolo, antes de cada experimento, o comprimento do sarcômero era medido na solução de relaxamento, com o uso de um sistema de câmera de alta velocidade. Após este passo, a fibra era submersa em uma solução de Ca<sup>2+</sup> (4.5), a um comprimento de sarcômero de 2,5  $\mu$ m e a contração isométrica foi mensurada em mN-mm (milinewton por milímetro).

**Figura 10** - Filamento único de fibra muscular no equipamento Aurora



Fonte: autoria própria

### 3.10. CONSIDERAÇÕES SOBRE AS AMOSTRAS

Devido à baixa tolerância de alguns participantes ao procedimento de biópsia, a quantidade de tecido muscular coletado foi, em certos casos, insuficiente para a realização de todo o painel de análises propostas, assim como houve desistências

antes da finalização da coleta de dados. Portanto, o número amostral (n) pode variar entre os diferentes resultados apresentados.

Adicionalmente, devido à alta taxa de infecção por SARS-CoV-2 na população geral durante o período de recrutamento, houve dificuldade em recrutar indivíduos para o grupo Controle. Para superar esta limitação, amostras de tecido muscular de indivíduos saudáveis foram gentilmente cedidas pelo laboratório Musculab da Universidade Federal de São Carlos, coordenado pelo Prof. Dr. Cleiton Augusto Libardi, mediante consentimento prévio dos participantes

### 3.11. PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO DOS DADOS

Todos os experimentos realizados neste projeto foram analisados estatisticamente através do programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 8.0.2.263). Cada conjunto de dados foi submetido ao teste de normalidade de Shapiro Wilk, no qual na presença de normalidade as comparações entre os grupos (controle e COVID Longa) foram pelo teste estatístico *test t* não pareado (bicaudal). Enquanto, os dados que não exibiram os padrões de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico de Mann Whitney.

Para a comparação entre as bandas das diferentes proteínas dos experimentos de Western Blot foi realizado o teste de correlação de Pearson, sendo os resultados apresentados com valor de p e valor de r. Foram considerados significativos os valores de  $p < 0,05$  e a correlação considerada forte quando o valor de r estava acima de 0,7 ou abaixo de -0,7 e média com valores acima de 0,4 ou abaixo de -0,4.

Para determinar a diferença entre os grupos foi adotado o nível de significância de 95% e o Índice de confiança de 5% ( $p < 0,05$ ).

## 4. RESULTADOS

### 4.1. DADOS DEMOGRÁFICOS

O estudo incluiu 29 participantes, alocados no Grupo Controle (n=11) e no Grupo COVID Longa (n=18). Os grupos apresentaram homogeneidade em relação à idade, com média de  $29,3 \pm 9,1$  anos para o Grupo Controle e  $29,5 \pm 8,7$  anos para o Grupo COVID Longa. O Grupo Controle foi composto por 6 mulheres (54,5%) e 5

homens (45,5%), enquanto o Grupo COVID Longa apresentou uma maior proporção de mulheres, com 13 participantes do sexo feminino (72,2%) e 5 do sexo masculino (27,8%). Notavelmente, embora a média de peso dos participantes do sexo masculino no Grupo COVID Longa ( $93,5 \pm 22,4$  kg) tenha sido numericamente superior à do Grupo Controle ( $78,8 \pm 8,8$  kg), a análise estatística não revelou diferença significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ). As demais características antropométricas estão especificadas na Tabela 5.

Para o Grupo COVID Longa, o tempo médio entre o diagnóstico da infecção por SARS-CoV-2 e a data da biópsia muscular foi de  $8,6 \pm 5,3$  meses. O perfil vacinal também foi avaliado para ambos os grupos. A vacina da Pfizer (BNT162b2) foi a mais reportada, presente em 45,5% dos participantes do Grupo Controle e 38,9% do Grupo COVID Longa. A CoronaVac (vírus inativado) foi a segunda mais frequente, com 27,3% e 27,8% nos grupos Controle e COVID Longa, respectivamente. A distribuição das demais vacinas, bem como o número de participantes que preferiram não responder sobre o estado vacinal, está detalhada na Tabela 5.

**Tabela 5** - Características demográficas dos participantes

PARTICIPANTES		
Característica	Grupo Controle	Grupo COVID Longa
Idade (anos, média±DP)	29,3±9,1	29,5±8,7
<b>Sexo, n (%)</b>		
Feminino	6 (54,5%)	13 (72,2%)
Masculino	5 (45,5%)	5 (27,8%)
<b>Peso (kg, média±DP)</b>		
Feminino	70,8±17,6	75,4±14,2
Masculino	78,8±8,8	93,5±22,4
<b>Altura (m, média±DP)</b>		
Feminino	1,69±0,07	1,66 ±0,05
Masculino	1,73±0,005	1,79 ±0,04
<b>Tempo após infecção (meses)</b>	N/A	8,6±5,3
<b>Vacinação</b>		
Pfizer	5 (45,5%)	7 (38,9%)
CoronaVac	3 (27,3%)	5 (27,8%)
Astrazeneca	2 (18,2%)	2 (11,1%)
Jansen	N/A	2 (11,1%)
Preferiu não responder	1 (9,1%)	2 (11,1%)

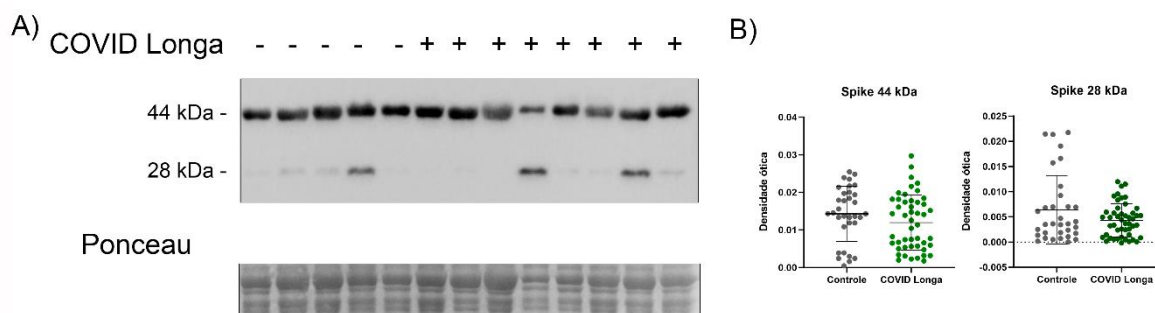
## 4.2.O PERFIL MOLECULAR DA VIA DE ENTRADA VIRAL NO MÚSCULO ESQUELÉTICO NÃO É ALTERADO PELA COVID LONGA

### 4.2.1. Proteína Spike

Para investigar a hipótese de persistência viral no tecido muscular, foi avaliada a expressão da proteína Spike do SARS-CoV-2 por Western Blot. O anticorpo utilizado reconheceu consistentemente dois fragmentos, com pesos moleculares de 44 kDa e 28 kDa (Figura 11A). A análise quantitativa foi realizada na banda principal de 44 kDa por se assemelhar ao peso teórico da subunidade S2 da proteína.

Não foi observada diferença estatisticamente significativa nos níveis deste fragmento entre o grupo COVID Longa e o grupo Controle ( $p=0,3382$ ) (Figura 11B). Assim como a banda de 28 kDa também apresentou expressão similar entre os grupos ( $p=0,1097$ )

**Figura 11** - Análise da proteína Spike no músculo esquelético



**Figura 10. (A)** Imagens representativas do Western Blot, a coloração de Ponceau S demonstra o carregamento total de proteína em cada poço utilizado para a normalização. **(B)** Gráficos de dispersão da quantificação para os fragmentos de 44 kDa e 28 kDa da proteína Spike. A quantificação da densidade ótica não revelou diferença estatisticamente significativa para nenhuma das bandas analisadas (44 kDa  $p=0,3382$  e 28kDa  $p=0,1097$ ) Grupo Controle( $n=11$ ) Grupo COVID Longa ( $n=16$ ).

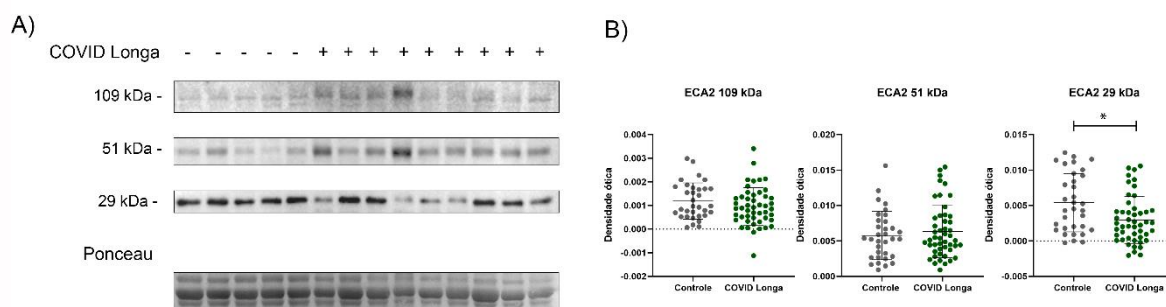
Para compreender se a presença do vírus promoveu o aumento da expressão de seu principal receptor, foi quantificada a expressão da proteína ECA2 no músculo esquelético. O anticorpo marcou de forma consistente três bandas, equivalentes aos pesos moleculares de 102 kDa, 51 kDa e 29 kDa.

A proteína ECA2 tem o peso molecular esperado de 110 kDa e sua clivagem pela enzima TMPRSS2 gera um fragmento de 13 kDa, porém as bandas de 51 e 28 kDa não são reportadas na literatura, entretanto, pela marcação expressiva foi

decidido pela quantificação e inclusão dessas bandas nas análises estatísticas. Portanto, todas as bandas foram quantificadas e comparadas.

A análise da banda de 109 kDa e da de 51 kDa não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos (respectivamente,  $p = 0,3267$  e  $0,5373$ ). No entanto, foi observada uma diminuição significativa na expressão do fragmento de 29 kDa no grupo COVID Longa ( $p = 0,0280$ ) (Figura 12)

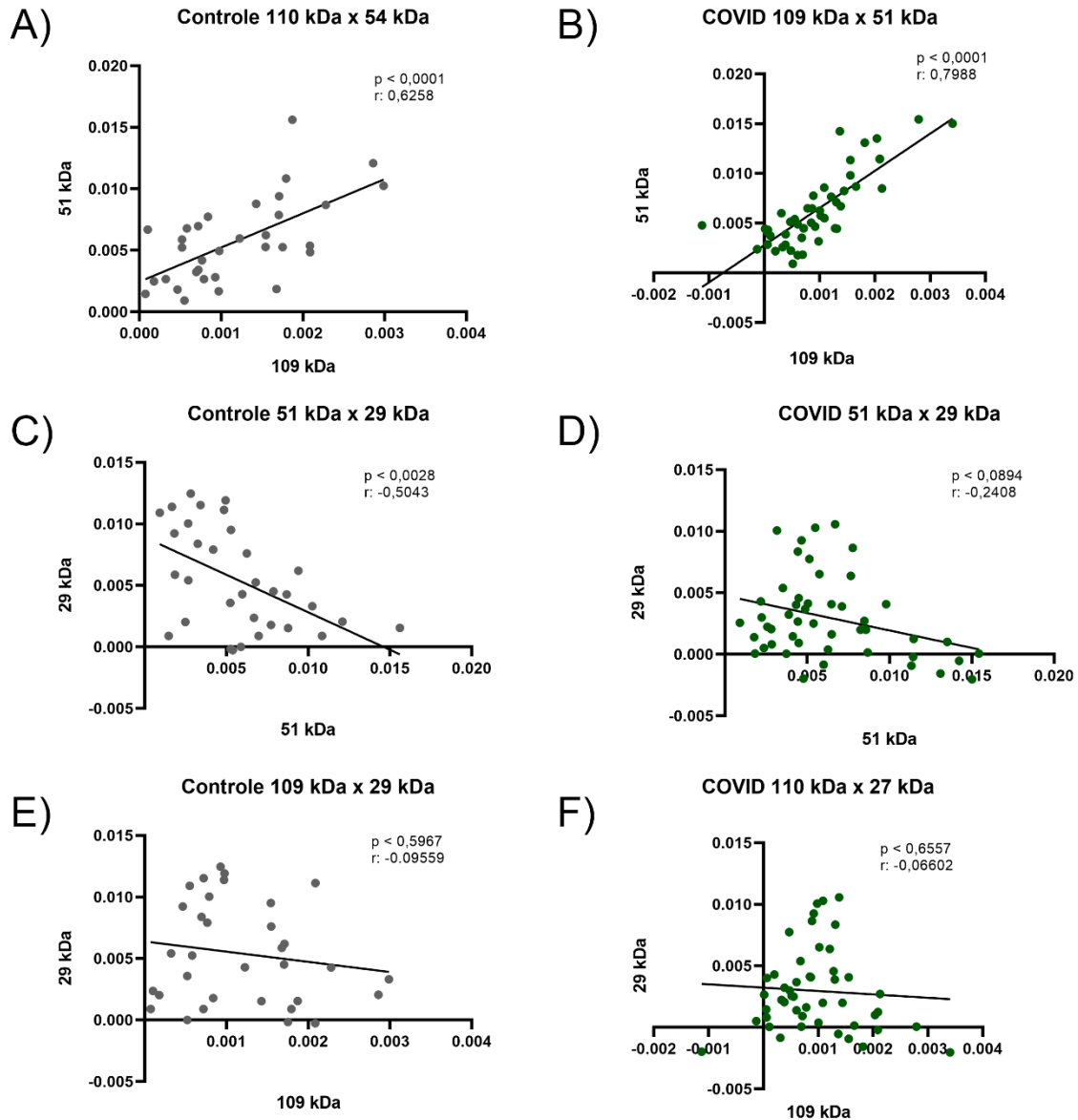
**Figura 12 - Análise de western blot do receptor ECA2**



**Figura 11. (A)** imagem representativa do Western Blot para a proteína ACE2, mostrando a detecção da forma completa (109 kDa) e de dois fragmentos (51 kDa e 29 kDa). A coloração de Ponceau S demonstra o carregamento total de proteína. **(B)** Gráficos de dispersão da quantificação da densidade ótica para cada banda. A análise revelou uma diminuição estatisticamente significativa apenas no fragmento de 29 kDa no grupo COVID Longa ( $*p = 0,0280$ ). Grupo controle ( $n=11$ ) Grupo COVID Longa ( $n=16$ ).

Ao analisar a relação entre os diferentes fragmentos, em ambos os grupos, foi encontrada uma correlação positiva e forte entre os níveis da banda de 102 kDa e da de 51 kDa (Controle:  $r = 0.6258$ ,  $p < 0,0001$ ; COVID Longa:  $r = 0.7988$ ,  $p < 0,0001$ ). No entanto, a análise de correlação revelou uma desregulação, evidenciada por uma correlação negativa e controlada entre os fragmentos de 51 kDa e 29 kDa, presente no grupo controle que foi perdida no grupo COVID Longa (Controle:  $r = -0.5043$ ,  $p = 0,0028$ ; COVID:  $r = -0.2478$ ,  $p = 0,0894$ ) (Figura 12).

**Figura 13** - Análise de correlação entre as bandas da proteína ECA2



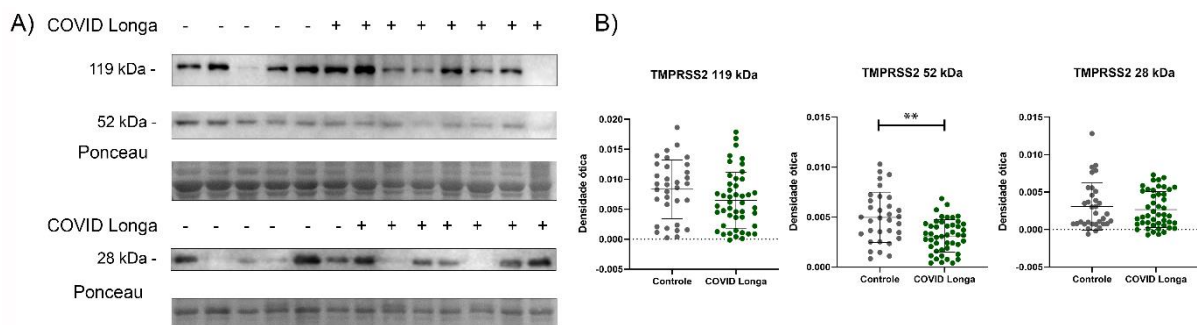
**Figura 12.** Análise de correlação de Pearson entre as densidades óticas das diferentes bandas da ACE2 (109 kDa, 51 kDa e 29 kDa) nos grupos Controle (A, C e E) e COVID Longa (B,D e F). Cada ponto representa um indivíduo. **(A,B)** Ambos os grupos apresentaram uma correlação positiva e forte, indicando uma sincronia entre a concentração da proteína inteira e a formação de seu fragmento **(C)** No grupo Controle, foi observada uma correlação negativa e significativa entre os fragmentos de 51 kDa e 29 kDa, sugerindo um processamento regulado. **(D)** Em contraste, esta correlação é perdida no grupo COVID Longa ( $p = 0,0894$ ), indicando uma desregulação do processamento da ACE2 na condição pós-viral. Os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) e de significância ( $p$ ) estão indicados em cada gráfico.

#### 4.2.2. Enzima TMPRSS2

Dando sequência à análise da maquinaria da entrada viral, a expressão da enzima TMPRSS2 foi avaliada, visto que esta proteína realiza a clivagem da proteína Spike, possibilitando a fusão das células.

Portanto, foi realizada a análise de expressão proteica desta enzima, e o anticorpo utilizado marcou consistentemente três bandas de peso molecular de 119, 52 e 28 kDa. A pró proteína TMPRSS2 não realiza atividade biológica, é necessário que ela passe por um processo de autoclivagem para que se torne ativa. Portanto, todas as bandas que apresentaram marcações foram consideradas, visto que representam, respectivamente, a pró proteína (inativa), sua forma clivada (ativa) e um possível fragmento dessa enzima, tendo as comparações entre os grupos apresentado diferença estatística somente em sua forma ativa, o fragmento de 52 kDa que se encontra diminuído no grupo COVID Longa ( $p=0,0087$ ) (Figura 13).

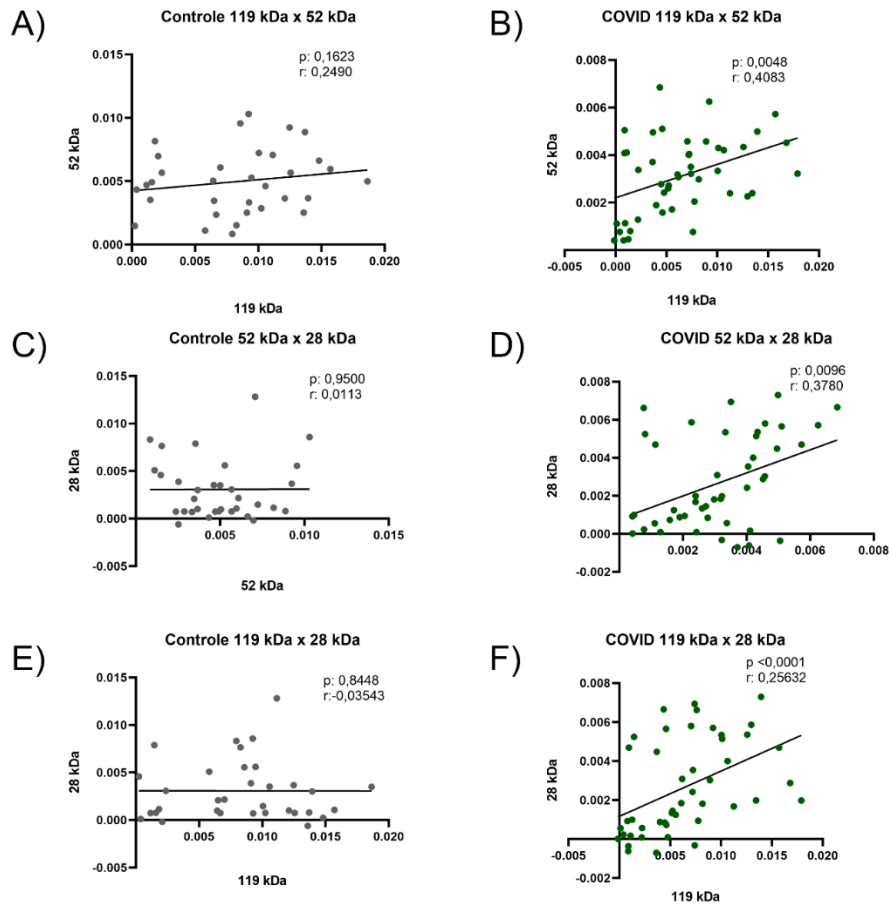
**Figura 14** - Análise de western blot para a enzima TMPRSS2



**Figura 13. (A)** Imagens representativas do Western Blot para detecção das formas de 119 kDa, 52 kDa e 28 kDa da TMPRSS2. A coloração de Ponceau S foi utilizada como controle de carregamento para garantir que a mesma quantidade de proteína foi aplicada em cada amostra. **(B)** Gráficos de densidade ótica correspondentes à quantificação das bandas. Nota-se uma diminuição estatisticamente significativa (\*\*  $p=0,0087$ ) do fragmento de 52 kDa no grupo COVID Longa. As demais formas da proteína não apresentaram alteração significativa. Grupo controle ( $n=11$ ) Grupo COVID Longa ( $n=16$ ).

Mas ao relacionar as bandas entre si, no grupo controle nenhuma banda apresentou algum tipo de correlação, em contraste, no grupo COVID Longa, todas as bandas apresentam uma correlação positiva entre si (119 x 51:  $r= 0.4083$ ,  $p= 0,0048$ ; 51 x 28:  $r = 0,3780$ ,  $p < 0,0096$ ; 119 x 28:  $r = 0.5632$ ,  $p < 0,0001$ ) (Figura 14).

**Figura 15** - Análise de correlação entre as bandas da enzima TMPRSS2



**Figura 14.** Análise de correlação de Pearson entre as densidades óticas das diferentes bandas da TMPRSS2 (119 kDa, 52 kDa e 28 kDa) nos grupos Controle (A, C e E) e COVID Longa (B, D e F). Cada ponto representa um indivíduo. **(A, C e E)** No grupo Controle, não foi observada nenhuma correlação significativa entre as diferentes formas da proteína, sugerindo uma regulação flexível. **(B, D e F)** Em contraste, no grupo COVID Longa, emerge um padrão de correlação positiva e significativa entre todas as formas da proteína, indicando a imposição de um novo e rígido padrão de regulação na condição pós viral. Os valores do coeficiente de correlação (r) e de significância (p) estão indicados em cada gráfico.

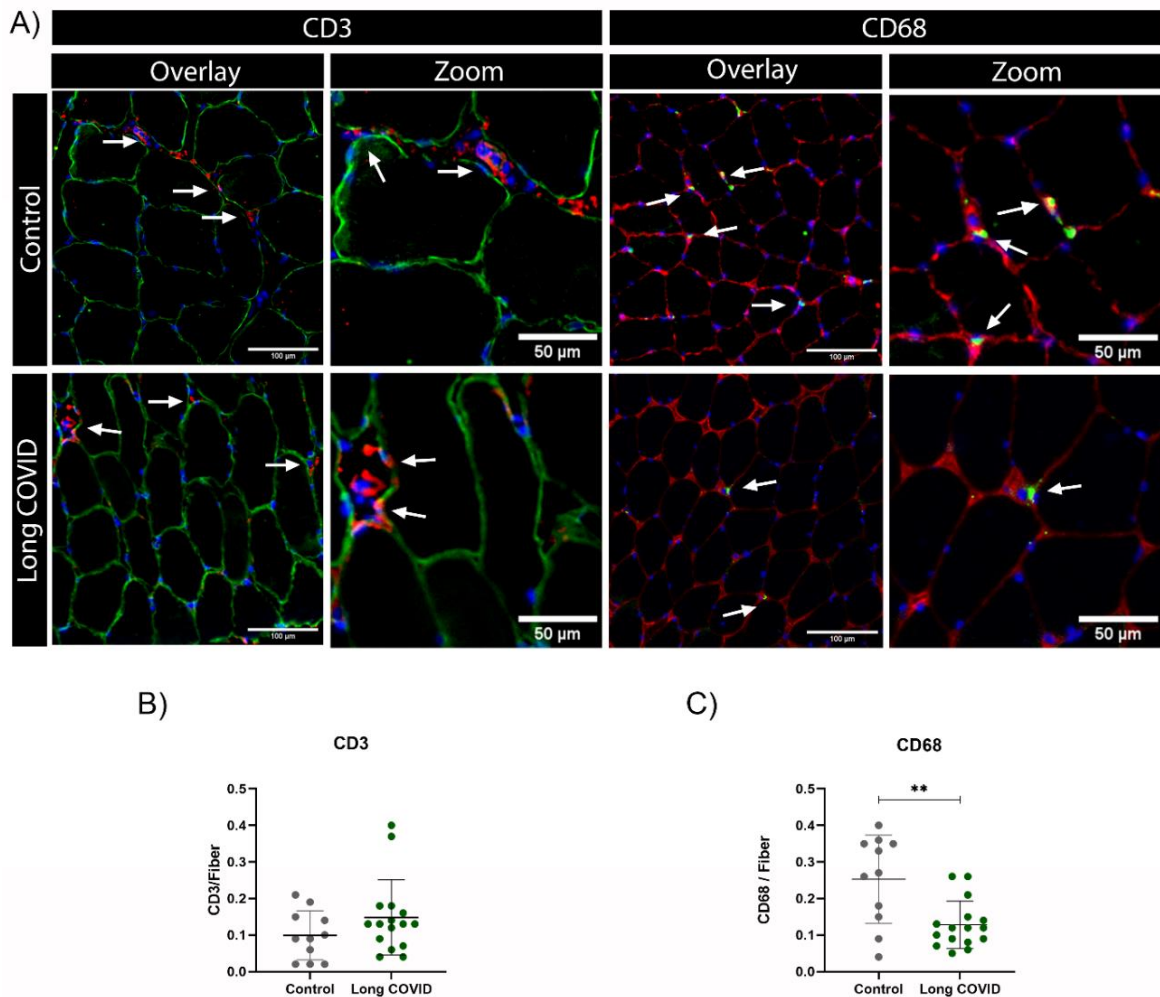
#### 4.3. O AMBIENTE TECIDUAL NÃO APRESENTA UMA INFLAMAÇÃO CELULAR CLÁSSICA.

Para investigar o perfil imunológico do tecido muscular foi realizada uma imunomarcagem específica para linfócitos T (CD3) e macrófagos (CD68).

A análise da população de linfócitos T não revelou diferença significativa do grupo COVID Longa em relação ao Grupo Controle ( $p=0,5134$ ). Em contraste, a

análise de macrófagos indicou uma diminuição desta população no grupo COVID Longa; ( $p = 0,0018$ ), (Figura 15).

**Figura 16** - Imunomarcacão de linfócitos T e macrófagos



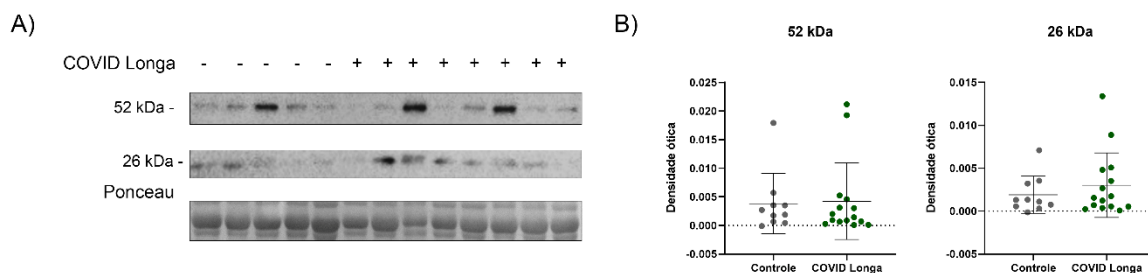
**Figura 15.** Análise por imunofluorescência de biópsias musculares de grupos Controle e COVID Longa. **(A)** Imagens representativas mostrando o infiltrado inflamatório. As secções foram coradas para CD3 (marcador de linfócitos T) em vermelho e CD68 (marcador de macrófagos) em verde. O contorno da fibra muscular (Distrofina e Laminina) é mostrado em verde e vermelho, respectivamente, e os núcleos foram corados com DAPI (azul). As setas brancas indicam células positivas para os marcadores. As colunas "Zoom" mostram uma ampliação das áreas de interesse. **(B,C)** Quantificação do número de células positivas por fibra muscular. **(B)** Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na infiltração de linfócitos T CD3+ entre os grupos. **(C)** No entanto, foi observada uma redução significativa no número de macrófagos CD68+ no grupo COVID Longa em comparação ao grupo Controle (\*\*  $p = 0,0018$ ).

#### 4.4. O PADRÃO DE REGULAÇÃO DO TNF- $\alpha$ , MAS NÃO OS SEUS NÍVEIS TOTAIS, ENCONTRA-SE ALTERADO NA COVID LONGA

Com o objetivo de compreender o perfil inflamatório do tecido muscular, foi realizada a análise da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  através da técnica de western blot.

A marcação com o anticorpo específico indicou duas bandas consistentes, de 26 kDa e 52 kDa, que equivalem à descrição da literatura das isoformas livres e de membrana, respectivamente. A análise não revelou diferença significativa nos níveis totais entre o grupo Controle e o grupo COVID Longa em ambas as bandas ( $p=0,6830$  e  $0,8490$ ) (Figura 16).

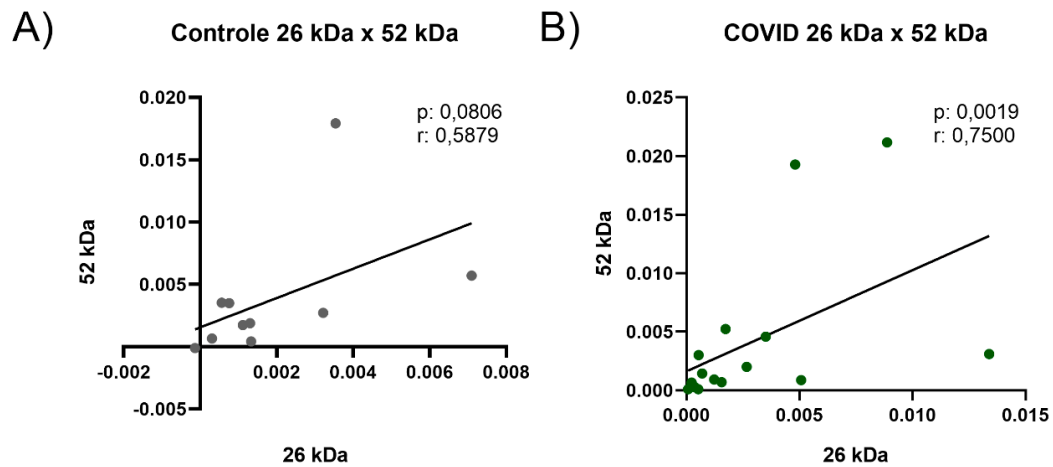
**Figura 17** - Análise por western blot dos níveis musculares de TNF- $\alpha$



**Figura 16.** (A) Imagens representativas do Western Blot para detecção das formas de 52 kDa e 26 kDa da TNF- $\alpha$ . A coloração de Ponceau S foi utilizada como controle de carregamento para garantir que a mesma quantidade de proteína foi aplicada em cada amostra, assim como para a normalização. (B) Gráficos de densidade ótica correspondentes à quantificação das bandas. As diferentes formas da proteína não apresentaram alteração significativa ( $p=0,6830$  e  $0,8490$ ).

Contudo, uma análise de correlação entre as isoformas da proteína revelou uma alteração fundamental. No grupo Controle, não foi observada correlação entre as bandas, porém, ela está presente no grupo COVID Longa, como uma correlação positiva e forte ( $r=0,75$ ;  $p=0,001$ ) (Figura 17).

**Figura 18** - Análise de correlação entre as isoformas da TNF- $\alpha$



**Figura 17.** Os gráficos verificam se os níveis das formas de 26 kDa e 52 kDa do TNF- $\alpha$  estão relacionados. **(B)** No grupo COVID Longa, foi encontrada uma correlação forte e significativa ( $p = 0,0019$ ), mostrando que os níveis das duas formas variam em conjunto. **(A)** No grupo Controle (esquerda), essa relação não foi estatisticamente significativa. Os valores do coeficiente de correlação ( $r$ ) e de significância ( $p$ ) estão indicados em cada gráfico.

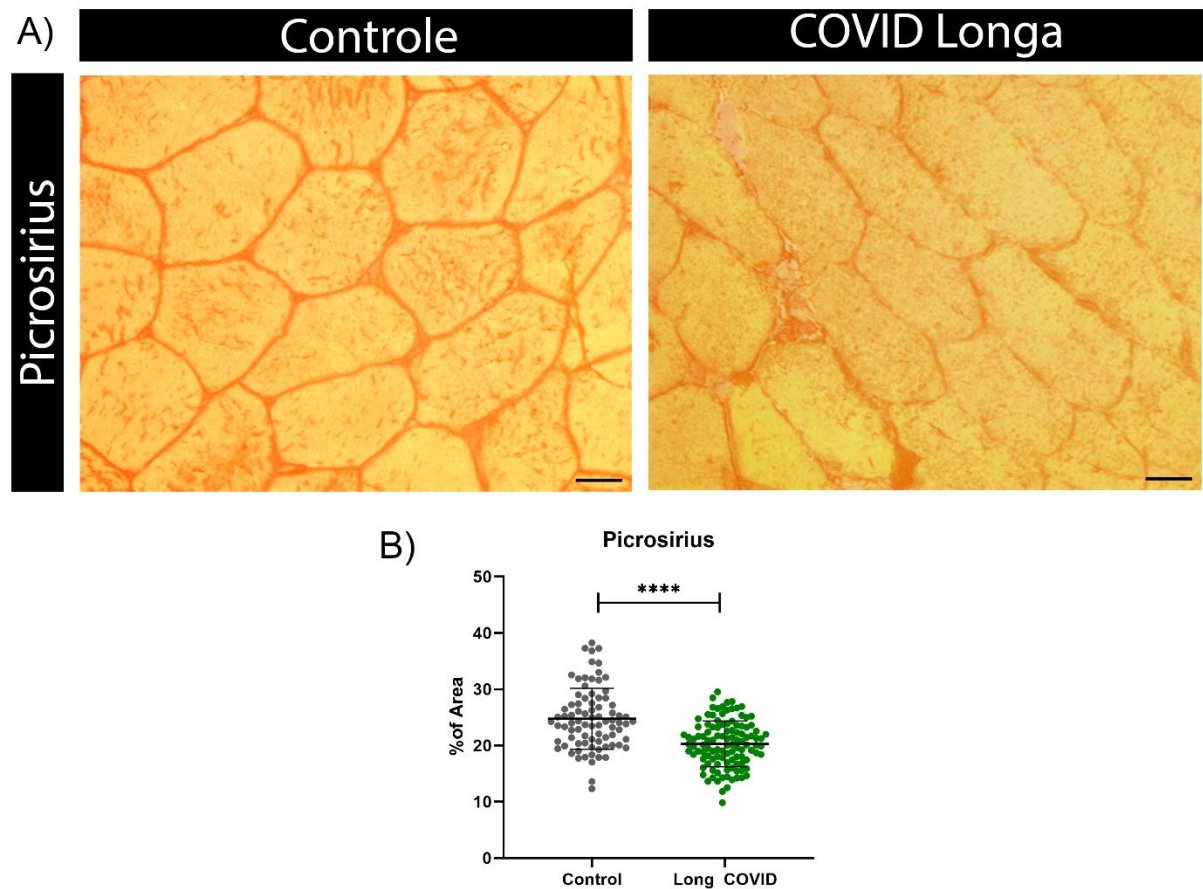
#### 4.5. A COVID LONGA INDUZ UM PERFIL ATRÓFICO E DE REMODELAÇÃO NO MÚSCULO ESQUELÉTICO

##### 4.5.1. Picrosirius Red

Para avaliar a remodelação da matriz extracelular, realizamos a coloração de Picrosirius red para quantificar o colágeno intramuscular. Ao analisar os cortes histológicos de forma qualitativa, o grupo COVID Longa apresenta pontos fibróticos bem pronunciados, sugerindo um possível aumento da matriz extracelular.

Contudo, contrariando a hipótese de um aumento na formação de fibrose, a análise quantitativa de todo o corte resultou em um resultado oposto e inesperado. Foi observada uma diminuição significativa do conteúdo colágeno do grupo COVID Longa (média e DP) em relação ao Controle (média e DP), ( $p < 0,0001$ ), (Figura 18).

**Figura 19** - Coloração para análise de colágeno intramuscular



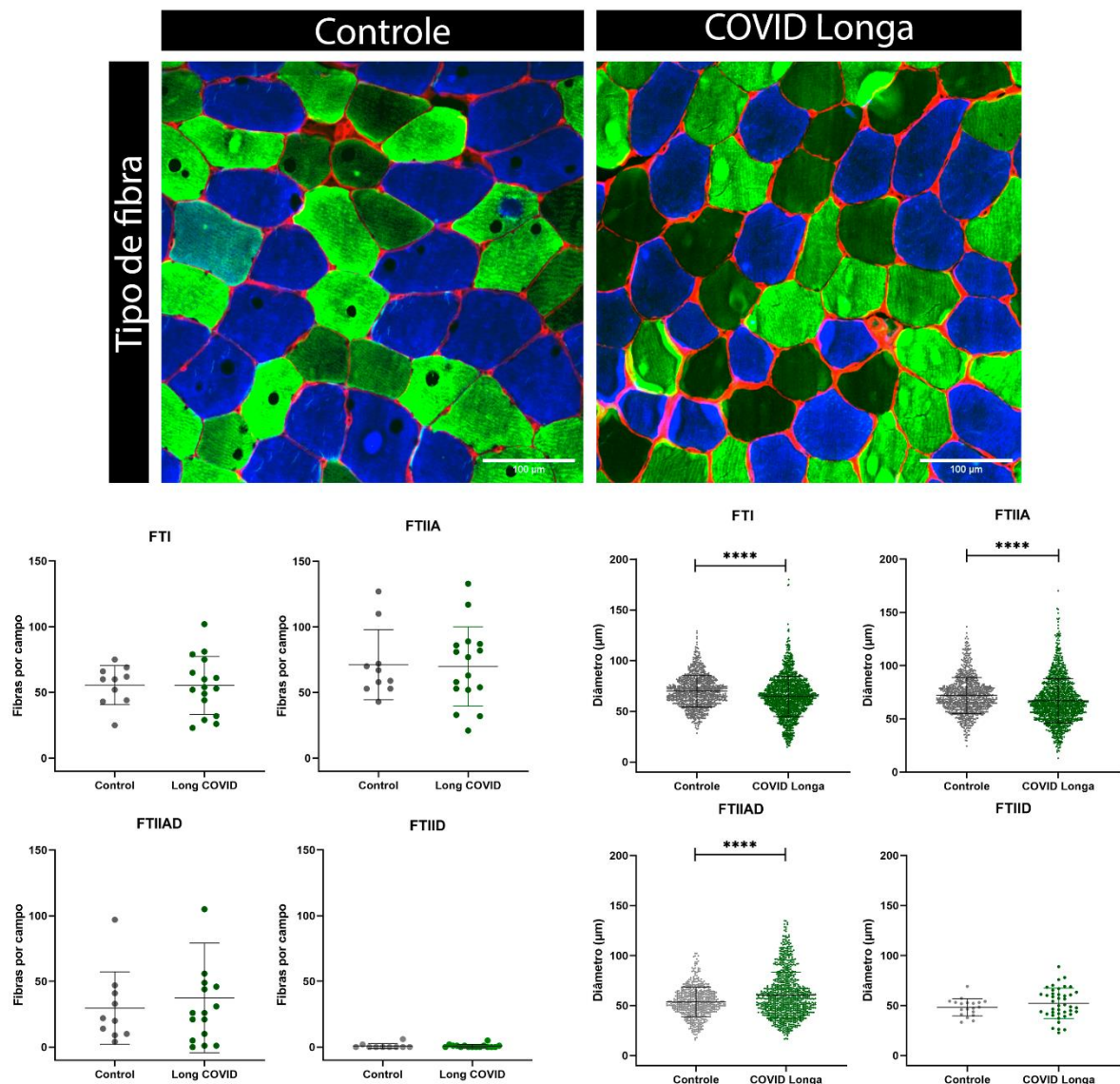
**Figura 18. (A)** As imagens mostram o músculo VL corado com Picrosirius, que marca o colágeno em vermelho. **(B)** O gráfico quantifica a porcentagem da área total que é preenchida pelo colágeno. Os resultados mostram que o grupo COVID Longa apresenta uma quantidade significativamente menor (\*\*\*\*  $p < 0,0001$ ) de colágeno em comparação ao grupo Controle.

#### 4.5.2. Imunofluorescência De Tipo De Fibra

Para compreender o comportamento do perfil metabólico e contrátil do músculo VL antes e após a infecção pela COVID-19, realizamos a imunomarcagem para reconhecimento dos diferentes tipos de fibra (FTI, FTIIA, FTIID e híbridas).

A análise de proporção de fibras não revelou alterações estatisticamente significativa entre os grupos ( $p > 0,05$ ), indicando que a composição geral do músculo não se alterou (Figura 19).

**Figura 20** - Comparação da proporção de fibras e diâmetro menor das fibras musculares



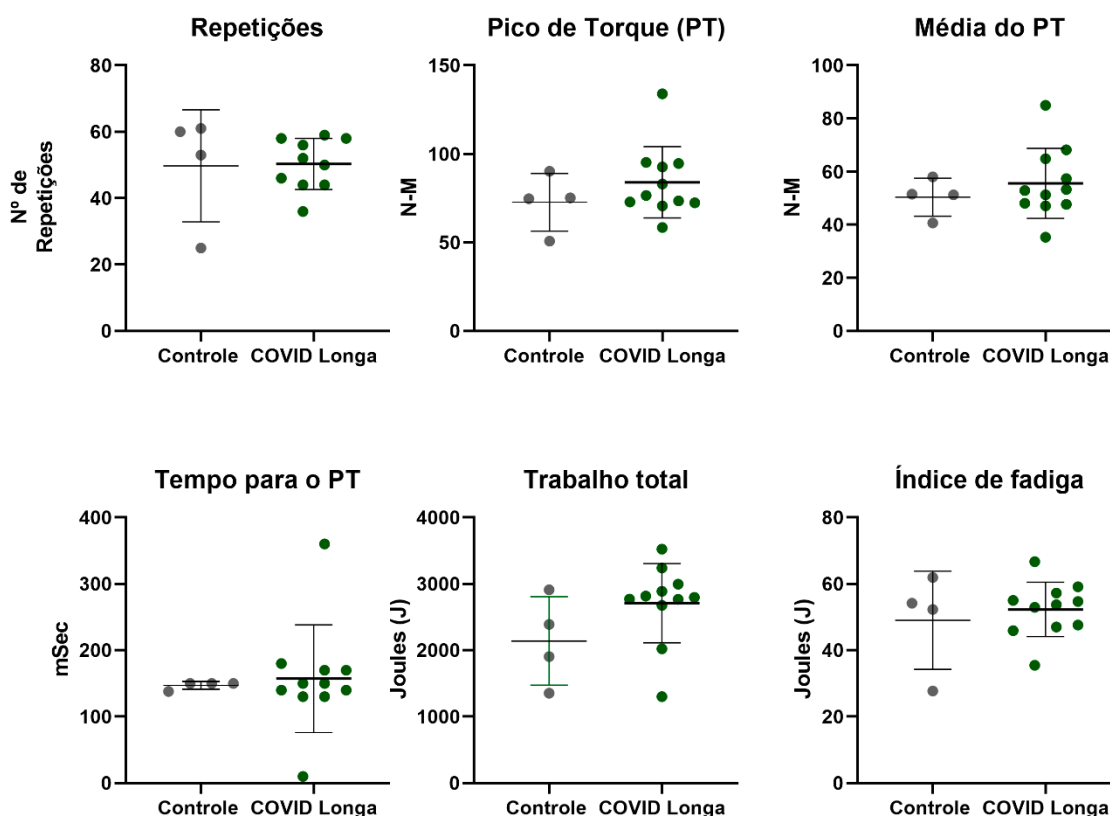
**Figura 19.** A composição e a morfometria das fibras musculares foram avaliadas por imunofluorescência contra diferentes isoformas da cadeia pesada de miosina (MHC). **(A)** Imagens representativas da tipagem de fibras. **(B)** A análise quantitativa do número de fibras por campo não mostrou alteração entre os grupos ( $p > 0,05$ ) **(C)** O diâmetro menor (de Feret) das fibras revelou que a COVID Longa está associada uma atrofia significativa das fibras do Tipo I (FTI) e Tipo IIA (FTIIA) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ) e uma hipertrofia das fibras híbridas do Tipo IIAD (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Em contraste à análise de proporção, a análise de diâmetro menor demonstrou que o grupo COVID longa possui uma diminuição significativa no diâmetro de FTI e FTIIA ( $p < 0,0001$ ). Em contrapartida, as FTIIAD (fibras híbridas) demonstraram um aumento de diâmetro no grupo COVID Longa ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

#### 4.6.A DISFUNÇÃO FUNCIONAL MUSCULAR NA COVID LONGA SE MANIFESTA A NÍVEL CELULAR.

A avaliação funcional iniciou-se em nível global para investigar se as alterações morfológicas tinham uma consequência funcional no músculo utilizando um protocolo de fadiga padronizado no dinamômetro isocinético BIODEX. A análise dos parâmetros de desempenho não revelou, no entanto, diferenças estatisticamente significativas entre os grupos ( $p > 0,05$ ) (Figura 20).

**Figura 21** - Parâmetros funcionais do protocolo isocinético de fadiga

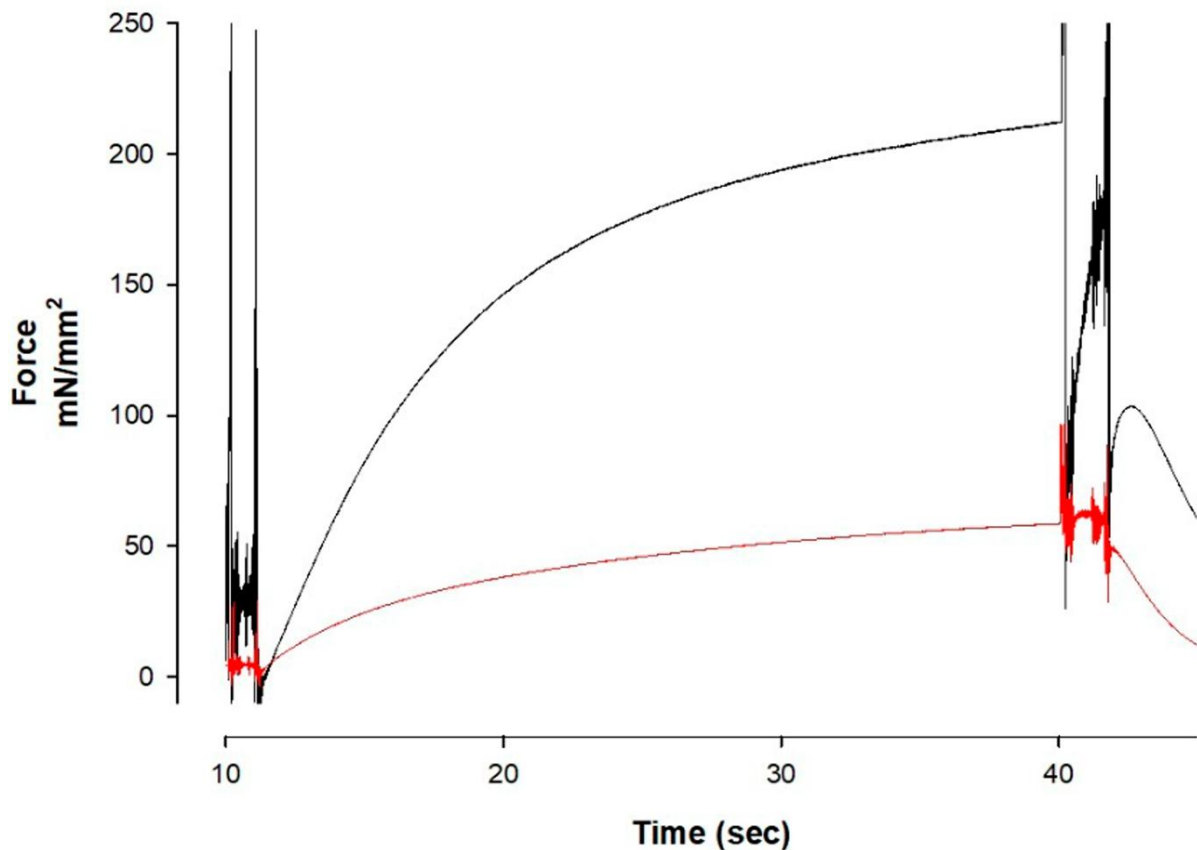


**Figura 20.** A figura apresenta os resultados da comparação entre os grupos dos parâmetros de um protocolo de fadiga muscular realizado em dinamômetro isocinético para comparar a função neuromuscular. Foram avaliados os seguintes parâmetros: número total de repetições, pico de torque (PT), média do PT, tempo para atingir o PT, trabalho total e o índice de fadiga. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos em nenhum dos parâmetros funcionais medidos ( $p > 0,05$ ).

Em contrapartida, as fibras musculares do grupo COVID Longa produziram significativamente menor força específica (força normalizada pela área da secção transversa) durante a ativação máxima (média:  $59,61 \pm 7,03$  mN) em comparação as

fibras do Grupo controle ( $199,15 \pm 40,2$  mN), (Figura 21).

**Figura 22** - Gráfico de força de contração de fibra única dos grupos controle e COVID Longa



**Figura 21.** O gráfico apresenta um traçado representativo do ensaio de contração de fibra muscular isolada. O eixo Y representa a força específica (força em mN, normalizada pela área de seção transversal da fibra em  $\text{mm}^2$ ), que avalia a capacidade intrínseca de geração de força. São mostradas curvas de uma fibra do grupo Controle (preto) e de uma fibra do grupo COVID Longa (vermelho) durante o tempo de ativação por cálcio. Observa-se que a fibra representativa do grupo COVID Longa atinge um platô de força específica inferior ao da fibra do grupo Controle ( $p < 0,001$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Este estudo baseou-se em duas hipóteses concorrentes para elucidar o possível precursor dos acometimentos morfológicos e funcional, que acarretou a aparição dos sintomas dos indivíduos com COVID Longa.

A teoria da infecção prolongada que fornece subsídio para o comprometimento muscular é refutado por três resultados encontrados neste estudo: ausência de alteração nos níveis de expressão da proteína Spike; ausência de alteração da presença da ECA2; e a diminuição da forma ativa da enzima TMPRSS2. A proteína

Spike, segundo o ensaio de Western Blot, estava presente no tecido muscular de ambos os grupos de forma estatisticamente semelhante. Identificada em duas bandas, de 44 e 28 kDa que, segundo a literatura, equivalem ao peso molecular da subunidade S2 da proteína Spike e um possível fragmento de clivagem desta (HOFFMANN et al., 2020; OGATA et al., 2022). A presença desta proteína em ambos os grupos de forma equivalente torna pouco provável a hipótese da infecção viral após um período prolongado.

Em contrapartida, estas proteínas podem ter origem vacinal, visto que identificamos a vacinação de quase todos os participantes do estudo, dentre as quais incluem vacinas que apresentam o mecanismo de mRNA (TROUGAKOS et al., 2022; RÖLTGEN et al., 2022). Este mecanismo permite que as células dos indivíduos vacinados produzam a proteína Spike, a fim dela ser identificada e utilizada na produção de anticorpos (PARDI et al., 2018; LUSTIG et al., 2021). Estudos apontam que a proteína foi identificada nestes indivíduos por mais de 245 dias após a vacinação, tornando possível o resultado encontrado neste estudo (PATTERSON et al., 2024).

A ECA2 se apresentou em três pesos moleculares diferentes 109, 51 e 28 kDa, sendo a altura de 109 kDa a mais próxima de seu peso molecular teórico de 110 kDa (LAMBERT et al., 2005; ÖRD; KIKAS, 2022). Assim como a proteína Spike, a ECA2 sofre um processo de clivagem pela enzima TMPRSS2, que tem como resultado a formação de um fragmento de 13 kDa (HEURICH et al, 2014). Fragmentos com este peso molecular não foram identificados, porém a banda de 28 kDa se assemelha ao peso molecular de um dímero deste fragmento, que se encontra diminuído nos indivíduos com COVID Longa. Inesperadamente, a banda de 51 kDa representa um achado singular, uma vez que esta não foi relatada anteriormente na literatura científica. A marcação mais próxima deste resultado é demonstrada por um estudo com indivíduos COVID-19 grave, no qual Bouillet e colaboradores (2023) encontraram uma proteína circulante, não identificada, com peso de ~70kDa, a partir da marcação com anticorpo idêntico ao utilizado neste estudo.

Inicialmente, a banda não seria utilizada para análise, visto que ela não se assemelha às características da ECA2 descritas na literatura, no entanto, ao aprofundar as análises, encontrou-se uma conexão biológica a partir de testes de correlação e da comparação do índice de processamento deste fragmento, que

evidenciaram dois comportamentos distintos e notáveis. O teste de correlação indicou uma relação positiva forte entre as bandas de 109 e 51 kDa em ambos os grupos, indicando que quando há o aumento de uma, há o aumento da outra, por outro lado, no Grupo controle as bandas de 51 kDa e a de 28 kDa apresentaram uma correlação negativa e significativa. O diferencial se fez presente justamente nesta correlação negativa das bandas de 51 e 28 kDa na qual há a discrepância no Grupo COVID Longa, indicando que a presença da doença interfere de alguma forma na formação de fragmentos da ECA2.

Por fim, devido a importância da TMPRSS2 na infecção viral, era esperado na infecção prolongada que esta enzima demonstrasse aumento, no entanto, o oposto foi evidenciado. No que diz respeito a expressão da enzima em sua forma ativa (52 kDa), ou seja, passado o processo de autoclivagem necessário para sua ativação, a TMPRSS2 demonstrou redução no Grupo COVID Longa. Este achado reforça a impossibilidade da infecção prolongada, uma vez que a diminuição da presença desta enzima dita uma capacidade reduzida de fusão das membranas, viral e celular (HOFFMANN et al., 2020).

Todavia, ao analisar a correlação das bandas marcadas pelo anticorpo da TMPRSS2 (119, 52 e 28 kDa) foi identificado uma sincronia entre as bandas do Grupo COVID Longa que não era observada no Grupo controle, ou seja, na ausência da doença observa-se uma regulação mais flexível das diferentes formas desta enzima, entretanto, ao adicionar o fator infecção e, mais especificamente, inflamação temos um padrão de degradação intenso e desregulado. É crucial notar que esta correlação positiva, associada à diminuição da banda de 52 kDa e à tendência de diminuição do precursor (119 kDa), não indica um aumento, mas sim uma diminuição síncrona de todas as formas da proteína (YILDIZ; OZCAN, 2023). Isto sugere que um único mecanismo regulatório, provavelmente induzido pela inflamação, passou a dominar e a “amarrar” todo o sistema de processamento da TMPRSS2.

A diminuição da banda de 52 kDa indica que, possivelmente, a autoclivagem da enzima TMPRSS2 pode ter exposto um domínio de degradação da proteína, que sob o efeito catalizador da inflamação, aumentou seu processamento e diminuiu sua concentração. Tal qual seu fragmento, a banda de 28 kDa, que também pode estar sob o efeito deste fator que aumenta a eficiência de sua degradação, não permitindo o acúmulo e conseqüente aumento de sua concentração, apresentando uma

correlação positiva e não negativa entre essas bandas.

Em suma, estas análises argumentam contra a hipótese de a infecção prolongada ser o principal mecanismo de entrada do vírus, pois algumas peças desse mecanismo estão comprometidas. Com a diminuição da expressão da forma ativa da TMPRSS2, a possibilidade de infecção diminui drasticamente, pois existem poucos registros da infecção independente da TMPRSS2 na literatura (JACKSON et al., 2022). Assim como é esperado que na presença intensa de um vírus ativo, haja uma alteração significativa de seu principal receptor, fato que não ocorreu neste estudo (ZIEGLER et al., 2020; NI et al., 2020). O fato de não termos observado tal alteração em nosso estudo enfraquece a hipótese da infecção viral prolongada, portanto, a presença do vírus é mais consistentemente explicada pelo processo de vacinação.

No entanto, para além de refutar a hipótese da infecção, os resultados da análise dessas proteínas indicam que existe um fenômeno ocorrendo neste tecido que promove a desorganização celular. Esta desregulação é evidenciada pela perda do controle regulado no processamento da ECA2 e, inversamente, pela imposição de um novo e rígido padrão de regulação para a TMPRSS2.

Este quadro é consistente com os efeitos a longo prazo de um estado inflamatório crônico, portanto, a presente discussão irá explorar a hipótese alternativa: de que uma inflamação sistêmica de baixo grau, decorrente da infecção aguda, promoveu um estado de desequilíbrio no músculo, resultando em alterações estruturais e funcionais que culminam nos sintomas relatados.

Para testar a hipótese inflamatória, foi investigado o perfil imunológico do tecido, que em um processo inflamatório clássico, seria esperado um aumento na infiltração de células como macrófagos e linfócitos T, essenciais para a defesa do organismo (SHAPOURI-MOGHADDAM et al., 2018). Contudo, os nossos resultados indicaram o contrário: não foi observada uma alteração significativa na população de linfócitos T, e, de forma inesperada, encontramos uma diminuição significativa na população de macrófagos no tecido muscular dos indivíduos com COVID Longa, argumentando contra uma miopatia inflamatória clássica.

A diminuição de macrófagos é um achado intrigante, que pode refletir um processo de exaustão imune após a resposta intensa da fase aguda, como já foi proposto (PINNEY et al., 2020). No entanto, a ausência de um infiltrado celular não significa a ausência de um estado inflamatório. Pelo contrário, dados de um estudo

colaborador, do nosso grupo de pesquisa, nestes mesmos participantes indicam um aumento da citocina pró-inflamatória IL-1 $\beta$  no tecido muscular (dados não publicados).

Este ambiente rico em IL-1 $\beta$  pode explicar não apenas a inflamação de baixo grau, mas também a possível alteração na população de macrófagos. Estudos demonstram que a IL-1 $\beta$  é um potente indutor do fenótipo pró-inflamatório M1 e pode inibir a diferenciação dos macrófagos do tipo M2, que são cruciais para o reparo muscular (MANTOVANI et al., 2004). Este estado de inflamação de baixo grau parece ser o gatilho para a remodelação tecidual observado, na qual a supressão da via de reparo, potencialmente mediada pela inibição dos macrófagos M2, pode explicar diretamente os nossos achados morfológicos, como alterações no tamanho das fibras, que será elucidado a seguir, e da matriz extracelular.

A função primordial dos macrófagos M2 é orquestrar a fase de resolução da inflamação e a remodelação tecidual (MANTOVANI et al., 2004). A ausência ou diminuição da sua atividade pode justificar o nosso resultado inesperado de diminuição do conteúdo de colágeno intramuscular. Em vez de uma fibrose cicatricial, o ambiente inflamatório persistente, rico em IL-1 $\beta$ , parece favorecer um estado de degradação da matriz, possivelmente mediado por metaloproteinases, que não é contrabalançado por um reparo eficaz (RULLMAN et al., 2009).

Para além da matriz, esta mesma falha no processo regenerativo tem consequências diretas para as próprias fibras musculares, impactando a população de células satélite, que são as células responsáveis pelo reparo e manutenção do músculo (TIDBALL et al., 2010). Os macrófagos M2 são conhecidos por liberar fatores que promovem a ativação e a diferenciação das células satélite, portanto, um ambiente inflamatório que inibe a polarização M2, como o que foi observado, pode prejudicar a capacidade regenerativa do tecido. Dados paralelos obtidos em nosso grupo de pesquisa observou uma redução de CS em fase de diferenciação nas amostras desses participantes (dados não publicados).

Isto se torna evidente quando o diâmetro menor dos diferentes tipos de fibra é analisado e é observado uma atrofia seletiva das fibras do tipo I e IIA, um dos achados centrais deste estudo. O acometimento de fibras oxidativas e mais resistentes a fadiga pode ser o cerne dos sintomas de fadiga e intolerância ao exercício reportado pelos indivíduos com COVID Longa (QAISAR; BHASKARAN; VAN REMMEN, 2016; AGERGAARD et al., 2021; HEJOL et al., 2022). E uma via molecular que pode explicar

este fenômeno, consistente com o estado de baixo aporte de oxigênio reportado na COVID Longa, é a ativação da via AMPK/FoxO3 (SANDRI, 2010). A ativação da AMPK é um gatilho fundamental para a autofagia, o processo pelo qual a célula degrada os seus próprios componentes para obter energia (SANCHEZ et al., 2012). Este aumento na degradação de proteínas e organelas, sem uma síntese proteica correspondente, culmina na atrofia da fibra muscular e pode explicar o déficit funcional observado a nível celular (BONALDO; SANDRI, 2013; YOSHII; KISHI, 2024).

A consequência final destas alterações estruturais é o comprometimento da função, no qual é destacado o fato de que: o resultado do teste de força de contração de fibra única indica que a capacidade de geração de força do Grupo COVID Longa está reduzida em quase três vezes em comparação ao controle. Este é, talvez, o dado mais relevante clinicamente, pois não se encontra na literatura esta análise para indivíduos com as formas leves e moderadas da doença. Este déficit de força é consistente com as alterações de trofismo observadas e com o estado inflamatório identificado (PEDRAZZANI et al., 2021; FENWICK et al., 2021). A magnitude desta disfunção, contudo, sugere que a patologia vai além da simples redução do tamanho da fibra, apontando para duas possíveis disfunções a nível molecular: uma redução na quantidade de proteínas contráteis e uma deterioração na sua função.

A diminuição da força específica está, em parte, diretamente ligada à atrofia seletiva das fibras do tipo I e IIA que foi descrito anteriormente que, neste contexto, reflete uma perda de proteínas contráteis, como a actina e a miosina (POWERS et al., 2012). Este processo catabólico é consistente com a via de autofagia ativada pela AMPK/FoxO3, que foi proposto como um possível mecanismo central neste estudo (SANDRI, 2010). Portanto, uma das razões fundamentais para a fibra ser mais fraca é porque ela pode ter, efetivamente, menos pontes cruzadas (actina-miosina) por área de secção transversa para gerar força.

No entanto, a profunda perda de força sugere que a atrofia, por si só, pode não explicar todo o fenômeno. É plausível que exista também um déficit qualitativo na função das proteínas contráteis restantes. O estado inflamatório crônico de baixo grau é um conhecido indutor de stress oxidativo (REID & LI, 2001) e as espécies reativas de oxigênio (EROS) podem causar modificações pós-traducionais diretamente nas proteínas do sarcômero, como a miosina, prejudicando a sua capacidade de formar pontes cruzadas ou alterando a cinética do seu ciclo de contração (POWERS;

JACKSON, 2008). Essa hipótese pode ser fortalecida com dados obtidos com a técnica de espécie reativa de oxigênio, realizada pelo nosso grupo e ainda não publicada, que mostrou aumento de EROS. Assim, o profundo déficit funcional observado a nível celular pode ser o resultado de uma combinação de uma redução no número de unidades contráteis e uma diminuição na eficiência de cada uma delas.

Apesar do profundo déficit funcional a nível celular, este não foi observado a nível global, segundo os resultados do teste isocinético, em concordância com outros estudos que também não encontraram diferenças em testes globais numa população semelhante (KACZMARCZYK et al., 2024; SEPIC et al., 2024). Esta discrepância pode ser explicada pela notável plasticidade do músculo esquelético, pois é possível observar, por exemplo, uma hipertrofia das fibras híbridas (IIAD), o que pode ser atribuído a um movimento compensatório, com a finalidade de suprir as exigências do cotidiano. Esta compensação pode ser suficiente para manter a força em testes globais, mas não para sustentar a atividade diária, explicando a fadiga persistente, o que é consistente com os mecanismos de compensação neuromuscular descritos na literatura (HEPPLE; RICE, 2016; LARSSON et al., 2019).

De todo modo, compreender que a patologia muscular na COVID Longa é caracterizada por uma inflamação de baixo grau que leva à atrofia de fibras oxidativas e consequente disfunção a nível celular, abre novos caminhos para o planejamento terapêutico. Os resultados deste trabalho suportam cientificamente a escolha de protocolos de reabilitação focados em exercícios de resistência, que estimulam preferencialmente a reestruturação e o fortalecimento de fibras mais oxidativas, como já foi sugerido por estudos clínicos positivos (SALVADEGO et al., 2013; KACZMARCZYK et al., 2024). Em conclusão, este estudo elucida mecanismos celulares e moleculares que justificam os sintomas musculares na COVID Longa e fornece uma base racional para o desenvolvimento de futuras estratégias de tratamento.

## **6. CONCLUSÃO**

O presente estudo investigou duas hipóteses para os sintomas musculares na COVID Longa, obtendo resultados que refutam a hipótese da infecção viral persistente baseando-se na ausência de acúmulo de antígenos virais e na atenuação da maquinaria de entrada celular (ACE2/TMPRSS2) e fornecem forte suporte para a

hipótese de que os sintomas não são uma consequência de uma desregulação inflamatória clássica, mas sim de uma alteração do sistema imune.

O suporte para uma possível inflamação atípica vem da assinatura de um fenômeno que promove a desregulação do processamento de proteínas e da ausência inesperada de células imunes clássicas de processos inflamatórios. Com isso, temos uma remodelação da matriz extracelular e atrofia seletiva das fibras musculares oxidativas, alterações morfológicas que culminam num profundo déficit funcional a nível celular, explicando a base fisiopatológica para a fadiga e a fraqueza muscular reportadas pelos pacientes

Portanto, este trabalho conclui que a patologia muscular na COVID Longa é um fenômeno de perda da homeostase tecidual impulsionado por um possível “eco” inflamatório, e não por dano viral direto, que promovem alterações morfológicas intensas; o que sugere que estratégias terapêuticas devem ser voltadas para a modulação da resposta imune e na reabilitação do perfil oxidativo muscular.

## 7. AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil. Processo nº 2023/18418-3 e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil. Processo nº 130364/2023-1.

## 8. REFERÊNCIAS

AGERGAARD, J. et al. Myopathic changes in patients with long-term fatigue after COVID-19. **Clinical Neurophysiology**, v. 132, n. 8, p. 1974–1981, ago. 2021.

ALSAAD, K. O. et al. Histopathology of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) infection - clinicopathological and ultrastructural study. **Histopathology**, v. 72, n. 3, p. 516–524, 21 nov. 2017.

BHUTDA, S. et al. Histochemical Staining of Collagen and Identification of Its Subtypes by Picrosirius Red Dye in Mouse Reproductive Tissues. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 21, 2017.

BLOEMBERG, D.; QUADRILATERO, J. Rapid Determination of Myosin Heavy Chain Expression in Rat, Mouse, and Human Skeletal Muscle Using Multicolor Immunofluorescence Analysis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35273, 18 abr. 2012.

BOUILLET, L. et al. Molecular Mechanisms of Endothelialitis in SARS-CoV-2 Infection: Evidence for VE-Cadherin Cleavage by ACE2. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12525–12525, 7 ago. 2023.

CORNACHIONE, A. S.; RASSIER, D. E. A non-cross-bridge, static tension is present in permeabilized skeletal muscle fibers after active force inhibition or actin extraction. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 302, n. 3, p. 566–574, 2012. DOI: 10.1152/ajpcell.00355.2011.

CORNELL UNIVERSITY ERGONOMIS WEB. **Cornell Musculoskeletal Discomfort Questionnaires (CMDQ)**. [s. l.], 2021. Disponível em: <http://ergo.human.cornell.edu/ahmsquest.html>. Acesso em: 26 fev. 2021.

COSTA, L. da C. M.; MAHER, C. G.; MCAULEY, J. H.; HANCOCK, M. J.; OLIVEIRA, W. 587 de M.; AZEVEDO, D. C.; POZZI, L. M. A. F.; PEREIRA, A. R. S.; COSTA, L. O. P. The Brazilian-Portuguese versions of the McGill Pain Questionnaire were reproducible, valid, and responsive in patients with musculoskeletal pain. **Journal of Clinical Epidemiology**, v. 64, n. 8, p. 903–912, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jclinepi.2010.12.009>

DHAMA, K. et al. Coronavirus disease 2019–COVID-19. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, D.C., v. 33, n. 4, p. e00028-20, jun. 2020. DOI: 10.1128/CMR.00028-20.

DOS SANTOS, P.K.; SIGOLI, E.; BRAGANÇA, L.J.G.; CORNACHIONE, A.S. The Musculoskeletal Involvement After Mild to Moderate COVID-19 Infection. **Frontiers in Physiology**. 2022 Mar 18;13:813924. DOI: 10.3389/fphys.2022.813924.

EL-ARIF, G. et al. The Renin-Angiotensin System: A Key Role in SARS-CoV-2-Induced COVID-19. **Molecules**, v. 26, n. 22, p. 6945–6945, 17 nov. 2021.

FENWICK, A. J.; WOOD, A. M.; TANNER, B. C. W. The spatial distribution of thin filament activation influences force development and myosin activity in computational models of muscle contraction. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 703, p. 108855, maio 2021. DOI: 10.1016/j.abb.2021.108855.

GHINI, V. et al. COVID-19: A complex disease with a unique metabolic signature. **PLOS Pathogens**, v. 19, n. 11, p. e1011787, 9 nov. 2023.

GRILLO, B. A. C. et al. Acute Training after Muscle Atrophy in the Muscle Belly. **Muscles, Ligaments and Tendons Journal**, v. 15, n. 1, 2025.

HAN, D. P.; PENN-NICHOLSON, A.; CHO, M. W. Identification of critical determinants on ACE2 for SARS-CoV entry and development of a potent entry inhibitor. **Virology**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 15-25, jun. 2006. DOI: 10.1016/j.virol.2006.01.029.

HANNAH, J. R. et al. Skeletal muscles and Covid-19: a systematic review of rhabdomyolysis and myositis in SARS-CoV-2 infection. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v. 40, n. 2, p. 329–338, 1 fev. 2022.

HEDGE, A.; MORIMOTO, S.; MCCROBIE, D. Effects of keyboard tray geometry on upper body posture and comfort. **Ergonomics**, v. 42, n. 10, p. 1333–1349, 1999. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/001401399184983>

HEJOL, E. K. et al. Myopathy as a cause of fatigue in long-term post-COVID-19 symptoms: Evidence of skeletal muscle histopathology. **European Journal of Neurology**, v. 29, p. 2832–2841, 2022. DOI: 10.1111/ene.15460.

HEPPLE, R. T.; RICE, C. L. Innervation and neuromuscular control in ageing skeletal muscle. **The Journal of Physiology**, London, v. 594, n. 8, p. 1965-1978, abr. 2016. DOI: 10.1113/JP270555.

HEURICH, A. et al. TMPRSS2 and ADAM17 cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein. **Journal of Virology**, v. 88, n. 2, p. 1293–1307, jan. 2014. DOI: 10.1128/JVI.01925-13.

HIRANO, T. IL-6 in inflammation, autoimmunity and cancer. **International Immunology**, v. 33, n. 3, p. 127–148, 18 dez. 2020.

HOFFMANN, M. et al. SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 271–280.e8, 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.02.052.

HORWATH, O. et al. Skeletal Muscle Fiber Type: A Narrative Review of Its Impact on Performance, Metabolism, and Health. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 24, n. 24, p. 17296, dez. 2023. DOI: 10.3390/ijms242417296.

HUSSELL, T.; BELL, T. J. Innate immunity in the lungs. **Proceedings of the American Thoracic Society**, New York, v. 11, n. 2, p. 126-130, mar. 2014. DOI: 10.1513/pats.201309-319RM.

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H. The cell biology of SARS-CoV-2. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 23, n. 4, p. 239-256, abr. 2022. DOI: 10.1038/s41580-022-00468-6.

JANSSEN, I.; HEYMSFIELD, S. B.; ROSS, R. Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18–88 years. **Journal of Applied Physiology**, v. 89, n. 1, p. 81–88, jul. 2000. DOI: 10.1152/jappl.2000.89.1.81.

JOSE, R. J.; MANUEL, A. Pathophysiology of COVID-19: mechanisms of organ injury. **The Lancet**, London, v. 401, n. 10387, p. 1525-1540, 6 mai. 2023. DOI: 10.1016/S0140-6736(23)00474-7.

KACZMARCZYK, K. et al. Resistance Exercise Program Is Feasible and Effective in Improving Functional Strength in Post-COVID Survivors. **Journal of Clinical Medicine**, v. 13, n. 6, p. 1712, 1 jan. 2024. DOI: 10.3390/jcm13061712.

KATZ, J.; MELZACK, R. The McGill Pain Questionnaire: Development, psychometric properties, and usefulness of the long-form, short-form, and short-form-2. In: TURK, D.C.; MELZACK, R. (org.). **Handbook of pain assessment**. 3. ed. New York: Guilford Press, 2011. p. 45–66.

KICIC, A. et al. The Epithelium in Respiratory Viral Infections. **Annual Review of Physiology**, Palo Alto, v. 81, p. 431-459, fev. 2019. DOI: 10.1146/annurev-physiol-020518-114323.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 84, n. 2, p. 649-698, abr. 2004. DOI: 10.1152/physrev.00031.2003.

LARSSON, L.; DEGENER, S.; LI, M.; SALVIATI, G.; STÅHL, O. Sarcopenia: Aging-Related Loss of Muscle Mass and Function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 99, n. 1, p. 427-511, jan. 2019. DOI: 10.1152/physrev.00015.2018.

LI, W. et al. Bats are natural reservoirs of SARS-like coronaviruses. **Science**, v. 310, n. 5748, p. 676–679, 28 out. 2005. DOI: 10.1126/science.1118391.

LUSTIG, Y. et al. BNT162b2 COVID-19 vaccine and correlates of humoral immune responses and dynamics: a prospective, single-centre, longitudinal study in health-care workers. **The Lancet Respiratory Medicine**, London, v. 9, n. 9, p. 999-1009, set. 2021. DOI: 10.1016/S2213-2600(21)00220-4.

MAHMOOD, T.; YANG, P.-C. Western blot: technique, theory, and trouble shooting. **Journal of Visualized Experiments**, Cambridge, n. 62, p. e3992, abr. 2012.

DOI: 10.3791/3998.

MANTOVANI, A.; SICA, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; VECCHI, A.; LOCATI, M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. **Trends in Immunology**, v. 25, n. 12, p. 677–686, Dez. 2004. doi:10.1016/j.it.2004.09.015

MAZZOLI, M. et al. Myofiber Type-Specific Expression of SARS-CoV-2 Receptor ACE2 in Human Skeletal Muscles. **Cells**, Basel, v. 9, n. 10, p. 2221, out. 2020. DOI: 10.3390/cells9102221.

MUNBLIT, D. et al. Long COVID: an update for clinicians. **BMJ**, London, v. 382, p. e072121, 2 ago. 2023. DOI: 10.1136/bmj-2022-072121.

NG, L. et al. Review of the epidemiological and clinical features of the 2003 SARS outbreak in Beijing. **Hypertension Research**, v. 31, n. 5, p. 825-833, 2008. DOI: 10.1291/hypres.31.825.

NI, W. et al. Role of angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2) in COVID-19. **Journal of Medical Virology**, Hoboken, v. 92, n. 5, p. 471-472, mai. 2020. DOI: 10.1002/jmv.25750.

OGATA, A. F. et al. Persistent SARS-CoV-2 antigens in patients with post-acute sequelae of COVID-19. **Clinical Infectious Diseases**, Oxford, v. 75, n. 1, p. e476-e480, 1 ago. 2022. DOI: 10.1093/cid/ciac463.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **Coronavirus disease (COVID-19): Post COVID-19 condition**. Genebra: OMS, 2024. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-\(covid-19\)-post-covid-19-condition](https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/coronavirus-disease-(covid-19)-post-covid-19-condition). Acesso em: 23 jul. 2025.

PARDI, N. et al. mRNA vaccines — a new era in vaccinology. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 17, n. 4, p. 261-279, abr. 2018. DOI: 10.1038/nrd.2017.243.

PATTERSON, B. K. et al. Detection of S1 spike protein in CD16+ monocytes up to 245 days in SARS-CoV-2-negative post-COVID-19 vaccine syndrome (PCVS) individuals. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 15, p. 1381428, mai. 2024. DOI: 10.3389/fimmu.2024.1381428.

PEDRAZZANI, P. S. et al. Twenty-one days of low-intensity eccentric training improve morphological characteristics and function of soleus muscles of mdx mice. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 3550, 11 fev. 2021. DOI: 10.1038/s41598-021-

83115-0.

PEIRIS, J. S. M. et al. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. **The Lancet**, London, v. 361, n. 9366, p. 1319-1325, 19 abr. 2003. DOI: 10.1016/s0140-6736(03)13077-2.

PEIRIS, J. S. M. et al. The severe acute respiratory syndrome. **The New England Journal of Medicine**, v. 349, n. 25, p. 2431–2441, 18 dez. 2003. DOI: 10.1056/NEJMra032498.

PESCARU, C. C. et al. The Effects of COVID-19 on Skeletal Muscles, Muscle Fatigue and Rehabilitation Programs Outcomes. **Medicina**, v. 58, n. 9, p. 1199, 1 set. 2022.

PINNEY, J. J. et al. Macrophage hypophagia as a mechanism of innate immune exhaustion in mAb-induced cell clearance. **Blood**, v. 136, n. 18, p. 2065–2079, 29 out. 2020. DOI: 10.1182/blood.2020005739.

POWERS, S. K.; JACKSON, M. J. Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 88, n. 4, p. 1243-1276, out. 2008. DOI: 10.1152/physrev.00031.2007.

POWERS, S. K.; WIGGS, M. P.; DUARTE, J. A.; ZETTERGREN, K. K.; DEMIRELE, H. A. Skeletal muscle myopathy in heart failure: a role for oxidative stress. **The Journal of Pathology**, Chichester, v. 228, n. 3, p. 288-300, nov. 2012. DOI: 10.1002/path.4002.

QAISAR, R.; BHASKARAN, S.; VAN REMMEN, H. Muscle fiber type diversification during exercise and regeneration. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 98, p. 56–67, set. 2016. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2016.01.010.

REID, M. B.; LI, Y. Cytokines and oxidative signalling in skeletal muscle. **Acta Physiologica Scandinavica**, Oxford, v. 173, n. 3, p. 177-187, nov. 2001. DOI: 10.1046/j.1365-201x.2001.00936.x.

RÖLTGEN, K. et al. Immune imprinting, breadth of variant recognition, and germinal center response in human SARS-CoV-2 infection and vaccination. **Cell**, Cambridge, v. 185, n. 6, p. 1025-1040.e14, 17 mar. 2022. DOI: 10.1016/j.cell.2022.01.018.

SALVADEGO, D. et al. Skeletal muscle oxidative function in vivo and ex vivo in athletes with marked hypertrophy from resistance training. **Journal of Applied Physiology**, v. 114, n. 11, p. 1527–1535, 1 jun. 2013. DOI:

10.1152/jappphysiol.01149.2012.

SANDRI, M. Autophagy in skeletal muscle. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 584, n. 7, p. 1411-1416, abr. 2010. DOI: 10.1016/j.febslet.2010.01.056.

SANTOS, F. L.; FERNANDES, P. A.; RAMOS, M. J. Enzima TMPRSS2: Um alvo promissor para a terapia da COVID-19. **Revista de Ciência Elementar**, Porto, v. 9, n. 4, p. 065, dez. 2021. DOI: 10.24927/rce2021.065.

SEIXAS, M. L. G. A. et al. Unraveling Muscle Impairment Associated With COVID-19 and the Role of 3D Culture in Its Investigation. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, 10 fev. 2022.

SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Fiber Types in Skeletal Muscle. In: CHAMBERLAIN, D. J. P. L.; BUTLER-BROWNE, G. S. (ed.). **Skeletal Muscle Regeneration in the Mouse**. New York: Humana Press, 2017. p. 1-14. DOI: 10.1007/978-1-4939-6773-2\_1.

SHAPOURI-MOGHADDAM, A. et al. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. **Journal of Cellular Physiology**, v. 233, n. 9, p. 6425–6440, 1 mar. 2018. DOI: 10.1002/jcp.26429.

SORARDI, C. et al. A clinical case definition of post-COVID-19 condition by a Delphi consensus. **The Lancet Infectious Diseases**, London, v. 21, n. 12, p. e373-e376, dez. 2021. DOI: 10.1016/S1473-3099(21)00703-9.

TALBOT, J.; MAVES, L. Skeletal Muscle Fiber type: Using Insights from Muscle Developmental Biology to Dissect Targets for Susceptibility and Resistance to Muscle Disease. **Wiley Interdisciplinary reviews. Developmental Biology**, v. 5, n. 4, p. 518–34, 2016.

TIDBALL, J. G. Mechanisms of muscle injury, repair, and regeneration. **Comprehensive Physiology**, v. 1, n. 4, p. 2029-2062, 2011. DOI: 10.1002/cphy.c100043.

TROUGAKOS, I. P. et al. The COVID-19 vaccine development landscape. **Nature Reviews Drug Discovery**, London, v. 21, n. 9, p. 651-652, set. 2022. DOI: 10.1038/d41573-021-00186-8.

V'KOVSKI, P. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 3, p. 155–170, mar. 2021. DOI: 10.1038/s41579-020-00468-6.

VAREILLE, M. et al. The role of the airway epithelium in the innate immune

response to respiratory viral infection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St. Louis, v. 127, n. 1, p. 13-24, jan. 2011. DOI: 10.1016/j.jaci.2010.11.011.

VAROLI, F. K.; PEDRAZZI, V. Adapted version of the McGill pain questionnaire to Brazilian Portuguese. **Brazilian Dental Journal**, v. 17, n. 4, p. 328–335, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-64402006000400012>

YILDIZ, P.; OZCAN, S. A single protein to multiple peptides: Investigation of protein-peptide correlations using targeted alpha-2-macroglobulin analysis. **Talanta**, v. 265, p. 124878, dez. 2023.

YOSHII, T.; KISHI, T. Molecular Mechanisms of Skeletal Muscle Atrophy and Hypertrophy. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 25, n. 13, p. 6994, jun. 2024. DOI: 10.3390/ijms25136994.


ZIEGLER, C. G. K. et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 is an interferon-stimulated gene in human airway epithelial cells and is detected in specific cell subsets across tissues. **Cell**, Cambridge, v. 181, n. 5, p. 1016-1035.e19, 28 mai. 2020. DOI: 10.1016/j.cell.2020.04.035.

ZUMLA, A.; HUI, D. S.; PERLMAN, S. Middle East respiratory syndrome. **The Lancet**, London, v. 386, n. 9997, p. 995-1007, 5 set. 2015. DOI: 10.1016/S0140-6736(15)60454-8.

## ANEXO A – Aprovação do Comitê de ética

**Título da Pesquisa:** O impacto do novo coronavírus SARS-CoV-2 no músculo esquelético. Análises morfológicas, bioquímicas e funcionais  
**Pesquisador Responsável:** ANABELLE SILVA CORNACHIONE  
**Área Temática:**  
**Versão:** 8  
**CAAE:** 39913520.3.0000.5504  
**Submetido em:** 29/11/2023  
**Instituição Proponente:** Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
**Situação da Versão do Projeto:** Aprovado  
**Localização atual da Versão do Projeto:** Pesquisador Responsável  
**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio



Comprovante de Recepção:  PB\_COMPROVANTE\_RECEPCAO\_2252946

## ANEXO B – Participação em Congresso Científico Internacional

51<sup>st</sup> European Muscle Conference

Poster session II

P II-25

**Long COVID leads to force decrease in single fibers from the vastus lateralis muscle of humans which is accompanied by morphological changes and trophism**

Rosangela Aline Antão<sup>1</sup>, Emilly Sigoli<sup>1</sup>, Giovana Bernardes<sup>1</sup>, Sarah Calado Galvão de Melo<sup>1</sup>, Alessandra Jungers Okuyama<sup>1</sup>, Dilson E. Rassier<sup>2</sup>, Anabelle Cornachione<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Federal University of São Carlos, Brazil  
<sup>2</sup>Simon Fraser University, Canada

Skeletal muscle-related symptoms are common in persons with prolonged COVID. Several physiological systems are affected in patients with prolonged COVID, including the musculoskeletal system, causing fatigue and muscle weakness. To date, few studies have conducted an in-depth analysis of individuals who manifested mild and moderate symptoms of COVID-19, and especially on the functionality of skeletal muscle fibers. In this study, participants (age range: 18 to 50 years) were assigned in long COVID or control groups, both without comorbidities and no constant physical training. In the long COVID group, participants presented several muscle symptoms, such as muscle weakness, myalgia and fatigue. Samples of the vastus lateralis muscle were obtained by needle biopsy. Single fibers were dissected from permeabilized muscles, and maximum active force ( $pCa^{2+}4.5$ ; sarcomere length of  $2.5\mu m$ ) was tested. Histological and immunofluorescence techniques were applied to analyze the morphological alterations, different fibers type and trophism. Single fibers from long COVID group showed a significant reduction of isometric force when compared to the control group ( $p<0.05$ ). Morphological alterations were observed in muscle fibers of the long COVID group. We also observed changes in trophism of FTI, FTIIA and FTIIAD fibers. The minimal ferret showed a significant reduction in trophism of FTI and FTIIA in long COVID group when compared to the control group ( $p<0.05$ ). On the other hand, the FTIIAD showed an increase of trophism in long COVID group ( $p<0.05$ ). The proportion of fiber types was not significantly different between the groups. Our study provides new information about the impairment of skeletal muscle resulting from infection with the SARS-Cov-2 virus. These data may be important to elucidate effective and more promising treatments for the patients. Financial support: FAPESP process (2020/14172-1).

## ANEXO C – Participação de Congresso Científico Nacional (Menção Honrosa)



**XXXIX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DE SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL (FESBE)**  
**LX CONGRESSO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISILOGIA (SBFIS)**  
**XVI CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOCÊNCIAS NUCLEARES (SBBN)**  
**XXIII REUNIÃO ANUAL DA BRAZILIAN ASSOCIATION FOR RESEARCH IN VISION AND OPHTHALMOLOGY (BRAVO)**

8 A 11 DE JULHO DE 2025  
UNICAMP - CAMPINAS/SP

### CERTIFICADO

O trabalho intitulado **"INDIVIDUALS WITH LONG-COVID FROM MILD AND MODERATE CASES PRESENTS NEGATIVE IMPACT ON MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF VASTUS LATERALLIS MUSCLE"** de autoria de **Rosangela Aline Antão, Emily Sigoli, Giovana Bernardes, Alessandra Jungers Okuyama, Dilsson E. Rassier e Anabelle Silva Cornachione** foi agraciado com a menção honrosa na XXXIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE), LX Congresso Anual da SBFis, XVI Congresso da SBBN e XXIII Reunião Anual da BRAVO, realizados de 08 a 11 de julho de 2025, na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), na cidade de Campinas/SP.

  
Prof. Dr. Eduardo Colombari  
Presidente da FeSBE

  
Prof. Dr. Ilma Brum  
Presidente da SBFis

**REALIZAÇÃO**  
FeSBE

**COMUNICAÇÃO**  
MR PRODUÇÕES

**ORGANIZAÇÃO**  
NUI

**ORGANIZAÇÃO LOCAL**  
UNICAMP

**FOMENTO**  
CAPES  
CNPq  
JAPESP

**PATROCÍNIO DURO**  
ADJUSTMENTS  
ALESCO  
BONTHER

**PATROCÍNIO PRATA**  
ANIMAL  
LAB

## ANEXO D – Email de Comprovação de Submissão do Artigo Científico

De: Editorial Office <[em@editorialmanager.com](mailto:em@editorialmanager.com)>

Date: ter., 26 de ago. de 2025 às 14:18

Subject: JCSM: A manuscript number has been assigned to Long COVID causes passive force reduction and morphological changes in skeletal muscle.

To: Anabelle Silva Cornachione <[cornachione@ufscar.br](mailto:cornachione@ufscar.br)>

Dear Mrs Cornachione,

Your submission entitled "Long COVID causes passive force reduction and morphological changes in skeletal muscle." has been assigned the following manuscript number: JCSM-D-25-01419.

You will be able to check on the progress of your paper by logging on to Editorial Manager as an author.

The URL is <https://www.editorialmanager.com/jcsm/>.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office  
Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle