



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS**  
**FISIOLÓGICAS**

**EMILLY SIGOLI**

**EFEITOS DA INFECÇÃO PELO SARS-COV-2 SOBRE OS ASPECTOS**  
**MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS DO MÚSCULO**  
**VASTO LATERAL DE HUMANOS**

São Carlos - SP  
2025

**EMILLY SIGOLI**

**EFEITOS DA INFECÇÃO PELO SARS-COV-2 SOBRE OS ASPECTOS  
MORFOLÓGICOS, BIOQUÍMICOS E FUNCIONAIS DO MÚSCULO  
VASTO LATERAL DE HUMANOS**

Projeto de Pesquisa apresentado à Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, como requisito da defesa de Doutorado, no Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF.

Área de Concentração: Fisiologia.

**Orientadora:**

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

São Carlos - SP  
2025

## FICHA CATALOGRÁFICA

---

Sigoli, Emilly

Efeitos da infecção pelo SARS-CoV-2 sobre os aspectos morfológicos, bioquímicos e funcionais no músculo vasto lateral de humanos / Emilly Sigoli -- 2025.

101f.

Tese de Doutorado - Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos, São Carlos

Orientador (a): Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione

Banca Examinadora: Profa. Dra. Anabelle Silva

Cornachione, Profa. Dra. Mariana Arias Avila, Profa. Dra.

Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis, Prof. Dr.

Guilherme Borges Pereira, Prof. Dr. Fernando Fonseca

de Almeida e Val

Bibliografia

1. Fisiologia muscular . I. Sigoli, Emilly. II. Título.



## 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 Tese de Doutorado da candidata Emily Sigoli, realizada em 05/09/2025.

#### Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione (UFSCar)

Prof. Dr. Guilherme Borges Pereira (UFSCar)

Profa. Dra. Mariana Árias Avila Vera (UFSCar)

Prof. Dr. Fernando Fonseca de Almeida e Val (FMT-HVD)

Profa. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (UFMG)

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

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 (CAPES, 001 - 88887.761004/2022-00) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processos nº 2023/18418-3 e 2020/14172-1).

## DEDICATÓRIA

---

Com gratidão, dedico esta pesquisa que marca um final de um percurso cheio de experiências inesquecíveis, aos meus pais **Ademar** e **Claudina** e ao meu esposo **Marcos**, por todo apoio, amor e carinho, não foi fácil chegar até aqui, mas o amparo e o incentivo de vocês foram essenciais para que eu me tornasse doutora.

Obrigada,  
Amo vocês!

## AGRADECIMENTOS

---

Primeiramente agradeço a **Deus**, pela minha vida, pelas oportunidades, por ter me dado saúde e força para superar todas as dificuldades, nunca me abandonou nos momentos de necessidades e angústias.

Agradeço hoje e sempre, aos meus pais **Ademar e Claudina**, os dois maiores incentivadores das realizações dos meus sonhos, muito obrigada por todo apoio, incentivo e amor incondicional, nada seria possível sem vocês.

Ao meu esposo e amigo **Marcos**, por todo amor e companheirismo, sempre me apoiando nas minhas decisões. Foi você que esteve ao meu lado em todos os momentos, sejam eles bons ou ruins e sempre acreditou na minha capacidade de alcançar meus objetivos.

Agradeço especialmente à minha orientadora **Profa. Dra. Anabelle Silva Cornachione** pela orientação, apoio e confiança, por toda motivação e incentivo ao longo de todo o projeto, pela sua postura impecável, sempre presente cheia de alegria e otimismo, você é um exemplo, que eu quero seguir. Serei eternamente grata.

Agradeço a **CAPES** (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Código de Financiamento 001; CAPES, 001 - 88887.761004/2022-00) e a **FAPESP** (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo; Processos nº 2023/18418-3 e 2020/14172-1) pelo auxílio financeiro, que teve grande importância no desenvolvimento deste projeto.

Agradeço,

Aos meus irmãos, **Roberta, Juliana e Danilo**, por todo apoio e incentivo.

A técnica do laboratório, **Tatiana**, que também se tornou companheira de laboratório e amiga, obrigada por toda ajuda e ensinamentos, você foi essencial para a realização deste trabalho.

Aos amigos do **Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular**, por todo companheirismo e auxílio.

Aos amigos e professores do **Departamento de Ciências Fisiológicas**, por todos os momentos de ensinamentos.

Ao Professor **Dr. Gerson** e ao aluno **Luis** do laboratório de Farmacologia Cardiovascular, pela troca de conhecimento e por todo auxílio.

A professora **Dra. Heloisa** do laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular e a suas alunas, por nos permitir utilizar o equipamento ImageXpress, SpectraMax e o microscópio Zeiss,

A professora **Dra. Mariana** do Departamento de Fisioterapia, por nos permitir utilizar o equipamento Biodex, agradeço também pela troca de conhecimento e auxílio.

Ao Professor **Dr. Cleiton** do Departamento de educação física (Musculab) e aos seus alunos, pela troca de conhecimento e por todo auxílio, especialmente ao aluno **Deivid** pela auxílio nas análises de eletromiografia. Agradeço também pela doação de amostras musculares, o que contribuiu para a realização deste estudo.

Aos integrantes da banca de qualificação e defesa, pela participação e pelas dicas de melhorias neste trabalho.

Aos Participantes que voluntariaram-se, este estudo não seria possível sem cada um de vocês.

E a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho, sintam se agradecidos!

“Concedei-me, Senhor a serenidade necessária, para aceitar as coisas que não posso modificar. Coragem para modificar aquelas que posso e Sabedoria para conhecer a diferença entre elas. Vivendo um dia de cada vez, desfrutando um momento de cada vez, aceitando que as dificuldades constituem o caminho à paz...”

*Reinhold Niebuhr*

## RESUMO

---

O coronavírus SARS-CoV-2, agente infeccioso causador da doença conhecida como COVID-19, que tem afetado negativamente a vida de milhões de pessoas desde o ano passado. A COVID-19 é uma infecção multiorgânica que tem efeitos relevantes sobre o sistema musculoesquelético de indivíduos infectados, causando fadiga excessiva, artralgia, mialgia, danos musculares e fraqueza muscular. Estes sintomas podem persistir durante semanas ou até meses após o término da infecção, dando origem à chamada COVID-19 longa. No entanto, pouco se sabe sobre os efeitos do SARS-CoV-2 em músculos esqueléticos, principalmente em indivíduos que não necessitaram de suporte ventilatório e/ou hospitalização. **Objetivos:** Avaliar o impacto do coronavírus SARS-CoV-2 sobre o sistema musculoesquelético humano, com o intuito de contribuir para um melhor entendimento dos efeitos da infecção após sua fase aguda. **Métodos:** Este estudo contou com participantes divididos em grupo controle e grupo COVID-Longa e foram submetidos à biópsia muscular, coleta sanguínea e teste em dinamômetro isocinético para análises morfológicas, bioquímicas e funcionais. **Resultados:** O grupo COVID-Longa apresentou alterações morfológicas no músculo vasto lateral, incluindo diminuição dos capilares, óxido nítrico e miogenina, acompanhadas de aumento de IL-1 $\beta$ , Pax7 e ERO. No aspecto funcional, verificou-se aumento do pico de torque nas sessões de isometria, além de redução da frequência média do sinal eletromiográfico. **Conclusão:** A infecção pelo SARS-CoV-2 está relacionada a alterações musculares que podem impactar negativamente na morfologia e função do músculo vasto lateral de humanos, mesmo após o período agudo da doença.

**Palavras-chave:** COVID longa; Músculo Esquelético; Biópsia muscular; Sintomas Musculoesqueléticos; Vasto lateral.

## ABSTRACT

---

The coronavirus SARS-CoV-2, the infectious agent that causes the disease known as COVID-19, has negatively affected the lives of millions of people since last year. COVID-19 is a multi-organ infection that has significant effects on the musculoskeletal system of infected individuals, causing excessive fatigue, arthralgia, myalgia, muscle damage, and muscle weakness. These symptoms can persist for weeks or even months after the end of the infection, giving rise to what is known as long COVID-19. However, little is known about the effects of SARS-CoV-2 on skeletal muscles, particularly in individuals who did not require ventilatory support and/or hospitalization. **Objectives:** To assess the impact of the coronavirus SARS-CoV-2 on the human musculoskeletal system, with the aim of contributing to a better understanding of the effects of the infection after its acute phase. **Methods:** This study included participants divided into a control group and a long-COVID group. They underwent muscle biopsy, blood collection, and isokinetic dynamometer testing for morphological, functional, and biochemical analyses. **Results:** The long-COVID group showed morphological changes in the vastus lateralis muscle, including decreased capillaries, nitric oxide, and myogenin, accompanied by increased IL-1 $\beta$ , Pax7, and ROS. Functionally, an increase in peak torque was observed during isometric sessions, as well as a reduction in the mean frequency of the electromyographic signal. **Conclusion:** SARS-CoV-2 infection is associated with muscle changes that can negatively impact the morphology and function of the vastus lateralis muscle in humans, even after the acute period of the disease.

**Keywords:** long-COVID; Skeletal Muscle; Muscle Biopsy; Musculoskeletal Symptoms; Vastus lateralis.

## LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1-</b> Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-COV-2.....	25
<b>Figura 2-</b> Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 nas células .....	26
<b>Figura 3-</b> Sintomas musculares comuns da COVID-Longa.....	30
<b>Figura 4-</b> Panfleto de recrutamento de participantes.....	33
<b>Figura 5-</b> Testes rápidos para COVID-19 (IgM /IgG) .....	34
<b>Figura 6-</b> Tubo com amostra de sangue após coleta .....	35
<b>Figura 7-</b> Agulha Bergström em papel grau cirúrgico .....	36
<b>Figura 8-</b> Fragmento do músculo vasto lateral coletado por biópsia muscular .....	36
<b>Figura 9-</b> Curativo estéril transparente.....	37
<b>Figura 10-</b> Folheto de recomendações após a biópsia entregue para os participantes .....	37
<b>Figura 11-</b> Músculo fixo e pronto para realização dos cortes no equipamento Criostato Leica .....	38
<b>Figura 12-</b> Posicionamento do participante na cadeira do dinamômetro e posição dos eletrodos da EMG.....	44
<b>Figura 13-</b> Cortes histológicos do músculo vasto lateral de humanos corados em Hematoxilina e Eosina (HE).....	47
<b>Figura 14-</b> Quantificação de núcleo centralizado no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo controle e COVID-Longa.....	48
<b>Figura 15-</b> Quantificação de capilares pelo marcador LC24 (tropomiosina 4) no músculo vasto lateral de humanos .....	49
<b>Figura 16-</b> Fotomicrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcação de capilares através do anticorpo LC24/Tropomiosina 4 .....	49
<b>Figura 17-</b> Quantificação de Células Satélites no músculo vasto lateral de humanos.....	50
<b>Figura 18-</b> Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcação de células satélites através dos anticorpos Pax7 e Miogenina.....	51

<b>Figura 19-</b> Conteúdo de $\alpha$ -actinina presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de Western Blotting .....	52
<b>Figura 20-</b> Conteúdo de IL-1beta presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de Western Blotting .....	53
<b>Figura 21-</b> Conteúdo de IL-6 presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de Western Blotting .....	54
<b>Figura 22-</b> Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela análise de dihidroetídio (DHE) no músculo vasto lateral de humanos.....	55
<b>Figura 23-</b> Fotomicrografias de lâminas processadas e analisadas com dihidroetídio para marcação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no músculo vasto lateral de humanos...	56
<b>Figura 24-</b> Quantificação de óxido nítrico (ON) pela análise de griess no músculo vasto lateral de humanos.....	57
<b>Figura 25-</b> Quantificação de CK e LDH no soro de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle.....	58
<b>Figura 26-</b> Pico de torque e média do pico de torque durante a CIVM.....	59
<b>Figura 27-</b> Pico de torque durante as 3 sessões de CIVM nu grupo Controle e COVID-Longa .....	59
<b>Figura 28-</b> Eletromiografia do músculo reto femoral de humanos durante contração isométrica.....	61
<b>Figura 29-</b> Eletromiografia do músculo vasto lateral de humanos durante contração isométrica.....	62
<b>Figura 30-</b> Eletromiografia do músculo reto femoral e vasto lateral do grupo COVID-Longa durante as 3 sessões de contração isométrica .....	63
<b>Figura 31-</b> Eletromiografia do músculo reto femoral e vasto lateral do grupo Controle durante as 3 sessões de contração isométrica .....	63
<b>Figura 32-</b> Razão entre eletromiografia e o pico de torque dos músculos reto femoral e vasto lateral do grupo COVID-Longa.....	64

## LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1-</b> Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imunofluorescência	39
<b>Tabela 2-</b> Anticorpos primários, secundário e controle de carregamento utilizados na técnica de Western Blotting.....	41
<b>Tabela 3-</b> Características dos participantes do grupo Controle e grupo COVID-Longa.....	46
<b>Tabela 4-</b> Alterações celulares das fibras do músculo vasto lateral de indivíduos do grupo controle e COVID-Longa, identificadas pela técnica de coloração Hematoxilina e Eosina. ..	47

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

---

**ATP:** Adenosina trifosfato

**BSA:** Albumina sérica bovina

**CIVM:** Contração isométrica voluntária máxima

**COVID-19:** Doença coronavírus 2019

**CS:** Célula Satélite

**CK:** Creatina quinase

**DAPI:** *Diamidino-2-phenylindole*

**DHE:** Dihidroetídio

**ECA2:** Enzima conversora de angiotensina 2

**EMG:** Eletromiografia

**ERO:** Espécies reativas *de* oxigênio

**HE:** Hematoxilina e Eosina

**IgM:** Imunoglobulina M

**IgG:** Imunoglobulina G

**IF:** Imunofluorescência

**IL:** Interleucina

**IL-1 $\beta$ :** Interleucina 1 beta

**IL-6:** Interleucina 6

**LDH:** Lactato desidrogenase

**LFBM:** Laboratório de fisiologia e biofísica muscular

**MERS:** Síndrome respiratória do oriente médio

**ON:** Oxido nítrico

**NLRP3:** NOD-like receptor Family, pyrin domain containing 3

**OMS:** Organização mundial de saúde

**PT:** Pico de torque

**PBS:** *Phosphate-buffered saline* (Tampão fosfato salino)

**RF:** Reto femoral

**RMS:** Root mean square

**SARS:** Síndrome respiratória aguda grave

**SARS-CoV-2:** Coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2

**TBS-T:** Solução salina tamponada com Tris e Tween

**TCLE:** Termo de consentimento livre e esclarecido

**TMPRSS2:** Enzima protease serina transmembranar 2

**UTI:** Unidade de terapia intensiva

## LISTA DE SÍMBOLOS

---

**m/min:** Metros por minuto

**cm:** Centímetro

**mg/kg:** Miligramas por kilograma

**°C:** Graus Celsius

**mm:** Milímetro

**m:** Metro

**g:** Grama

**s:** Segundo

**kg:** kilograma

**min:** Minuto

**µm:** Micrômetro

**µl:** Microlitro

**µg:** Micrograma

**rpm:** Rotações por minuto

**mV:** Milivolts

**Nm:** Nanômetro

**U/L:** Unidade por litro

**Hz:** Hertz

**%:** Porcentagem

**<:** Menor

**>:** Maior

## SUMÁRIO

---

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	20
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	23
3.1 Origem e virologia da COVID-19.....	23
3.2 Mecanismo de infecção do SARS-CoV-2 .....	25
3.3 Transmissão e fatores de risco associados a COVID-19.....	26
3.4 Sintomas da COVID-19 .....	26
3.4.1 A sintomatologia musculoesquelética e a COVID-19 .....	27
3.5 Suscetibilidade das células musculares esqueléticas à infecção por SARS-CoV-2 ....	28
3.6 COVID-Longa e o músculo esquelético .....	29
3.7 Escassez de estudos – casos leves e moderados.....	30
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	31
4.1 Delineamento experimental: recrutamento.....	31
4.2 Coleta de sangue.....	34
4.3 Biópsia muscular.....	35
4.4 Processamento das amostras .....	37
4.5 Análise histológica .....	38
4.6 Análise de imunofluorescência .....	39
4.7 Análise de dihidroetídio (DHE) .....	40
4.8 Análise de Western Blotting .....	40
4.9 Quantificação dos biomarcadores CK e LDH (lesão muscular).....	41
4.10 Quantificação de óxido nítrico - análise de griess.....	41
4.11 Dinamômetro isocinético - contração isométrica voluntária máxima (CIVM).....	42
4.12 Eletromiografia (EMG) .....	43
4.13 Análises estatísticas.....	44
<b>5. RESULTADOS</b> .....	45
5.1 Dados demográficos .....	45
5.2 Análise histológica .....	46
5.3 Análise de imunofluorescência .....	48
5.4 Análise de <i>Western Blotting</i> .....	52
5.5 Análise de dihidroetídio (DHE) para espécies reativas de oxigênio (ERO).....	55
5.6 Análise de griess para óxido nítrico (ON) .....	56
5.7 Quantificação dos biomarcadores CK e LDH (Lesão Muscular).....	57
5.8 Contração isométrica voluntária máxima (CIVM) e eletromiografia (EMG).....	58

<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	64
6.1 Alterações histológicas do músculo vasto lateral de humano com COVID-Longa .....	65
6.2 Alteração na $\alpha$ -actinina sarcomérica do músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa.....	67
6.3 Disfunção endotelial e estresse oxidativo no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa.....	68
6.4 Inflamação de baixo grau no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa .	70
6.5 Regeneração muscular prejudicada no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa.....	72
6.6 Ausência de alteração nos biomarcadores CK e LDH em humanos com COVID-Longa .....	73
6.7 Alteração no pico de torque e na frequência média do sinal eletromiográfico em humanos com COVID-Longa.....	74
6.8 Limitações do estudo .....	76
6.9 Implicações clínicas.....	76
<b>7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO</b> .....	76
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	78
<b>APÊNDICE</b> .....	94
<b>ANEXO</b> .....	97

## 1. INTRODUÇÃO

A COVID-19 (Coronavirus Disease 2019), doença causada pelo coronavírus SARS-CoV-2 (*Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2*), se espalhou rapidamente pelo mundo e tem mudado drasticamente o estilo de vida das pessoas desde o começo da pandemia. A COVID-19 é transmitida pela inalação de gotículas liberadas durante o ato de tossir/espirrar ou até mesmo falar, por contato pessoal próximo (toque e/ou aperto de mãos) e/ou por contato com objetos ou superfícies contaminadas seguido de contato com o nariz, os olhos ou a boca (COELHO et al., 2020; ZAIM et al., 2020, EL JADDAOUI et al 2025).

Os sintomas iniciais e mais comuns são febre, tosse seca e dor de cabeça (ABDULLAHI; CANDAN; ABBA, 2020; HENRINA et al., 2020; MANAM et al., 2020; ZAIM et al., 2020). Estudos indicaram que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode ser mais grave em pacientes com idade avançada (> 65 anos), com doenças crônicas (respiratórias, cardíacas e renais), câncer, hipertensão, diabetes e obesidade (BAJ et al., 2020; BURN et al., 2021; MAISON et al., 2025).

Em destaque, a COVID-19 afeta não apenas o trato respiratório, mas também uma variedade de órgãos (doença multiorgânica), incluindo o sistema musculoesquelético associado com o sistema nervoso periférico (SNP), causando fadiga, artralgia, mialgia, fraqueza muscular, danos aos músculos esqueléticos, anosmia e ageusia (AL-RAMADAN et al., 2021; ANDALIB et al., 2021; DISSER et al., 2020; SCHETT et al., 2020; TUZUN et al., 2020; VASILADIS et al., 2021). Esses sintomas podem persistir durante semanas e até mesmo meses após o término da infecção viral, debilitando o condicionamento físico e afetando a qualidade de vida de muitos indivíduos (GODLEE, 2020; GREENHALGH et al., 2020; MORLEY, 2020; NATH, 2020; PEREGO et al., 2020; RUBIN, 2020).

Alguns estudos associaram a “tempestade de citocinas”, uma resposta imune pró-inflamatória desregulada da COVID-19, com: (a) a fraqueza muscular observada em pacientes soropositivos para a doença (ABDULLAHI; CANDAN; ABBA, 2020; AHMAD; RATHORE, 2020) e (b) as respostas neuroinflamatórias e autoimunes observadas em alguns casos (ABU-RUMEILEH et al., 2021; ANDALIB et al., 2021; KORALNIK; TYLER, 2020). Esses pacientes apresentaram altos níveis de interleucinas (ILs) pró-inflamatórias, como a interleucina-6 (IL-6), a interleucina 1 beta

(IL-1 $\beta$ ), a interleucina-8 (IL-8 ou CXCL8), o interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), a proteína 10 induzida por interferon-gama (IP-10 ou CXCL10), e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) em amostras de plasma e soro (CIPOLLARO et al., 2020; DISSER et al., 2020; LAING et al., 2020). Essas ILs podem induzir a proteólise de fibras musculares e promover a diminuição da síntese proteica, interferindo no processo de miogênese (BROUSSARD et al., 2004; DISSER et al., 2020; MORLEY; KALANTAR-ZADEH; ANKER, 2020).

Como é de conhecimento, a creatina quinase (CK) é liberada no sangue quando as células musculares são danificadas e a integridade da membrana alterada. A causa da mialgia durante a COVID-19 pode estar relacionada a danos musculares causados pelo aumento do processo inflamatório e, portanto, uma CK mais alta poderia ser utilizada como um marcador prognóstico para indicar um quadro clínico mais grave da doença (BATUR et al., 2021). Outros possíveis biomarcadores de danos musculares são a lactato desidrogenase (LDH), a aldolase, a mioglobulina, a anidrase carbônica, e a aspartato aminotransferase (AST). Vários estudos que investigaram as características laboratoriais em pacientes com COVID-19, observaram uma associação entre CK e LDH (FENG et al., 2020; UÇAROĞLU CAN; KAYA; KOTAN, 2020; XIE et al., 2021).

Adicionalmente, pesquisa realizada por Leung et al. (2005) mostrou que os músculos esqueléticos *post-mortem* de pacientes positivos para SARS-CoV, o vírus que causou a epidemia SARS (Síndrome Respiratória Aguda Grave) em 2003, apresentaram necrose de miofibras com fragmentação do conteúdo sarcolemal e desorganização estrutural de sarcômeros (perda dos discos Z), além da presença de fibras atroficas (LEUNG et al., 2005). Além disso, estudos mostraram que o aumento de TNF- $\alpha$  em fibras musculares reduz o conteúdo de miosina e de actina sarcoméricas (proteínas contráteis), indicativo de redução da massa e da força muscular (OTIS et al., 2014; PAJAK et al., 2008).

Também é possível encontrar estudos sobre alterações capilares e desregulação imunológica no músculo esquelético de pacientes pós-COVID, que podem ser responsáveis por alguns sintomas como intolerância ao exercício físico e fadiga, o dano endotelial e a patologia capilar foram amplamente descritos em sequelas agudas e pós-agudas da infecção por SARS-CoV-2 em estudos humanos e animais (ASCHMAN et al., 2023). Portanto, a infecção pelo SARS-CoV-2 é uma

doença multifatorial na qual vários fatores nocivos interagem entre si de forma que podem levar aos sintomas da síndrome pós-COVID-19.

Considerando que os vírus SARS-CoV e SARS-CoV-2, isolados de humanos, compartilham 79,5% de similaridade entre suas sequências de RNA (ROSSI et al., 2020) e que o mecanismo responsável pela lesão muscular quanto aos sintomas musculoesqueléticos associados à COVID-19 ainda são assuntos pouco compreendidos e investigados, espera-se que este estudo contribua para um melhor entendimento dos efeitos da COVID-19 no sistema musculoesquelético, proporcionando uma melhoria no diagnóstico, no manejo e no tratamento de indivíduos acometidos por essa doença. Também espera-se obter novas informações sobre a fraqueza muscular persistente que tem sido observada em muitos pacientes. Pelo que se sabe, até o presente momento, quase não há dados biofísicos e/ou morfológicos descritos na literatura científica sobre o efeito do SARS-CoV-2 em músculos esqueléticos, principalmente de indivíduos que apresentaram a doença e não foram hospitalizados em unidades de tratamento intensivo, não necessitando de suporte ventilatório.

## **2. OBJETIVOS**

### Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da COVID-Longa sobre o músculo vasto lateral de indivíduos que desenvolveram as formas leve a moderada de COVID-19 e obter informações relevantes que relacionem os sintomas musculoesqueléticos observados nesses indivíduos com degenerações/lesões musculares.

### Objetivos Específicos

- Analisar a morfologia do músculo vasto lateral dos indivíduos com COVID-Longa;
- Quantificar proteínas sarcoméricas e identificar o possível comprometimento das estruturas musculoesqueléticas pela COVID-19;
- Quantificar as citocinas IL-1 $\beta$  e IL-6;
- Quantificar capilares, espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico;
- Quantificar células satélites na fase de ativação e diferenciação através do marcador Pax7 e miogenina;
- Quantificar os marcadores de lesões: Creatina quinase e lactato Desidrogenase;

- Analisar dados sobre a contração isométrica voluntária máxima, para verificação do pico de torque e eletromiografia.

### **3. REVISÃO DA LITERATURA**

#### **3.1 Origem e virologia da COVID-19**

No final de dezembro de 2019 um grande número de pessoas foram afetadas por uma pneumonia de etiologia desconhecida, esses pacientes estavam epidemiologicamente ligados a um mercado atacadista de frutos do mar e animais úmidos em Wuhan, província de Hubei, China (ROTHAN; BYRAREDDY, 2020; WHO, 2020). Posteriormente um coronavírus chamado de SARS-CoV-2 foi identificado como o patógeno causador dessas pneumonias, ele recebeu esse nome devido a similaridade com o SARS-CoV (Coronavírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave) que causou uma epidemia em 2002-2003 na China e está geneticamente relacionado com o SARS-CoV-2 (MORENS et al., 2020; ROSSI et al., 2020).

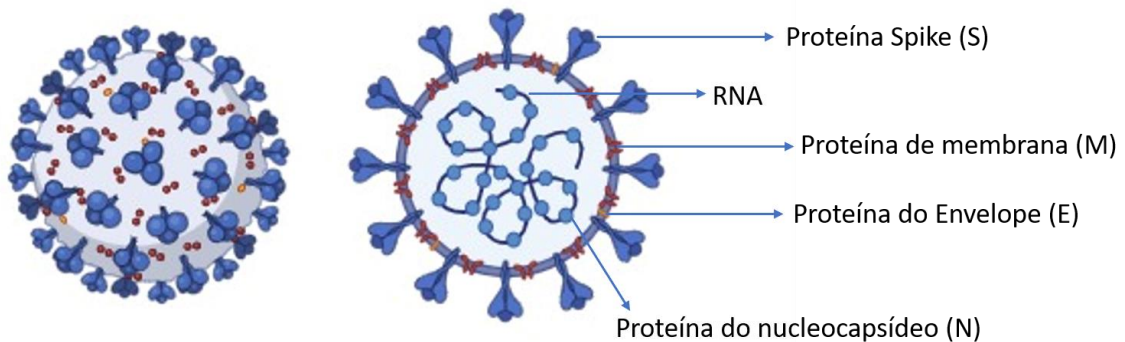
Tanto o SARS-CoV como o SARS-CoV-2 são originários da China e compartilham um alto grau de similaridade, incluindo exposição a animais selvagens, enquanto o SARS-CoV-2 e o MERS-CoV (coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio) possuem similaridades no sentido de que os casos podem permanecer assintomáticos enquanto ainda disseminam a doença (ABDELRAHMAN; LI; WANG, 2020; LU et al., 2020). Portanto o surgimento do SARS-CoV-2 marcou a terceira introdução de um coronavírus epidêmico altamente patogênico e em larga escala na população humana no século XXI após o SARS-CoV em 2002-2003 e o MERS-CoV em 2012-2013 (GUO et al., 2020; KOLIFARHOOD et al., 2020).

A doença viral foi denominada COVID-19 (Doença do Coronavírus 2019) em 11 de fevereiro de 2020 e, como o vírus se espalhou rapidamente pelo mundo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou situação de pandemia em 11 de março de 2020 (WHO, 2020). A OMS define uma pandemia quando uma nova doença infecciosa se espalha facilmente e de forma sustentada em diversos continentes ou em todo o mundo, afetando um grande número de pessoas (WHO, 2020).

O SARS-CoV-2 é um coronavírus (CoV) do gênero  $\beta$ , que é um vírus de RNA de fita simples positivo envelopado. Os coronavírus podem ser divididos em 4 gêneros: alfa, beta, gama e delta. Esses vírus podem resultar desde doenças leves (como um resfriado comum) até doenças graves, como SARS e MERS, ambas as

quais causaram surtos nas últimas duas décadas (ABDELRAHMAN; LI; WANG, 2020; ALSHEBRI, 2020). A palavra Corona vem do latim, representa as protuberâncias em forma de espículas em sua superfície. Elas consistem nas seguintes proteínas estruturais:

- Proteína spike (S): Esta proteína reconhece os receptores ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) encontrados em diversos tecidos, ela medeia a ligação, a fusão e a entrada subsequente do vírus na célula hospedeira (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022) (Figura 1);
- As proteases da célula hospedeira (serina 2, catepsinas, tripsina e furina) causam a clivagem da proteína spike, resultando na fusão do vírus dentro da célula hospedeira (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022);
- Proteína do envelope (E): As proteínas do envelope são as menores e estão presentes principalmente no retículo endoplasmático (RE) e no complexo de Golgi, onde são responsáveis pela montagem e liberação do vírus da célula hospedeira. Portanto, são bem expressas durante a replicação viral (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022) (Figura 1);
- Proteína de membrana (M): As glicoproteínas de membrana são proteínas de superfície e as proteínas mais abundantes do vírus. Ela auxilia na formação e dá forma ao envelope viral, e também controla a montagem de vários componentes do vírus (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022) (Figura 1);
- Proteína do nucleocapsídeo (N): Sua principal função é de proteção do RNA, além de auxiliar na montagem do vírus por meio da interação com outras proteínas estruturais. Muitos testes utilizam a proteína N como alvo, pois ela é muito abundante no vírus (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022) (Figura 1);
- Proteína hemaglutinina-esterase (HE): A hemaglutinina-esterase, uma glicoproteína, auxilia na ligação e destruição dos receptores de ácido siálico na superfície da célula hospedeiro (HELENO et al., 2023; KUMAR et al., 2022).



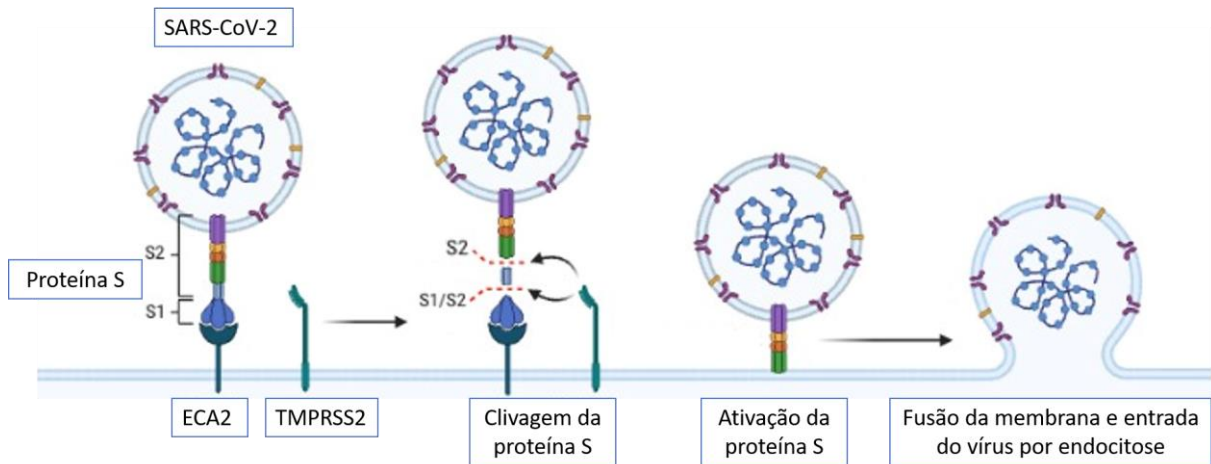
**Figura 1-** Representação esquemática da estrutura do vírus SARS-COV-2

Fonte: Figura adaptada de Heleno et al., 2023. Criada com BioRender.com

### 3.2 Mecanismo de infecção do SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 é altamente infeccioso, sendo transmitido por gotículas e aerossóis, sendo uma infecção altamente contagiosa e transmissível devido à sua afinidade pela ligação aos receptores ECA2 (DISSER et al., 2020; RAVI; SAXENA; PANDA, 2022). A proteína spike consiste em duas subunidades: a subunidade S1, que se liga ao receptor de entrada do hospedeiro (ECA2), e a subunidade S2, que medeia a fusão da membrana. Após a ligação à ECA2, a proteína spike é clivada pela serina protease transmembrana TMPRSS2 no sítio S2. Essa clivagem ativa os trímeros da subunidade S2 para fundir as bicamadas lipídicas virais do hospedeiro, liberando o complexo de ribonucleoproteína viral dentro da célula (JACKSON et al., 2022; LARSEN et al., 2020; RAVI; SAXENA; PANDA, 2022) (Figura 2).

As primeiras células-alvo do SARS-CoV-2 durante a infecção natural em humanos provavelmente serão células da nasofaringe, mucosa olfatória nasal e traqueia seguido pela migração para os pulmões, onde ocorre a multiplicação adicional do vírus. O vírus usa o receptor ECA2 como entrada primária para as células, a ECA2 é encontrada abundantemente no revestimento mucoso do trato respiratório, células endoteliais vasculares, coração, intestino e rim (MENG-YUAN LI et al., 2020; HAN et al., 2024). Após a entrada nas células, o vírus sofre replicação rápida dentro das células-alvo levando a uma grande resposta inflamatória com a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, a qual implica na ativação e migração de neutrófilos, e conseqüentemente, resulta na tempestade de citocinas (FARA et al., 2020; LAMERS et al., 2022).



**Figura 2-** Mecanismo de entrada do SARS-CoV-2 nas células

Fonte: Figura adaptada de Hartenian et al., 2020. Criada com BioRender.com

### 3.3 Transmissão e fatores de risco associados a COVID-19

O SARS-CoV-2 tende a infectar todas as faixas etárias e é transmitido por contato direto ou gotículas respiratórias geradas durante a tosse ou espirro pelo paciente infectado durante a fase sintomática ou pré-sintomática da infecção (GREENHALGH et al., 2020). Também houve evidências de transmissão assintomática da COVID-19 (MEHTA et al., 2021). O período de incubação da COVID-19 varia de 2 a 14 dias, com um período médio de incubação de 3 dias (DOS SANTOS et al., 2022). Embora a COVID-19 possa afetar todas as faixas etárias, a doença grave está associada a bebês, pacientes idosos acima de 65 anos e pacientes com outras comorbidades, como diabetes mellitus, hipertensão, doença arterial coronariana e outras condições crônicas (BURN et al., 2021).

### 3.4 Sintomas da COVID-19

A distribuição dos receptores ECA2 em diferentes tecidos explica os locais de infecção e os sintomas do paciente. Os sintomas mais frequentemente relatados são febre, tosse, mialgia, fadiga, dispneia e, com menos frequência, dor de cabeça, diarreia e coriza (DOS SANTOS et al., 2022; HARTENIAN et al., 2020). Pacientes com COVID-19 apresentam sintomas semelhantes a outras doenças respiratórias comuns, o que pode dificultar no diagnóstico (LARSEN et al., 2020). Esses sintomas podem

progredir rapidamente para a síndrome respiratória aguda grave (SRAG), com sintomas mais graves como dispneia/dificuldade para respirar, pressão torácica persistente ou saturação de O<sub>2</sub> abaixo de 95% em ar ambiente, ou lábios e rosto azulados (SEVERO SANTOS; DAHMER SANTOS, 2020).

Por ser uma doença multiorgânica, é comum a ocorrência de outros sintomas também, como os gastrointestinais, sendo os mais comuns a diarreia, vômitos e náuseas (PERISETTI et al., 2020). Diversas manifestações relacionadas ao sistema nervoso e à COVID-19 também têm sido relatadas na literatura, os sintomas neurológicos mais comuns são cefaleia, tontura e comprometimento da consciência, sendo a cefaleia o sintoma mais prevalente. Esses sintomas podem ser iniciais ou ocorrer de forma isolada (KACEM et al., 2021).

O sistema sensorial também é afetado pelo vírus da COVID-19, as principais queixas relacionadas a esse sistema foram perda do paladar, associada à perda do olfato, em alguns casos prevalecendo mesmo após a fase aguda da doença (TROTT; DRISCOLL; PARDHAN, 2022). Além dos citados, algumas pessoas referem sintomas oculares, como irritação, dor, visão embaçada e sensibilidade à luz, sintomas associados à audição, como perda auditiva e zumbido, e também formigamento e dormência em regiões do corpo (TROTT; DRISCOLL; PARDHAN, 2022).

#### 3.4.1 A sintomatologia musculoesquelética e a COVID-19

A COVID-19 também tem efeitos consideráveis no sistema musculoesquelético, estudos mostraram que os sintomas musculoesqueléticos podem ocorrer durante os primeiros dias de infecção, mesmo antes da sintomatologia respiratória comum (DOS SANTOS 2022). Fadiga, artralgia (dor nas articulações), mialgia (dor muscular) e fraqueza muscular foram relatadas como sintomas iniciais e comuns por indivíduos COVID-19 positivos (ALI; KUNUGI, 2021; CIPOLLARO et al., 2020).

Infelizmente, esses sintomas atenuantes podem diminuir a capacidade dos indivíduos de realizar atividades da vida diária, como deambular, vestir-se, limpar a casa e trabalhar, o que reduz a qualidade de vida, gerando ansiedade e depressão. Outro sintoma muito relatado é a intolerância para realizar atividades e exercícios físicos, bem como o mal-estar pós-exercício (TRYFONOS et al., 2024; JAMIESON et al., 2024).

### 3.5 Suscetibilidade das células musculares esqueléticas à infecção por SARS-CoV-2

O músculo esquelético é um tecido altamente organizado que constitui 40% do nosso peso corporal, ele é composto por fibras musculares que são longas e multinucleadas, além de envolvidas e organizadas pelo tecido conjuntivo. Essas fibras são organizadas em feixes chamados de fascículos, e o músculo como um todo é revestido por uma bainha de tecido conjuntivo chamada epimísio (FRONTERA et al., 2015; SCHNYDER; HANDSCHIN, 2015).

Os músculos esqueléticos também possuem em abundância vasos sanguíneos e nervos, os quais estão diretamente relacionados à função primária do músculo esquelético: a contração. Por isso o músculo esquelético é um componente essencial do sistema locomotor, ele tem um papel mecânico crucial, gerando força e potência por meio da conversão de energia química em mecânica, o que produz movimento, facilitando nossas atividades diárias (MUKUND et al., 2019; TROVATO et al., 2016). Além disso, o músculo esquelético pode armazenar substratos energéticos (carboidratos e aminoácidos) para diferentes tecidos. Ele também contribui para a manutenção dos níveis de glicose sanguínea (FRONTERA et al., 2015; TROVATO et al., 2016). A boa manutenção da saúde do músculo esquelético é crucial para a prevenção de diversas doenças.

Nos últimos anos, o número de estudos relacionados ao envolvimento musculoesquelético aumentou, mas não houve consenso sobre a patogênese, mas existem algumas hipóteses que sugerem diferentes mecanismos de ação do vírus no tecido muscular esquelético:

1. Receptores e enzimas: No músculo esquelético, a TMPRSS2 é predominantemente expressa, e tanto a ECA2 quanto a TMPRSS2 desempenham um papel na ligação do vírus. Por isso, a primeira hipótese considera um mecanismo direto de ligação do SARS-CoV-2 ao receptor ECA2 na superfície da célula muscular esquelética (DISSER et al., 2020; FERRANDI; ALWAY; MOHAMED, 2020) ou talvez o SARS-CoV-2 interaja com as células de forma independente da ECA-2, dessa forma, a presença de TMPRSS2 que se encontra em maior quantidade no músculo esquelético, juntamente com outros receptores da célula hospedeira, seria suficiente para promover a ligação e a infecção do vírus (EVCIK, 2023).

2. Tempestade de citocinas: O prognóstico da doença tem uma relação próxima com a inflamação sistêmica. A liberação desregulada de citocinas e quimiocinas como interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-8 (IL-8 ou CXCL-8), interferon gama (IFN- $\gamma$ ), proteína induzível por interferon gama 10 (IP-10 ou CXCL10) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), induzem proteólise da fibra muscular e promovem diminuição da síntese proteica, interferindo no processo miogênico e interrompendo a homeostase corporal (CHARLTON et al., 2024; EVCIK, 2023).

3. Hipóxia: A Hipóxia e a inflamação interagem entre si, pois a hipóxia também desencadeia a liberação de citocinas pró-inflamatórias, assim, o metabolismo anabólico muscular muda, a glicólise anaeróbica e a produção de lactato desidrogenase aumenta (DI GIROLAMO et al., 2022). Além disso, a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) aumenta durante a hipóxia. Altos níveis de ERRO desempenham um papel importante na disfunção endotelial e muscular (CHARLTON et al., 2024).

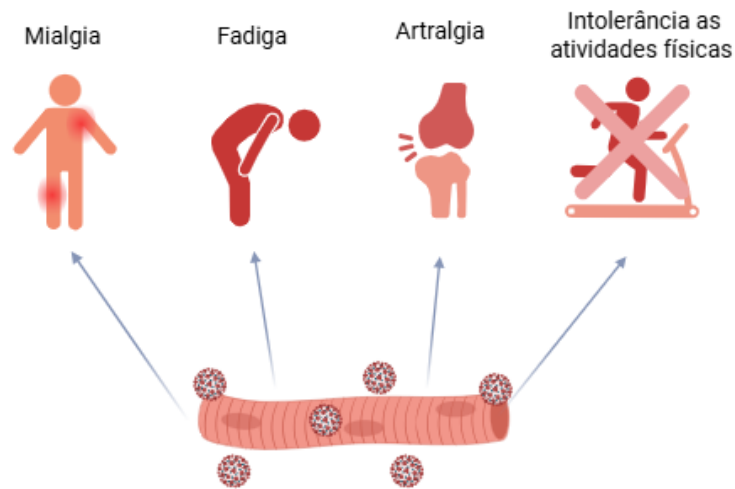
### 3.6 COVID-Longa e o músculo esquelético

Estudos recentes sugerem que os sintomas musculoesqueléticos, prevalecem após a fase aguda da infecção, persistindo por semanas e/ou meses, esses sintomas persistentes da COVID-19, são chamados de COVID-Longa e são uma preocupação de saúde pública (BRÜSSOW E TIMMIS, 2021; MARSHALL, 2021; SALAMANNA et al., 2021). De acordo com as diretrizes do Instituto Nacional de Excelência em Saúde e Cuidados (NICE) do Reino Unido, a COVID-longa é definida como “sinais e sintomas que continuam após a COVID-19 aguda, persistindo por mais de 4 semanas”, isso abrange tanto a COVID-19 sintomática em curso (de 4 a 12 semanas) quanto a síndrome pós-COVID-19 (além de 12 semanas e não são elucidados por um diagnóstico alternativo, exceto COVID-19) (SIVAN E TAYLOR, 2020; SALAMANNA et al., 2021).

Os sintomas mais prevalentes em indivíduos com COVID-Longa são fadiga, cefaleia, dispneia e anosmia (STAVEM et al., 2021; VARGHESE et al., 2021), sendo a fadiga o sintoma musculoesquelético mais frequentemente relatado (AMENTA et al., 2020; RUDROFF et al., 2020), enquanto mialgias e artralguas também são queixas comuns (LIANG et al., 2020). Outra sequela é a intolerância às atividades físicas

associada a um quadro de fadiga crônica e dificuldade de retorno à vida diária normal (MIYAZATO et al., 2020; HUMPHREYS et al., 2021) (Figura 3).

Alguns estudos sugerem que as sequelas musculares estão envolvidas em uma resposta inflamatória prolongada induzida por vírus, citocinas pró-inflamatórias associadas e hiperativação de células imunes. Outro mecanismo hipotético já visto anteriormente é pela ligação do vírus aos receptores presentes nas células do músculo esquelético (KHOJA et al., 2022).



**Figura 3-** Sintomas musculares comuns da COVID-Longa

Fonte: Elaboração própria. Figura criada com BioRender.com

### 3.7 Escassez de estudos – casos leves e moderados

A escassez de estudos científicos direcionados ao sistema musculoesquelético em pessoas que tiveram as formas leves e moderadas da COVID-19 é uma lacuna significativa que merece maior atenção. Pacientes com manifestações leves da doença geralmente não apresentam sintomas como falta de ar, dispneia ou pneumonia viral. Já aqueles com quadro moderado podem apresentar sinais clínicos de pneumonia, com níveis de saturação de oxigênio (SpO<sub>2</sub>) iguais ou superiores a 90% em ar ambiente, ao nível do mar (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2021). Diante dessa prevalência, seria esperado um volume expressivo de publicações focadas nesses grupos. No entanto, a realidade mostra o oposto, especialmente quando se trata dos efeitos da COVID-19 sobre o sistema musculoesquelético nesses pacientes sintomáticos.

Uma revisão bibliográfica realizada por Santos et al. (2022) observou a existência de quatro tipos principais de estudos que abrangem COVID-19 e músculo esquelético: (1) relatos de caso e artigos originais de indivíduos hospitalizados (COVID-19 grave); (2) artigos de revisão e observacionais citando apenas os sintomas musculoesqueléticos; (3) estudos prospectivos de acompanhamento de pacientes com sintomas musculares persistentes (principalmente após alta hospitalar); e (4) estudos neurológicos que incluem sintomas musculoesqueléticos. Esse mesmo estudo encontrou apenas quatro estudos comentando brevemente sobre os sintomas musculoesqueléticos (fadiga e mialgia) em casos leves e não críticos de COVID-19 (KIM et al., 2020; LECHIEN et al., 2020; WANG et al., 2020).

Embora escassas, as pesquisas que abordam casos leves a moderados de COVID-19 têm evidenciado que a infecção viral pode impactar o sistema musculoesquelético, tanto de forma aguda quanto prolongada, mesmo entre aqueles que não precisaram ser hospitalizados (DOS SANTOS et al., 2022). Apesar disso, os processos biológicos e bioquímicos responsáveis pelos sintomas musculares em casos leves ainda são pouco compreendidos, já que a maior parte das investigações se concentra nas repercussões musculares observadas em pacientes com quadros graves ou críticos que exigiram internação e suporte respiratório. Diante disso, torna-se evidente a carência de informações mais detalhadas, especialmente no que se refere aos aspectos biofísicos e morfológicos das lesões musculares associadas à COVID-19 em indivíduos sintomáticos, independentemente da gravidade do quadro.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Delineamento experimental: recrutamento**

Este trabalho 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) (Anexo 1). As amostras e os dados dos participantes foram tornados anônimos no momento da coleta pelo médico e envolvidos no projeto. Todos os regulamentos éticos foram respeitados. Importante citar que todos os participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2) antes de qualquer procedimento do estudo e que todas as diretrizes de boas práticas em pesquisa clínica e boas práticas em laboratório foram seguidas.

O recrutamento dos indivíduos que participaram dessa pesquisa foi realizado mediante divulgação de um link online (formulário) para que os interessados na pesquisa se inscrevessem nela (no apêndice 1 se encontra os itens do formulário). O link foi divulgado no site do Departamento de Ciências Fisiológicas da UFSCar (<http://dcf.ufscar.br/pt-br>) onde ocorreu o estudo, e na rede social do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular (instagram: [lfbm\\_ufscar](https://www.instagram.com/lfbm_ufscar)) (Figura 4).

Nosso estudo englobou participantes (faixa etária = 18 a 50 anos) que tiveram diagnóstico de COVID-19 confirmado (RT-PCR) e que durante o curso da doença, estes indivíduos apresentaram sintomas leves a moderados, incluindo fraqueza muscular, mialgia, fadiga e/ou dor nas juntas, os quais mesmo após o término da infecção viral ainda estavam presentes (grupo COVID-Longa). Além disso, os indivíduos recrutados não praticavam exercícios físicos, sem comorbidades associadas e não foram submetidos a qualquer suporte ventilatório ou internação durante o decorrer da doença, visando excluir os sintomas musculoesqueléticos que não foram causados exclusivamente pela infecção por SARS-CoV-2.

Para o grupo controle este estudo contou com participantes saudáveis (faixa etária = 18 a 50 anos), e que não tiveram COVID-19, os indivíduos deste grupo não praticavam exercícios físicos, e sem comorbidades associadas.

Vale ressaltar que devido à baixa tolerância de alguns participantes ao procedimento de biópsia e a alta taxa de infecção por SARS-CoV-2 na população geral durante o período de recrutamento, houve dificuldades em recrutar indivíduos, principalmente para o grupo controle, uma limitação que resultou em apenas 5 participantes para compor esse grupo. 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, e com a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), (CAAE:56259622.0.0000.5504; número do parecer: 5.427.049). Diante disso, para análises histológicas, de imunofluorescência e Western Blotting, o grupo COVID-Longa contou com 18 indivíduos e o grupo controle contou com 11 indivíduos, enquanto as análises em soro e os testes realizados no dinamômetro isocinético, o grupo COVID-Longa permaneceu com 15 indivíduos e o grupo controle permaneceu com os 5 indivíduos recrutados no projeto.

Pessoas com qualquer doença muscular crônica, problemas de cicatrização e/ou coagulação, alergia a anestésicos e/ou fobia de agulhas, ou que faziam uso de medicamentos que poderiam prolongar eventuais sangramentos, não foram incluídos na pesquisa. Mulheres gestantes também não foram incluídas. Ademais, para eliminar os riscos de transmissão da COVID-19, indivíduos COVID-19-positivos na fase aguda da doença ou em quarentena também não foram incluídos.

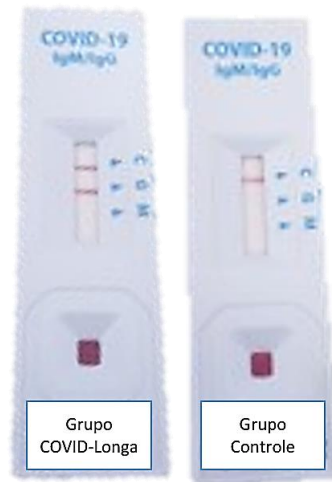
Por isso, 1 a 2 dias antes da entrevista agendada, entramos em contato com o participante para perguntar se ele ou algum familiar apresentava sintomas comuns da COVID-19 ou estava em quarentena, visando evitar a transmissão do vírus. Vale ressaltar que fornecemos um teste sorológico para confirmar que o participante teve COVID-19, mas não estava transmitindo o vírus (IgM-; IgG+), aplicamos o mesmo procedimento de pré-entrevista e testagem sorológica para o grupo controle, apenas os participantes com perfil IgM- e IgG- (negativo para COVID-19) foram recrutados (Figura 5).

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



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

Fonte: Redes sociais do laboratório LFBM

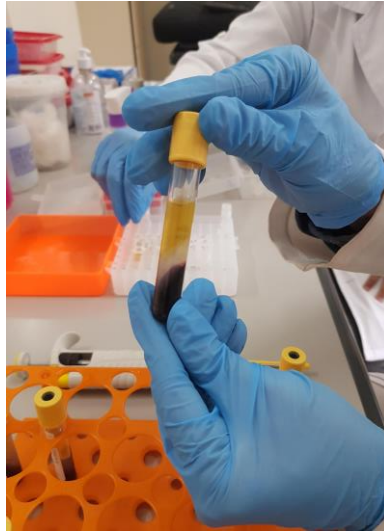


**Figura 5-** Testes rápidos para COVID-19 (IgM /IgG)

Fonte: Elaboração própria

#### 4.2 Coleta de sangue

Após realização dos testes, preenchimento dos termos e esclarecimento de dúvidas, os participantes foram encaminhados para coleta de amostras sanguíneas, que foram coletadas através de punção venosa realizada em um dos membros superiores de cada participante. A coleta foi realizada por meio da técnica de coleta a vácuo com agulha 21G (25mm x 0,8mm), com a retirada de 4 ml de sangue de cada participante em tubos para sorologia com gel separador (Figura 6). Após a coleta, as amostras foram centrifugadas para a separação do soro, e foi armazenado em freezer -80°C até realização das análises. As coletas de sangue foram realizadas pela pesquisadora deste projeto, cuja formação é a enfermagem (Emilly Sigoli, COREN-SP: 694258-ENF).



**Figura 6-** Tubo com amostra de sangue após coleta

Fonte: Elaboração própria

### 4.3 Biópsia muscular

Após coleta do sangue, os participantes foram encaminhados para realização da biópsia muscular. Amostras do músculo vasto lateral (quadríceps femoral) foram obtidas por meio de biópsia muscular através de agulha de biópsia do tipo Bergström (5 mm de diâmetro) com sucção manual (Figura 7), a qual foi realizada pela médica Dra. Alessandra Jungers Okuyama (CRM-SP 106.617) juntamente com a pesquisadora responsável, Dr.<sup>a</sup> Anabelle Silva Cornachione.

A coleta das amostras foi realizada entre março e agosto de 2022, no laboratório LFBM (DCF – UFSCar) em ambiente limpo, confortável e privativo. Toda equipe utilizou equipamento de proteção individual e 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 feita a assepsia da pele da região do músculo vasto lateral dos participantes, e posteriormente, foi aplicada 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 8) e armazenados em freezer  $-80^{\circ}\text{C}$ . Ao final foi realizado curativo de sutura adesiva (steri strip) para aproximação das bordas da pele e fechamento com curativo tegaderm transparente (Figura 9). Em caso de sangramento foi realizado curativo compressivo. Todas as orientações de cuidados com o curativo foram realizadas aos participantes após a biópsia.

No final do procedimento o participante foi colocado em repouso sentado em uma sala e oferecido suco e bolachas, como também folheto de orientações para casa (Figura 10). Foi realizado acompanhamento de todos os participantes após as biópsias, todos apresentaram ótimas cicatrizações sem nenhuma intercorrência relatada. Vale ressaltar que as agulhas passaram por processo rigoroso de limpeza, desinfecção e esterilização antes e após as biópsias.



**Figura 7-** Agulha Bergström em papel grau cirúrgico

Fonte: Elaboração própria



**Figura 8-** Fragmento do músculo vasto lateral coletado por biópsia muscular

Fonte: Elaboração própria.



**Figura 9-** Curativo estéril transparente

Fonte: Elaboração própria



**Figura 10-** Folheto de recomendações após a biópsia entregue para os participantes

Fonte: Elaborado em conjunto pelos alunos do LFBM

#### 4.4 Processamento das amostras

Uma porção do músculo coletado pela biópsia muscular foi untada em talco e congelada em nitrogênio líquido para a realização das análises de histoquímica e imunofluorescência, e a outra porção, também congelada, foi utilizada para as análises de *Western Blotting*.

Para processamento histológico e de imunofluorescência os músculos previamente congelados contaram com o seccionamento em cortes transversos (6  $\mu$ m de espessura, temperatura de -25 °C) através de Criótomo CM 1850 UV (LEICA®),

equipamento pertencente ao Laboratório Musculab do departamento de Educação Física da UFSCar. Os cortes foram colhidos em lâminas de 24x50 mm e armazenados em freezer -20 °C (Figura 11).



**Figura 11-** Músculo fixo e pronto para realização dos cortes no equipamento Criostato Leica

Fonte: Elaboração própria

#### 4.5 Análise histológica

As lâminas contendo os cortes musculares foram coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) para análises dos seguintes aspectos gerais das fibras musculares: centralização nuclear, necrose celular, células basofílicas, infiltrado inflamatório, splitting e alterações no tecido conectivo (o apêndice 2 expõe os tipos de alterações), seguindo metodologia estabelecida (CORNACHIONE, A.; et al., 2008; CORNACHIONE, A et al., 2011).

A hematoxilina é um corante básico de cor azul púrpura, responsável por corar substâncias ácidas do tecido, como por exemplo os núcleos, enquanto que a eosina é um corante ácido de cor rósea/vermelho que tem atração por substâncias básicas como o citoplasma. A aquisição de imagens para esta análise morfológica foi realizada por meio de microscopia de luz (Axiolab, Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com magnificação de 20x e 40x (equipamento pertencente ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar).

A análise foi realizada de forma qualitativa e os resultados foram demonstrados em uma tabela com a porcentagem da quantidade de indivíduos que apresentaram as

alterações musculares. Em complemento, uma análise quantitativa foi realizada para a centralização nuclear, onde foram utilizados 3 campos aleatórios (500x500µm) em fotos 20x de magnitude e realizado a contagem das fibras musculares e dos núcleos centralizados, e então realizado uma relação da quantidade de núcleo centralizado por fibra.

#### 4.6 Análise de imunofluorescência

A técnica de imunofluorescência (IF) utilizada foi a indireta, na qual foi aplicado um anticorpo primário específico não fluorescente, e um anticorpo secundário ligado ao fluoróforo fluorescente que se associa somente ao anticorpo primário, o qual reage com um antígeno específico.

Para a realização do procedimento, a amostra foi retirada do freezer para secar em temperatura ambiente. Após a secagem, o tecido foi incubado com os anticorpos primários (Tabela 1) e levado à estufa 37°C por 45 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas 3x com PBS 1% com um intervalo de 5 min entre as lavagens. Logo após, os tecidos foram incubados com os anticorpos secundários (Tabela 1) e levados à estufa 37°C por 35 minutos, seguido de novas lavagens com PBS 1% em intervalos de 5 min cada. Por fim, foi utilizado o meio de montagem (DAPI – marcador nuclear), e as lâminas foram devidamente guardadas em freezer -20 °C.

Para a visualização da IF foi utilizado o sistema de imagens *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) (equipamento multiusuário pertencente ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar). Para análise das células satélites e capilares foi utilizado 3 campos aleatórios (500x500µm) em fotos 10x de magnitude e realizado a contagem das fibras musculares e das células satélites e capilares e então realizado uma relação da quantidade de capilar por fibra e de células satélites por fibra.

<b>Primários</b>	<b>Isótipos</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração</b>
Anti-Laminina	IgG	Anti-Rabbit	Abcam	1:200
F5D-Miogenina	IgG1	Anti-Mouse	DSHB	1:10
PAX7	IgG1	Anti-Mouse	Santa Cruz	1:10
LC24-Tropomiosina 4	IgG1	Anti-Mouse	DSHB	1:100
<b>Secundários</b>	<b>Isótipos</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração</b>
Alexa Fluor 647	IgG	Anti-Rabbit	Invitrogen	1:200
Alexa Fluor 488	IgG1	Anti-Mouse	Jackson	1:200

**Tabela 1-** Anticorpos primários e secundários utilizados na técnica de imunofluorescência

#### 4.7 Análise de dihidroetídio (DHE)

A técnica com DHE (Dihidroetídio) foi usada para detectar ERO, principalmente o ânion superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), nos músculos estudados. O DHE reage com o superóxido, formando etídio, que emite fluorescência e pode ser detectado por microscopia de fluorescência ou citometria de fluxo.

Para isso foram usados tecidos congelados posteriormente cortados em criostato (6  $\mu\text{m}$  de espessura), e montados em lâminas histológicas limpas. Quanto à preparação do DHE, foi dissolvido em DMSO (solução-mãe de 10 mM), diluído a solução mãe em tampão PBS ou meio de cultura para obter uma concentração final de 5–10  $\mu\text{M}$ . Posteriormente foi adicionado à solução de DHE sobre o tecido (100–200  $\mu\text{L}$  por lâmina) e incubado em câmara escura a 37°C por 20–30 minutos (DIKALOV et al., 2007; LEJAY et al., 2015). Depois foi feita a lavagem de forma delicada com PBS para remover o excesso de DHE, e subsequente leitura em microscópio de fluorescência *ImageXpress XLS System* (Molecular Devices) (equipamento multiusuário pertencente ao Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFSCar). A Análise foi realizada através da intensidade média de fluorescência em 3 campos aleatórios (500x500 $\mu\text{m}$ ) em fotos 10x de magnitude através do programa Image J (versão 1.51n).

#### 4.8 Análise de Western Blotting

As amostras obtidas da biópsia muscular dos participantes foram homogeneizadas em tampão de extração overnight à 4 °C, com auxílio de agitadores magnéticos em microtubos. No dia seguinte, as amostras foram centrifugadas (14000 rpm, 4°C, 20 minutos) e os sobrenadantes foram coletados para quantificação proteica através de ensaio colorimétrico de BCA seguindo instruções do fabricante (Thermo Scientific). Posteriormente, as proteínas dos sobrenadantes foram misturadas ao tampão de Laemmli e fervidas a 100°C por 5 minutos.

Alíquotas contendo 15 µg de proteína de cada grupo foram separadas em géis de 12% (SDS-PAGE) e transferidas para membranas de nitrocelulose (0,45 µm; Bio-Rad), as quais foram bloqueadas com BSA 3% em Tween-TBS. O ensaio de Western Blotting foi realizado utilizando-se anticorpos primários descritos na tabela 2, permanecendo overnight, 4°C. O GAPDH e o Ponceau foram utilizados como controle de carregamento. No dia seguinte, as membranas foram lavadas com TBS-T (3x de 5 minutos cada) e incubadas com anticorpo secundário específico conjugado com HRP (horseradish peroxidase) durante 1 hora, à 4°C, sob agitação basculante. 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 ImageJ (versão 1.51n).

<b>Primários</b>	<b>Isótipo</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>kDa</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração</b>
Alfa-Actinina sarcomérica	IgG	Anti-Rabbit	103 kDa	Abcam	1:6000
IL-1β	IgG	Anti-Rabbit	28kDa	Cell Signaling	1:1000
IL-6	IgG	Anti-Rabbit	26kDa	Abcam	1:1000
<b>Controle de carregamento</b>	<b>Isótipo</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>kDa</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração</b>
Anti-GAPDH	IgG	Anti-Rabbit	36kDa	Abcam	1:3000
<b>Secundário</b>	<b>Isótipo</b>	<b>Hospedeiro</b>	<b>kDa</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Concentração</b>
HRP	IgG	Anti-Rabbit	-	Abcam	1:10000

**Tabela 2-** Anticorpos primários, secundário e controle de carregamento utilizados na técnica de Western Blotting

#### 4.9 Quantificação dos biomarcadores CK e LDH (lesão muscular)

As amostras sanguíneas foram centrifugadas para a separação do soro e posteriormente, 25 µl de soro de cada tubo foram pipetados para microplacas com reagentes CK NAC e 10 µl de soro para microplacas com reagentes LDH-P UV para análise no equipamento Spectramax I3 (Molecular Devices) conforme protocolo fornecido pelo LaborLab Ltda.

#### 4.10 Quantificação de óxido nítrico - análise de griess

A análise de Griess é um método utilizado para quantificar o ON e seus metabólitos em amostras biológicas ou líquidas (GIUSTARINI et al., 2004). Para essa análise foi utilizado o soro do sangue dos participantes, previamente centrifugado. A

técnica, que utiliza reações químicas subsequentes, permite a formação de um corante azo vermelho, cuja intensidade é proporcional à concentração de ON ou de seus metabólitos. Posteriormente, 50 µl de soro (diluído 1:1) de cada participante foi pipetado em microplacas com a solução de Griess, a leitura e análise foi realizada no equipamento Spectramax I3 (Molecular Devices).

#### 4.11 Dinamômetro isocinético - contração isométrica voluntária máxima (CIVM)

Após 6 dias da realização das biópsias, os participantes foram convidados a participar do teste de força no isocinético (Biodex System 4; Biodex Medical Systems® - equipamento pertencente ao departamento de fisioterapia da UFSCar). Vale salientar que 3 participantes desistiram e não participaram dessa etapa do projeto, totalizando um total de 13 indivíduos no grupo COVID-Longa e 5 indivíduos no grupo Controle.

Primeiramente, as configurações do dinamômetro isocinético foram determinadas para cada participante de acordo com as especificações do fabricante. Antes das sessões de teste, todos os participantes tiveram sua altura e peso medidos. Cada participante foi posicionado sentado na cadeira do dinamômetro em posição vertical. 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 foi fixada em um ângulo de 90° de flexão, e o membro pesado, para correção do torque, a 30° de flexão (Figura 12).

Assim que o participante se familiarizou com o equipamento foi realizado o teste isométrico com Biodex, através de um protocolo onde foi realizado 3 sessões de extensão do joelho para medir a força do quadríceps femoral em uma posição fixa, sem movimento articular, os participantes foram instruídos por incentivo verbal a produzir o torque o mais rápido e forte possível, para manter um torque máximo por 5 segundos e depois relaxar o mais rápido possível, realizando um descanso de 2 minutos entre as sessões. Os parâmetros foram extraídos do relatório do equipamento BIODEX, entre eles os valores de pico de torque (PT) e média de PT.

#### 4.12 Eletromiografia (EMG)

A atividade elétrica do músculo esquelético foi registrada por meio de eletromiografia de superfície (EMG), utilizando o equipamento EMG System SAS1000v8 (EMG System do Brasil, São José dos Campos, SP). Os dados foram coletados a uma frequência de amostragem de 1.000 Hz. A EMG foi realizada durante a CIVM, visando avaliar a ativação muscular/neural.

Os eletrodos (2 x 2 cm) foram fixados no maior volume do músculo seguindo a orientação das fibras dos músculos reto femoral (RF) e vasto lateral (VL). O eletrodo de referência foi alocado sobre uma proeminência óssea. Os demais eletrodos foram posicionados de acordo com as diretrizes do *Surface Electromyography for the Non-Invasive Assessment of Muscles* (SENIAM), após tricotomia, limpeza da pele com álcool e abrasão leve, com o objetivo de reduzir a impedância de contato (Figura 12).

Após a aquisição, os dados foram exportados em formato texto (.txt) e em computador convencional, processados em ambiente Python (versão 3.12). Inicialmente, os dados brutos de tempo (s) e amplitude EMG (mV) foram organizados em vetores numéricos. Em seguida, submetidos a uma filtragem digital do tipo passa-banda, com o objetivo de eliminar artefatos de movimento e ruídos, preservando a faixa espectral fisiologicamente coerente.

A partir do trecho correspondente à contração voluntária máxima, a análise gráfica foi gerada e desta extraídas três parâmetros principais: (i) a amplitude pico a pico, definida como a diferença entre os valores máximo e mínimo do sinal nesse intervalo; (ii) o valor quadrático médio (RMS), utilizado como estimativa da intensidade do sinal; e (iii) a frequência, considerando a média ponderada das amplitudes. Esses três parâmetros foram utilizados na análise estatística e os dados de cada grupo foram apresentados como média e desvio padrão.



**Figura 12-** Posicionamento do participante na cadeira do dinamômetro e posição dos eletrodos da EMG

Posicionamento em cadeira do dinamômetro em posição vertical, 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 centro de rotação estimado da articulação do joelho foi alinhado com o centro de rotação do dinamômetro. Os eletrodos (2 x 2 cm) foram fixados nos músculos reto femoral (RF) e vasto lateral (VL). Um eletrodo foi fixado em uma protuberância óssea como ponto neutro.

Fonte: Elaboração própria.

#### 4.13 Análises estatísticas

Todos os experimentos foram analisados por meio do programa estatístico *GraphPad Prism* (versão 8.0.2). Foram determinados e excluídos os outliers e a normalidade dos dados foi avaliada por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para as comparações entre grupos, foram utilizados o teste T não pareado, paramétrico para dados com distribuição normal ou não paramétrico (teste de Mann-Whitney) a depender de cada análise. Para comparações dos valores obtidos entre as sessões de CIVM, foi aplicado o teste de Friedman, apropriado para dados emparelhados com distribuição não paramétrica. Adicionalmente foi calculada a razão entre a amplitude do sinal da EMG e o PT (EMG/Torque) com o objetivo de avaliar a eficiência eletromecânica dos músculos ao longo das sessões. Para todas as comparações foi

adotado o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) e os dados apresentados com média  $\pm$  SEM (média do desvio padrão).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Dados demográficos

No total foram incluídos no presente estudo 29 participantes com idade entre 18 e 50 anos. A amostra foi distribuída em dois grupos experimentais:

(1°) grupo Controle, composto por 11 indivíduos sem histórico de infecção por SARS-CoV-2 ou sintomas musculares, entre esses participantes 6 eram mulheres (54,5%) com peso médio de  $70,88 \pm 17,6$  kg e altura média de  $1,69 \pm 0,07$  metros e 5 eram homens (45,5%) com peso médio de  $78,88 \pm 8,8$  kg e altura média de  $1,73 \pm 0,005$  metros. A média de idade dos participantes deste grupo eram de  $29,3 \pm 9,1$  anos (Tabela 3).

(2°) grupo COVID-Longa, composto por 18 indivíduos com sintomas persistentes pós-infecção, entre esses participantes 5 eram homens (27,8%) com peso médio de  $93,5 \pm 22,4$  kg e altura média de  $1,79 \pm 0,04$  metros e 13 eram mulheres (72,2%) com peso médio de  $75,4 \pm 14,2$  kg e altura média de  $1,66 \pm 0,05$  metros. A média de idade dos participantes deste grupo eram de  $29,5 \pm 8,7$  anos (Tabela 3).

Para o grupo COVID-Longa, o tempo médio entre o diagnóstico da infecção aguda e a data da biópsia muscular foi de  $8,6 \pm 5,3$  meses. Todos os participantes reportaram ter recebido ao menos uma dose de vacina contra o SARS-CoV-2, é possível ver na tabela 3 quais foram as vacinas.

<b>Participantes</b>		
<b>Característica</b>	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo COVID Longa</b>
Idade (anos), Média (DP)	29,3 ( $\pm 9,1$ )	29,5 ( $\pm 8,7$ )
<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	70,88 ( $\pm 17,6$ )	75,4 ( $\pm 14,2$ )
Masculino	78,8 ( $\pm 8,8$ )	93,5 ( $\pm 22,4$ )
<b>Altura (m), Média (DP)</b>		
Feminino	1,69 ( $\pm 0,07$ )	1,66 ( $\pm 0,05$ )
Masculino	1,73 ( $\pm 0,005$ )	1,79 ( $\pm 0,04$ )
<b>Tempo após infecção (meses)</b>		
	N/A	8,6 ( $\pm 5,3$ )
<b>Vacina (distribuição)</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%)

**Tabela 3-** Características dos participantes do grupo Controle e grupo COVID-Longa

## 5.2 Análise histológica

Pela análise detalhada das lâminas do músculo vasto lateral coradas em HE (hematoxilina e eosina), como esperado foi observado uma estrutura muscular normal nos músculos do grupo controle, com fibras poliédricas, núcleos na periferia, com poucos núcleos centralizados e poucas alterações celulares, o que é completamente normal devido à pequenas lesões que ocorrem com as atividades diárias e a capacidade do músculo esquelético de se regenerar. Por outro lado, o grupo COVID-Longa apresentou aumento dessas alterações quando comparado com o controle, alterações como: aumento de núcleos centralizados, *splitting* (processo em que uma fibra está se dividindo), necrose, infiltrado inflamatório, basofilia e alteração no tecido conjuntivo (Figura 13).

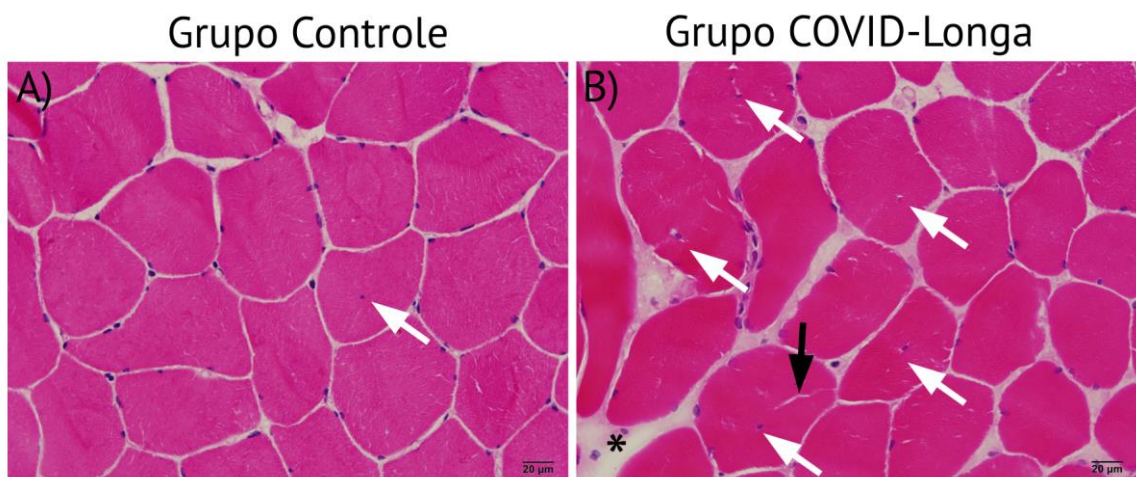
A tabela 4 destaca em porcentagem (%) a quantidade de participantes que apresentaram as alterações musculares, o que fica evidente que no grupo COVID-

Longa foi encontrado as alterações em maior parte de indivíduos do grupo, quando comparado com o controle. Além disso, ambos os grupos muitos indivíduos apresentaram centralização nuclear, sendo assim, foi feito uma análise quantitativa, com isso observamos um aumento significativo de centralização nuclear no grupo COVID-Longa (média de  $0,8074 \pm 0,4609$ ), quando comparado com o grupo controle (média de  $3,177 \pm 2,794$ ), ( $p < 0.05$ ) (Figura 14).

<b>Alterações Celulares</b>	<b>Grupo Controle</b>	<b>Grupo COVID-Longa</b>
<i>Núcleos centralizados</i>	82%	94%
<i>Splitting</i>	09%	19%
<i>Basofilia</i>	09%	37%
<i>Necrose</i>	18%	37%
<i>Região de Infiltrado inflamatório</i>	09%	25%
<i>Região com alteração de tecido conjuntivo</i>	09%	37%

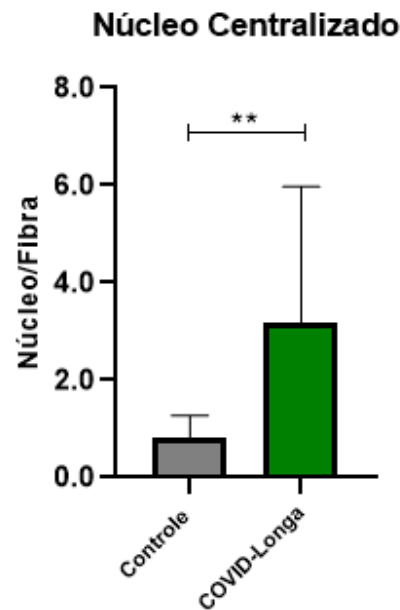
**Tabela 4-** Alterações celulares das fibras do músculo vasto lateral de indivíduos do grupo controle e COVID-Longa, identificadas pela técnica de coloração Hematoxilina e Eosina.

% Referência a quantidade de indivíduos que apresentaram a alteração no grupo.



**Figura 13-** Cortes histológicos do músculo vasto lateral de humanos corados em Hematoxilina e Eosina (HE)

**A)** Músculo vasto lateral de humanos do grupo controle, com a presença de pouca centralização nuclear. **B)** Músculo vasto lateral de humanos do grupo COVID-Longa com presença de aumento de centralização nuclear, tecido conjuntivo e splitting. **Seta Branca:** núcleo centralizado, **seta preta:** Splitting, **asteriscos:** aumento de tecido conjuntivo. (Lente = 40x, Barra = 20 µm).



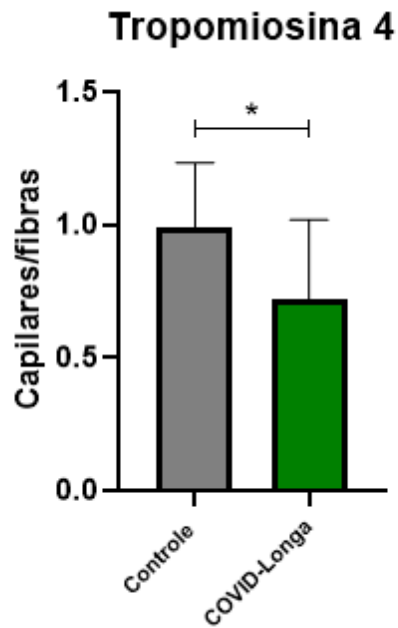
**Figura 14-** Quantificação de núcleo centralizado no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo controle e COVID-Longa

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou maior quantidade de núcleos centralizados em comparação ao grupo controle (n=11). \* \*p < 0.05.

### 5.3 Análise de imunofluorescência

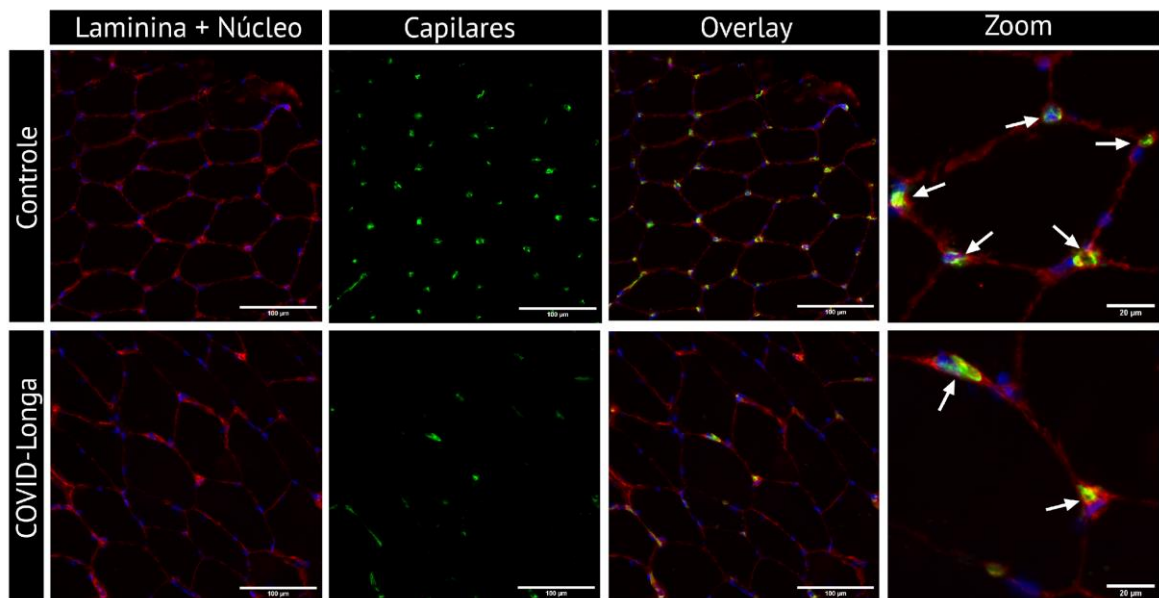
- **Tropomiosina 4 (Capilares)**

A COVID-Longa determinou no músculo vasto lateral, acometimento significativo na relação capilares por fibras musculares. As figuras 15 e 16 ilustram a presença dos capilares e a quantificação através da técnica de imunofluorescência, onde podemos observar uma redução no número de capilares por fibra no músculo esquelético dos indivíduos do grupo COVID-Longa (média de  $0,7194 \pm 0,2982$ ) quando comparado aos dos indivíduos do grupo controle (média de  $0,9900 \pm 0,2430$ ) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 15-** Quantificação de capilares pelo marcador LC24 (tropomiosina 4) no músculo vasto lateral de humanos

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou redução na quantidade de capilares por fibras em comparação ao grupo controle (n=11). \*p < 0.05.



**Figura 16-** Fotomicrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção de capilares através do anticorpo LC24/Tropomiosina 4

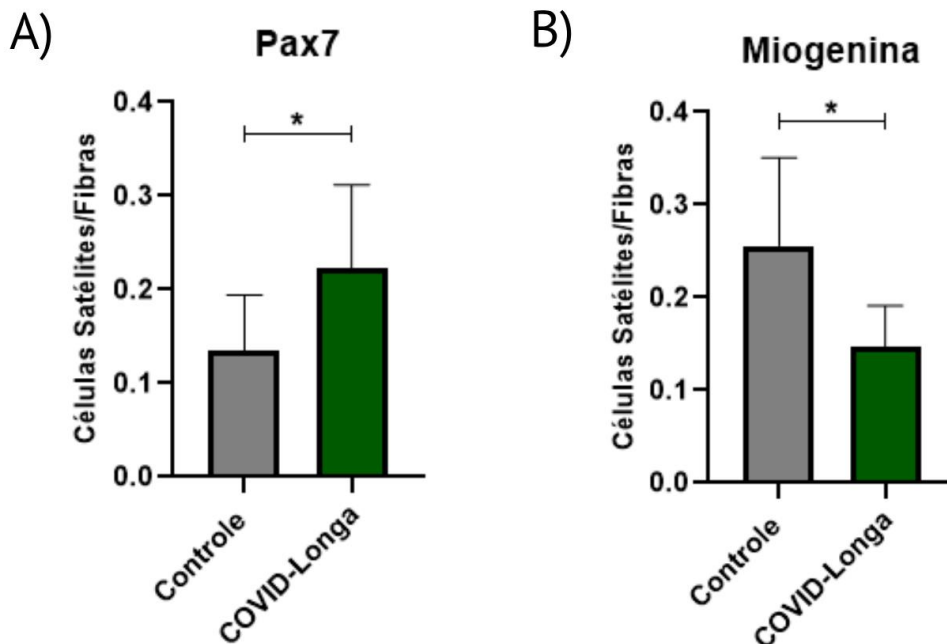
O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou redução na quantidade de capilares por fibra quando comparado ao grupo Controle (n=11) p < 0.05. Vermelho: Laminina. Azul: núcleos. Verde: tropomiosina 4. Setas brancas: Capilares. Barra: 100µm e 20µm (Zoom). Lente:40x.

- **Células Satélites**

A COVID-Longa determinou alteração nas células satélites (CS) do músculo vasto lateral de humanos. A figura 17A ilustra a quantificação das CS quiescentes e ativadas identificadas através do marcador Pax7, e como esperado, o grupo COVID-Longa (média de  $0,2233 \pm 0,08847$ ) apresentou aumento de CS quiescentes/ativadas quando comparada ao grupo Controle (média de  $0,1340 \pm 0,06025$ ) ( $p < 0.05$ ), como podemos observar na figura 18A.

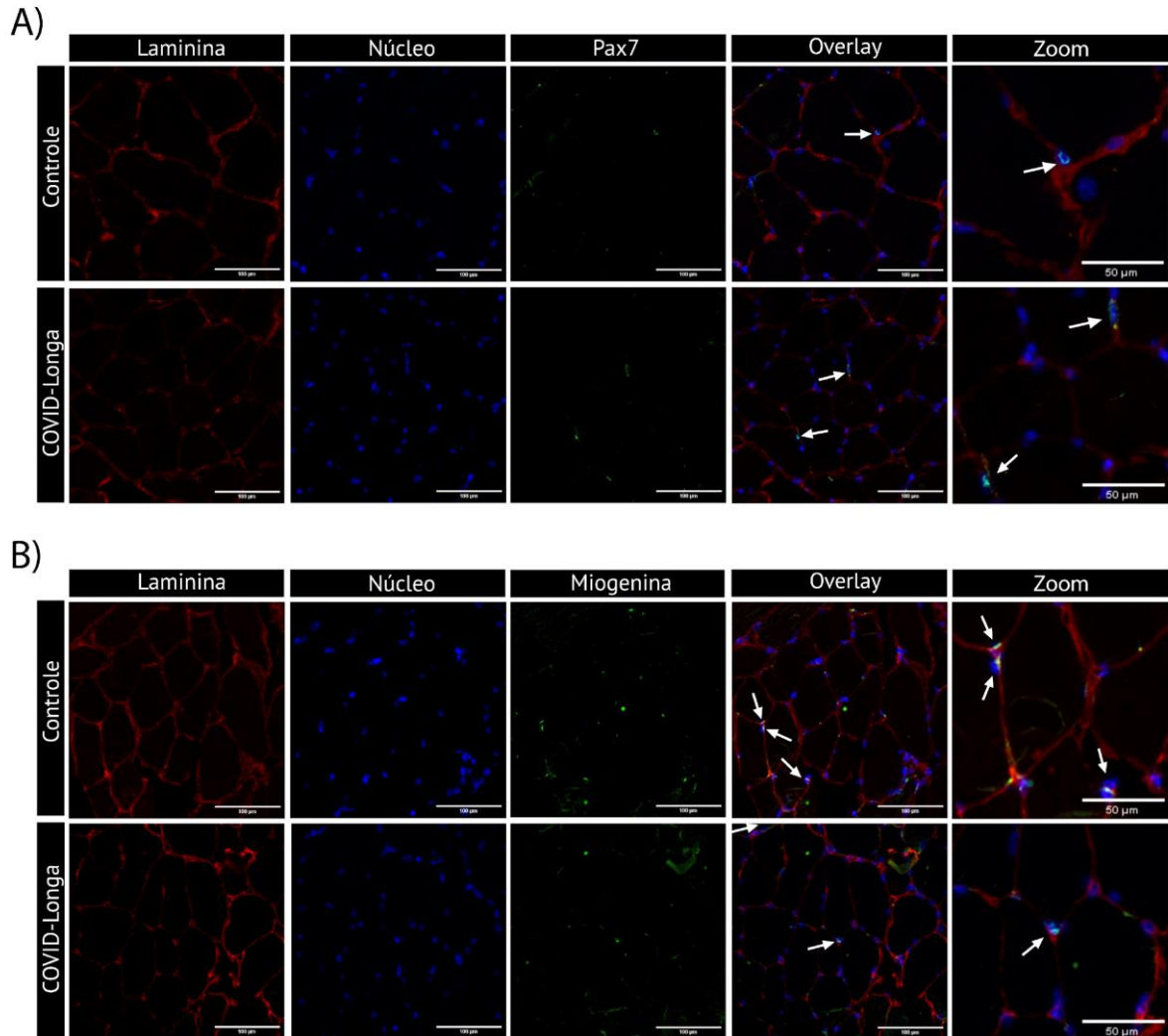
A figura 17B ilustra a quantificação das CS em diferenciação e fusão identificadas através do marcador F5D (miogenina), surpreendentemente o grupo COVID-Longa (média de  $0,1467 \pm 0,04457$ ) apresentou poucas CS em diferenciação/fusão quando comparado ao grupo Controle (média de  $0,2560 \pm 0,09476$ ) ( $p < 0.05$ ), como podemos observar na figura 18B.

Vale ressaltar que a imunomarcagem das CS tanto para pax7 como para miogenina foram confirmadas através da sua localização entre o sarcolema e a lâmina basal e pela presença do núcleo subjacente observado pela técnica de imunofluorescência (Figura 18).



**Figura 17-** Quantificação de Células Satélites no músculo vasto lateral de humanos.

**A)** O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento na quantidade de CS em quiescência/ativação em comparação ao grupo controle (n=11). \* $p < 0.05$ . **B)** O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou redução na quantidade de CS em diferenciação/fusão em comparação ao grupo controle (n=11). \* $p < 0.05$ .



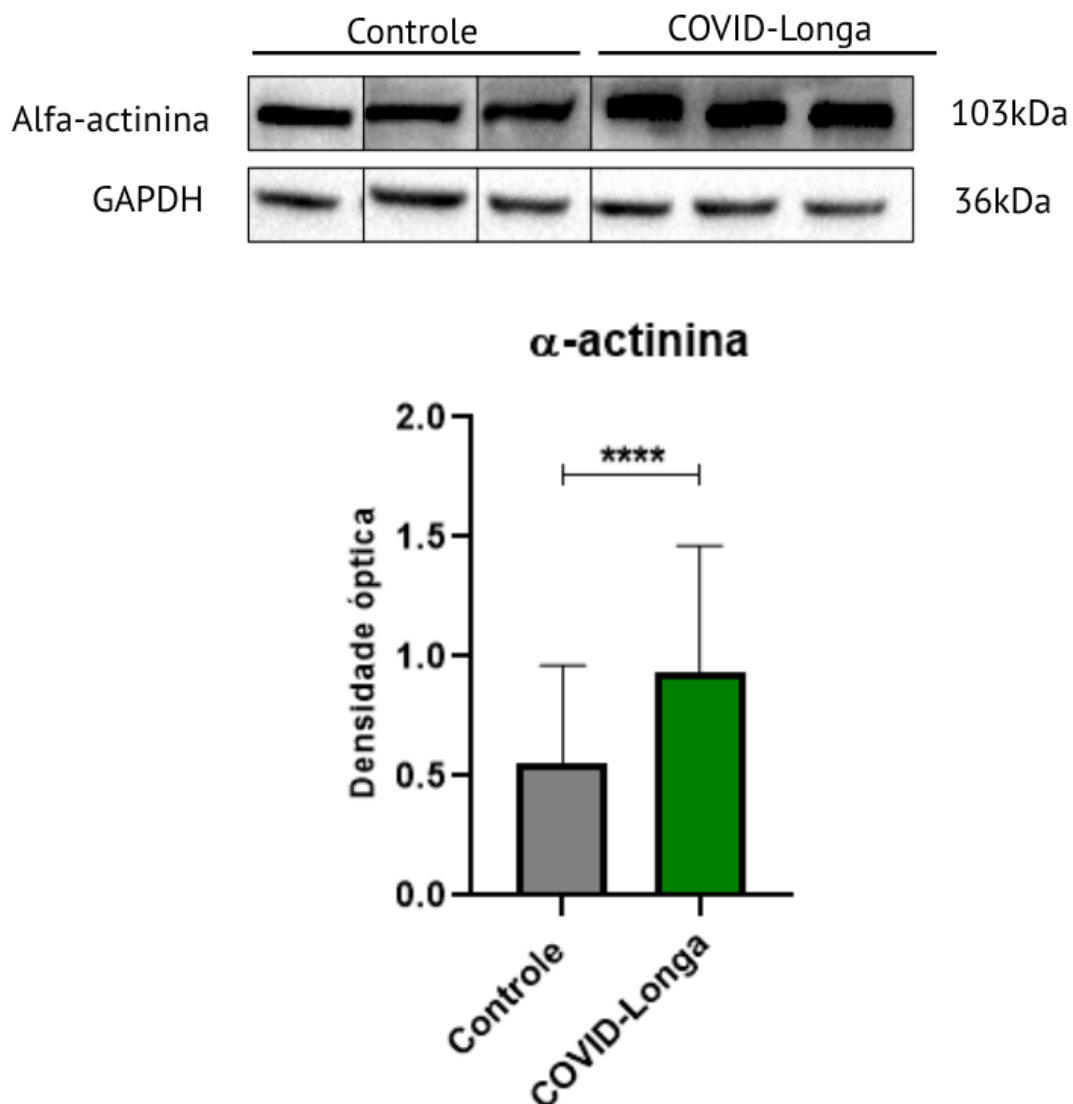
. **Figura 18-** Foto micrografias de lâminas processadas com anticorpo para imunomarcção de células satélites através dos anticorpos Pax7 e Miogenina.

**A)** O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento na imunomarcção para Pax7 quando comparado ao grupo Controle (n=11)  $p < 0.05$ . **B)** O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou redução na imunomarcção de miogenina quando comparado ao grupo Controle (n=11)  $p < 0.05$ . Vermelho: Laminina. Azul: núcleos. Verde: Pax7/Miogenina. **Setas brancas:** Células Satélites C. Barra: 100um e 50um (Zoom). Lente: 10x.

#### 5.4 Análise de *Western Blotting*

- **$\alpha$ -actinina**

Nossos resultados para  $\alpha$ -actinina apresentados pelo ensaio de *Western Blotting* demonstraram aumento do conteúdo da proteína no grupo COVID-Longa (média de  $1,111 \pm 1,169$ ) quando comparado ao grupo Controle (média de  $0,6035 \pm 0,4829$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 19).

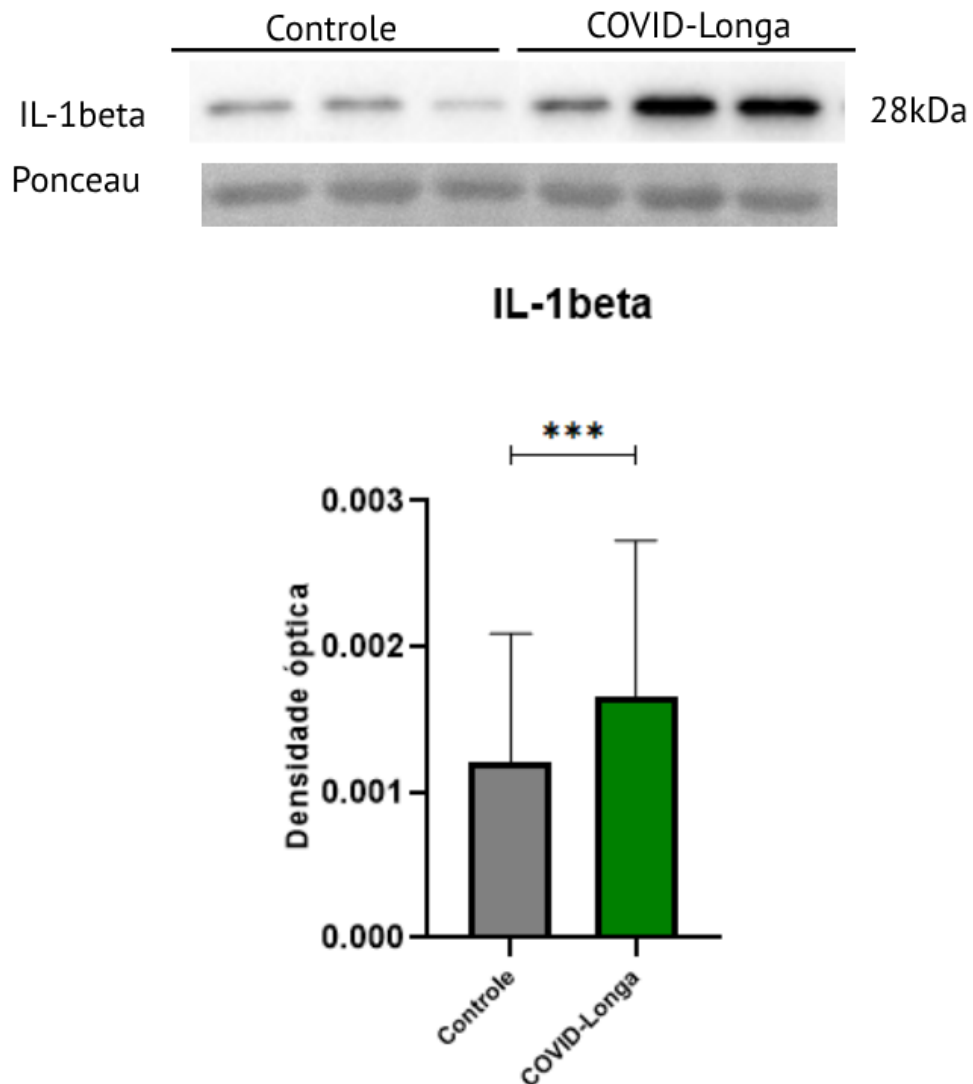


**Figura 19-** Conteúdo de  $\alpha$ -actinina presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de *Western Blotting*

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento do conteúdo de  $\alpha$ -actinina em comparado ao controle (n=11). O GAPDH foi utilizado como controle de carregamento (normalizador). \*\*\*\*  $p < 0.05$ .

- **IL-1 $\beta$**

Nossos resultados para IL-1 $\beta$  apresentados pelo ensaio de *Western Blotting* mostraram aumento do conteúdo da proteína no grupo COVID-Longa (média de  $0,001655 \pm 0,001072$ ) quando comparado ao grupo Controle (média de  $0,001203 \pm 0,0008850$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 20).

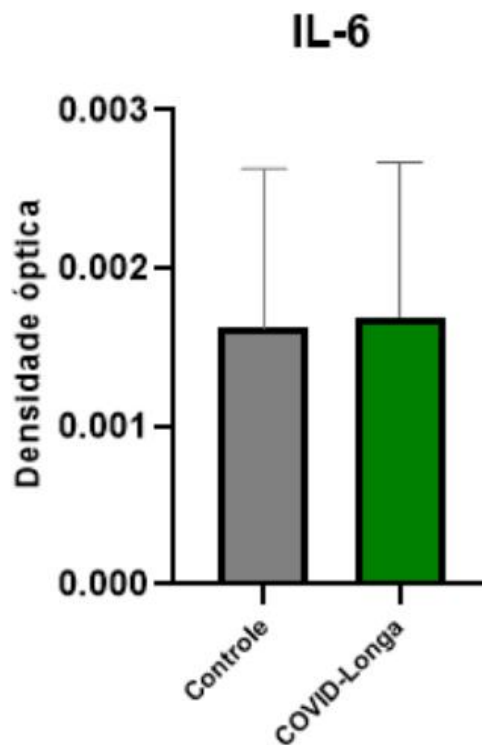
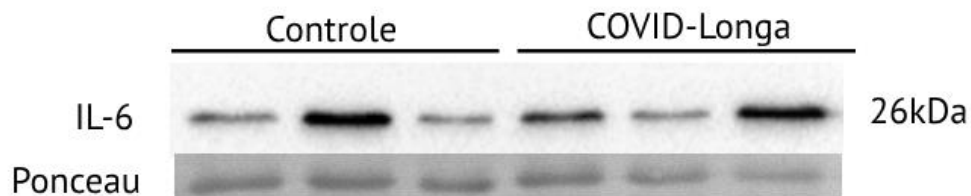


**Figura 20-** Conteúdo de IL-1beta presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de Western Blotting

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento do conteúdo de IL-1beta em comparado ao controle (n=11). O ponceau foi utilizado como controle de carregamento (normalizador). \*\*\*  $p < 0.05$ .

- **IL-6**

Nossos resultados para IL-6 apresentados pelo ensaio de *Western Blotting* não mostraram diferenças no conteúdo da proteína do grupo COVID-Longa quando comparado ao grupo controle ( $p=0.99$ ) (Figura 21).

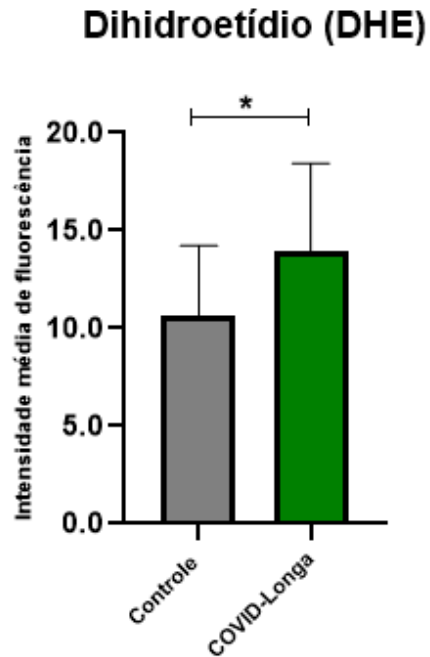


**Figura 21-** Conteúdo de IL-6 presente no músculo vasto lateral de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle representado pelo ensaio de Western Blotting

Não observamos diferenças entre o grupo COVID-Longa ( $n=18$ ) e o Controle ( $n=11$ ). O ponceau foi utilizado como controle de carregamento (normalizador) ( $p=0.99$ ).

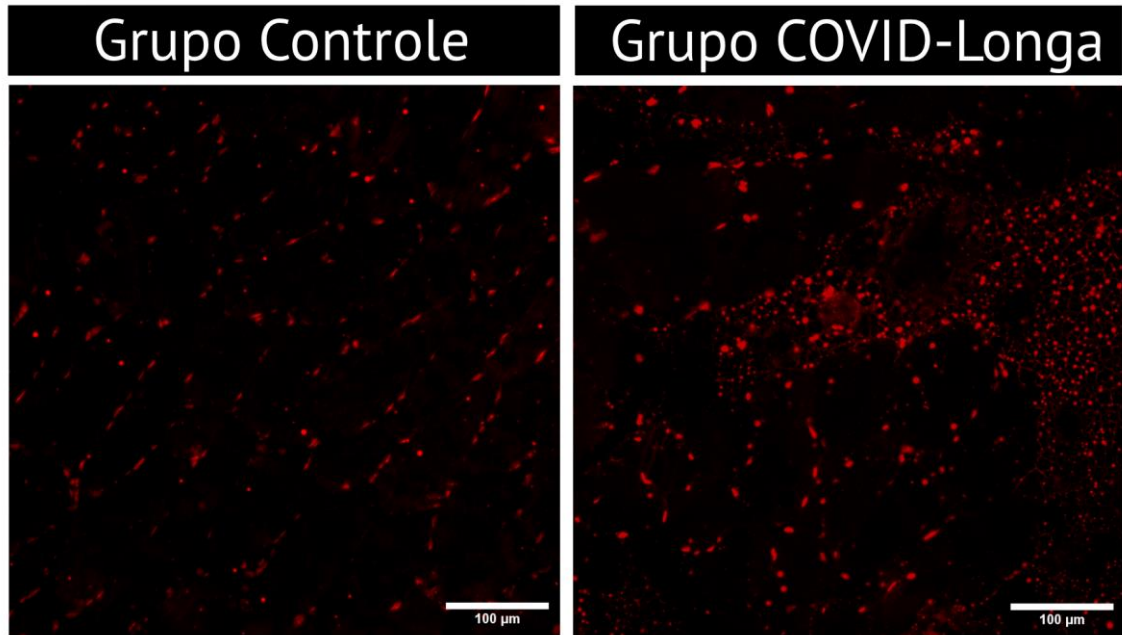
### 5.5 Análise de dihidroetídio (DHE) para espécies reativas de oxigênio (ERO)

A Figura 22 e 23, mostram através da análise de dihidroetídio (DHE), um aumento nas espécies reativas de oxigênio no músculo esquelético vasto lateral de indivíduos no grupo COVID-Longa (média de  $13,98 \pm 4,465$ ) quando comparado ao músculo de indivíduos no grupo Controle (média de  $10,67 \pm 3,560$ ) ( $p < 0.05$ ).



**Figura 22-** Quantificação de espécies reativas de oxigênio (ERO) pela análise de dihidroetídio (DHE) no músculo vasto lateral de humanos

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento na intensidade média de fluorescência para espécies reativas de oxigênio (ERO) em comparação ao grupo controle (n=11). \* $p < 0.05$ .

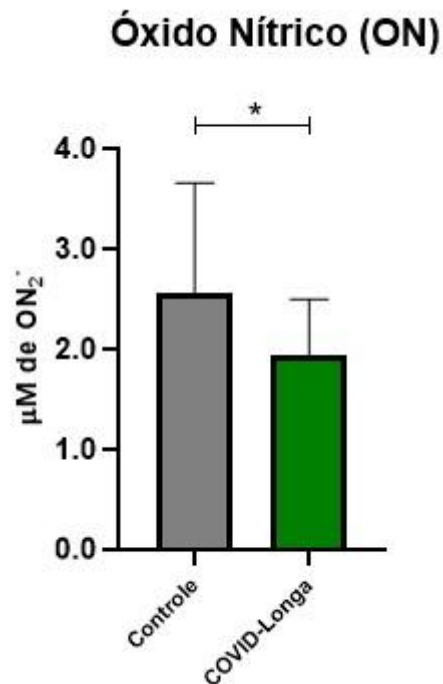


**Figura 23-** Fotomicrografias de lâminas processadas e analisadas com dihidroetídio para marcação de espécies reativas de oxigênio (ERO) no músculo vasto lateral de humanos

O grupo COVID-Longa (n=18) apresentou aumento na quantidade de ERO quando comparado ao grupo Controle (n=11)  $p < 0.05$ . Vermelho: ERO. Barra: 100 $\mu$ m. Lente: 10x.

### 5.6 Análise de griess para óxido nítrico (ON)

Através do método de análise de griess, foi possível observar que o grupo COVID-Longa (média de  $1,933 \pm 0,146$ ) apresentou uma diminuição na quantidade do óxido nítrico (ON) no soro desses pacientes em comparação aos indivíduos do grupo controle (média de  $2,555 \pm 0,276$ ) ( $p < 0.05$ ) (Figura 24).

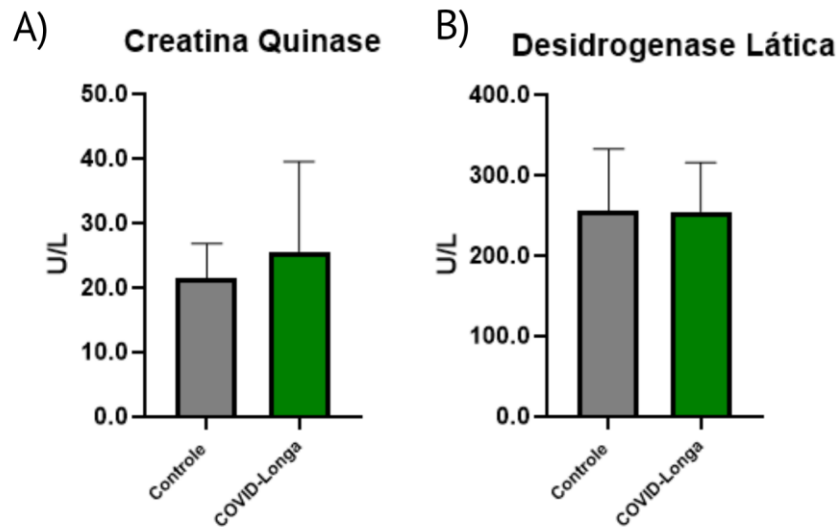


**Figura 24-** Quantificação de óxido nítrico (ON) pela análise de griess no músculo vasto lateral de humanos

O grupo COVID-Longa (n=15) apresentou redução na quantidade de ON em comparação ao grupo controle (n=5). \*p < 0.05.

### 5.7 Quantificação dos biomarcadores CK e LDH (Lesão Muscular)

A quantificação dos biomarcadores utilizados para identificação de lesão muscular, tanto a creatina quinase (CK) (p=0,52) como a desidrogenase láctica (LDH) (p=0,95) não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos COVID-Longa e Controle (Figura 25A e 25B). Isso pode ter acontecido devido a limitação em relação a quantidade de participantes do grupo Controle ser menor (n=5) em comparação ao grupo COVID-Longa (n=15).



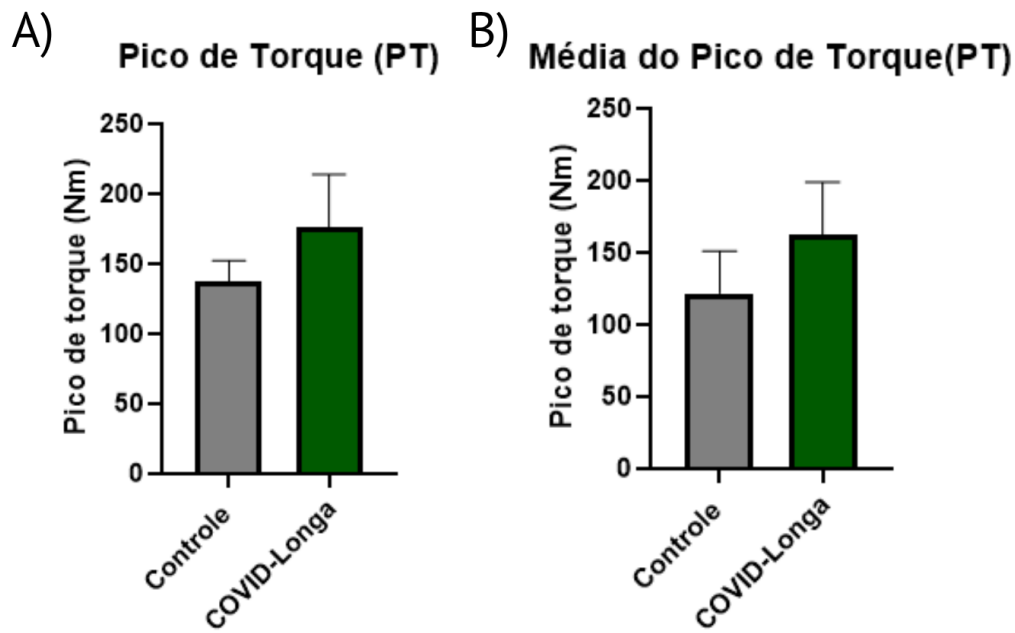
**Figura 25-** Quantificação de CK e LDH no soro de indivíduos do grupo COVID-Longa e controle

**A)** Apesar da tendência evidenciada maior no gráfico da CK do grupo COVID-Longa (n=15), as diferenças não foram significativas em comparação com o grupo Controle (n=5). **B)** Não houve diferenças entre os grupos COVID-Longa (n=15) e grupo Controle (n=5) para LDH.

### 5.8 Contração isométrica voluntária máxima (CIVM) e eletromiografia (EMG)

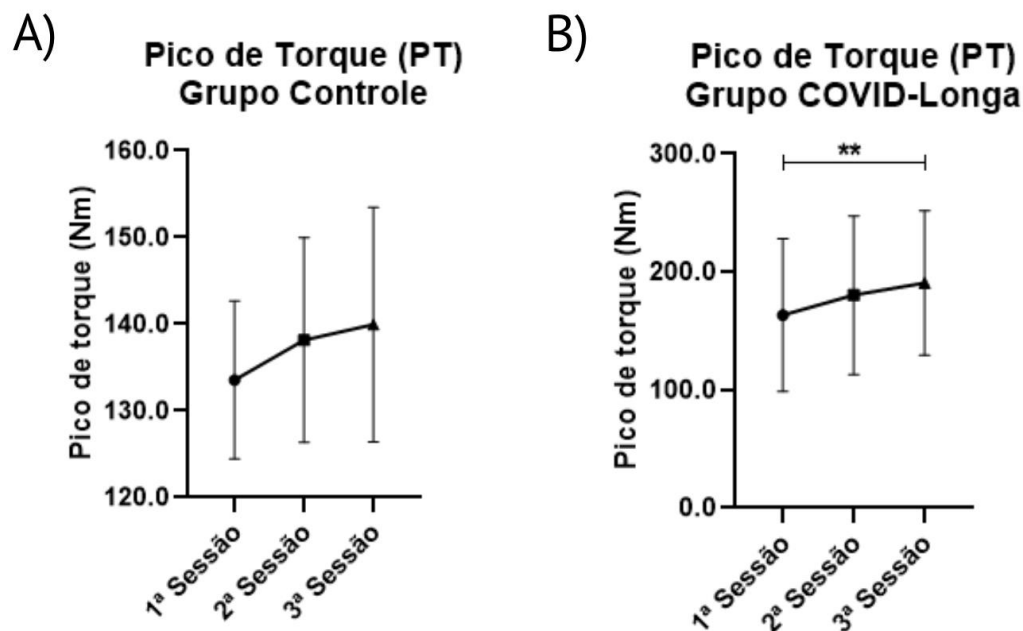
Quando realizado as comparações para pico de torque ( $p=0,1011$ ) e média do pico de torque ( $p=0,1033$ ) entre os grupos controle e COVID-Longa não foram encontrados resultados significativos, porém é possível observar uma tendência maior nos gráficos que representam o grupo COVID-Longa (Figura 26A e 26B).

Comparações estatísticas também foram feitas para avaliação do pico de torque (PT) entre as sessões de isometria dentro de um mesmo grupo, o grupo controle não apresentou diferenças significativas no PT entre as sessões ( $p=0,2222$ ) (Figura 27A), por outro lado no grupo COVID-Longa conseguimos observar aumento do PT durante as sessões. Os valores médios foram de ( $163,3 \pm 64,70$ ;  $180,3 \pm 67,10$ ;  $190,5 \pm 61,24$ ) nas sessões 1, 2 e 3 respectivamente ( $p < 0.05$ ) (Figura 27B).



**Figura 26-** Pico de torque e média do pico de torque durante a CIVM

Apesar da tendência maior no gráfico do PT **(A)** e na média do PT **(B)** do grupo COVID-Longa (n=15), as diferenças não foram significativas em comparação com o grupo Controle (n=5).



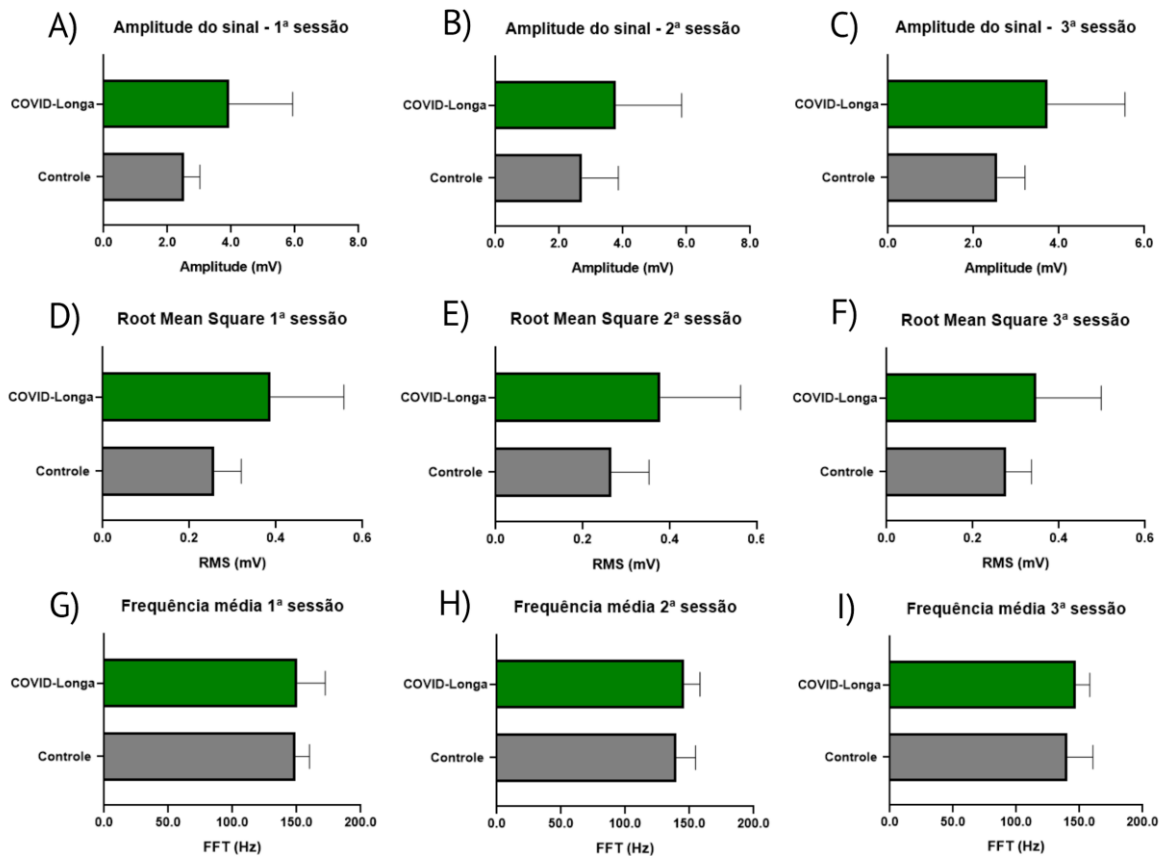
**Figura 27-** Pico de torque durante as 3 sessões de CIVM no grupo Controle e COVID-Longa

**A)** Não houve diferença no PT entre as 3 sessões de CIVM realizadas no grupo Controle (n=5). **B)** No grupo COVID-Longa (n=15) é possível observar aumento do PT durante as 3 sessões de CIVM. \*\*p < 0.05.

As análises de eletromiografia (EMG) foram avaliadas tanto para o músculo vasto lateral como para o músculo reto femoral, ambos constituem o quadríceps femoral, principal músculo responsável pela execução do movimento de extensão realizado no Biodex.

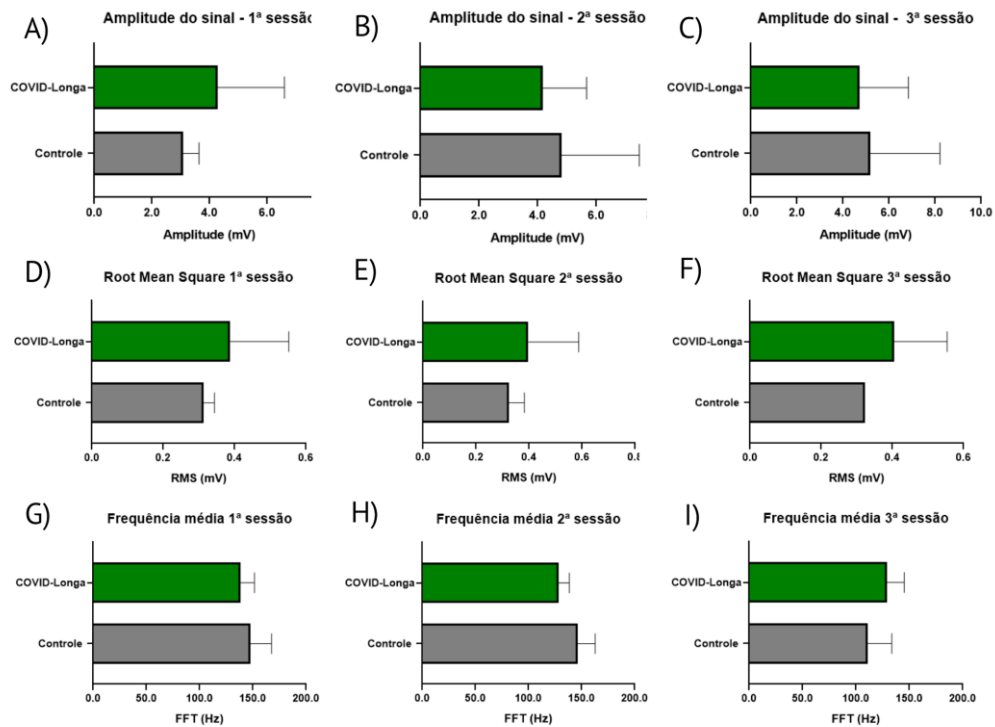
Em ambos os tecidos musculares analisados (músculo reto femoral e vasto lateral), não foram encontrados resultados significativos na amplitude do sinal Root mean square (RMS) e nem para a frequência média na comparação entre os grupos Controle e COVID-Longa ( $p > 0.05$ ) (Figura 28 e 29). Portanto, quando realizamos comparações dentro do grupo COVID-Longa entre as 3 sessões encontramos uma diminuição significativa na frequência média e no músculo vasto lateral (Figura 30F). Os valores médios foram de ( $137,9 \pm 15,41$ ;  $129,1 \pm 14,07$ ;  $129,7 \pm 16,87$ ) nas sessões 1, 2 e 3 respectivamente ( $p < 0.05$ ).

As demais comparações dentro do grupo não foram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ). As comparações dentro do grupo Controle também não foram estatisticamente significativas ( $p > 0.05$ ) (Figura 31).



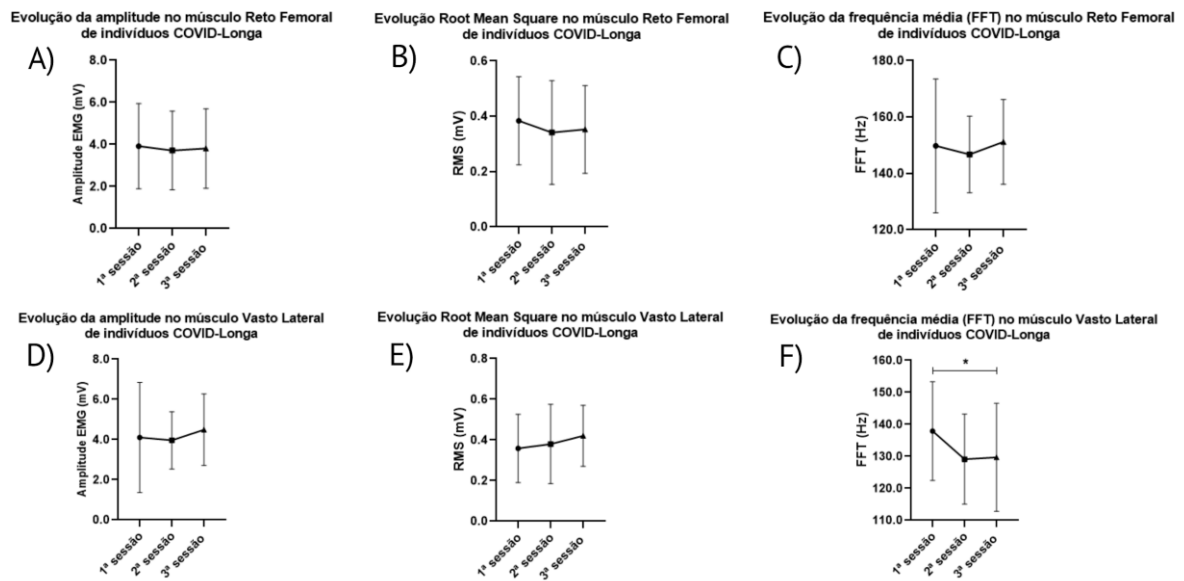
**Figura 28-** Eletromiografia do músculo reto femoral de humanos durante contração isométrica

**(A,B,C)** Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) na amplitude do sinal no músculo reto femoral em nenhuma das sessões. **(D,E,F)** Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) no root mean square no músculo reto femoral em nenhuma das sessões. **(G,H,I)** Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) na frequência média no músculo reto femoral em nenhuma das sessões.



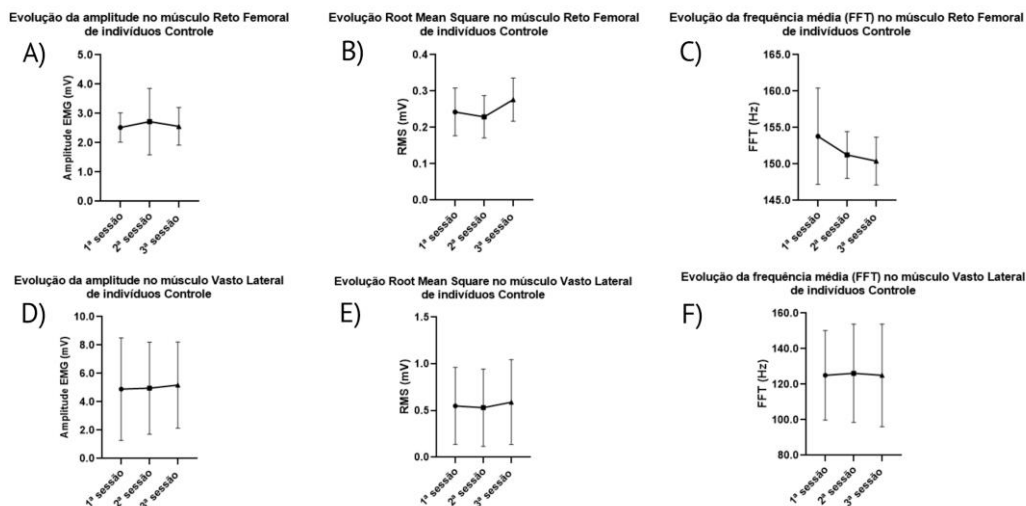
**Figura 29-** Eletromiografia do músculo vasto lateral de humanos durante contração isométrica

(A, B,C) Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) na amplitude do sinal no músculo vasto lateral em nenhuma das sessões. (D,E,F) Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) no root mean square no músculo vasto lateral em nenhuma das sessões. (G,H,I) Não houve diferenças significativas entre o grupo Controle (n=5) e COVID-Longa (n=15) na frequência média no músculo vasto lateral em nenhuma das sessões.



**Figura 30-** Eletromiografia do músculo reto femoral e vasto lateral do grupo COVID-Longa durante as 3 sessões de contração isométrica

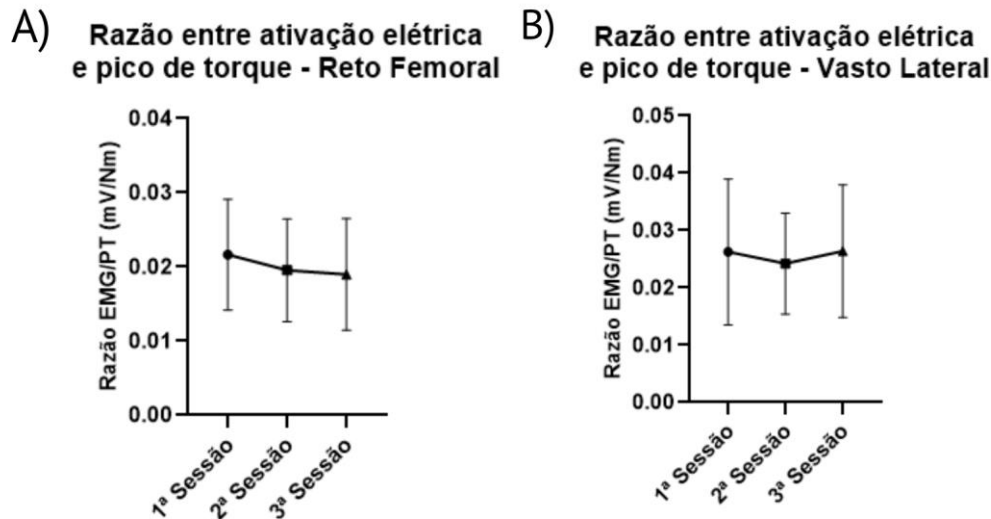
(A,B,C) Não houve diferenças significativas na amplitude do sinal, root mean square e frequência média no músculo reto femoral entre as sessões. D,E) Não houve diferenças significativas na amplitude do sinal e root mean no músculo vasto lateral entre as sessões F) No grupo COVID-Longa (n=15) é possível observar uma diminuição significativa na frequência média no músculo vasto lateral entre as sessões ( $p < 0.05$ ).



**Figura 31-** Eletromiografia do músculo reto femoral e vasto lateral do grupo Controle durante as 3 sessões de contração isométrica

(A,B,C,D,E,F) Não houve diferenças significativas na amplitude do sinal, root mean square e frequência média no músculo reto femoral e vasto lateral entre as sessões no grupo Controle (n=5).

Uma razão entre atividade elétrica e pico de torque no grupo COVID-Longa tanto para o músculo vasto lateral ( $p=0,5580$ ) como para o reto femoral ( $p=0,2192$ ) também foi realizado, porém não foram observadas diferenças estatísticas (Figura 32).



**Figura 32-** Razão entre eletromiografia e o pico de torque dos músculos reto femoral e vasto lateral do grupo COVID-Longa

(A,B) Não houve diferenças significativas entre as sessões para ambos os músculos no grupo COVID-Longa ( $n=15$ ).

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo podemos observar que a prevalência dos participantes são mulheres quando comparamos com os homens. Estudos mostram que mulheres são mais resistentes a desenvolver as formas graves da doença em relação aos homens (JIN et al., 2020; ALKHOULI et al., 2020; TEJPAL et al., 2021; PRADHAN et al., 2020). Isso é possível devido à diferença biológica entre o sistema imunológico de homens e mulheres (TEJPAL et al., 2021), por outro lado, estudos demonstram que as mulheres tem sido mais afetadas pela COVID-Longa (SHAH et al., 2025) com isso podemos explicar o maior interesse e adesão das mulheres no presente estudo.

Outro dado importante em relação aos participantes é que a maioria reportou ter recebido ao menos uma dose de vacina contra o SARS-CoV-2. Um estudo de Antonelli et al., (2022) mostrou menor risco de sintomas persistentes em indivíduos vacinados, enquanto Ayoubkhani et al., (2022) demonstrou que vacinados

apresentaram cerca de 50% menos riscos de desenvolver COVID-Longa. Mesmo que haja uma associação entre a vacinação e um menor risco de desenvolver sintomas persistentes, os casos de COVID-Longa após a vacinação ainda podem ocorrer, como mostramos neste atual estudo.

Por isso esse estudo investiga a musculatura esquelética desses indivíduos e traz resultados promissores e discussões sobre as possíveis causas do acometimento do músculo esquelético na COVID-Longa, onde os principais sintomas musculares relatados foram de mialgia, fadiga, fraqueza muscular, artralgia e intolerância ao exercício.

### 6.1 Alterações histológicas do músculo vasto lateral de humano com COVID-Longa

Por meio da análise histológica, utilizando a coloração com hematoxilina e eosina, foi possível observar alterações na musculatura dos indivíduos do grupo COVID-Longa indicando dano muscular, como centralização nuclear, infiltrado inflamatório, basofilia, *splitting*, necrose e alteração do tecido conjuntivo.

O aumento significativo dos núcleos centralizados no grupo COVID-Longa são um indício de regeneração muscular, essa centralização acontece na fase de fusão das células satélites no processo de regeneração muscular. Com a ativação das células satélites após um estímulo, ocorre a proliferação até o local da lesão e seguida da diferenciação e fusão reparando o dano tecidual, é nesta etapa de fusão que é possível observar a centralização nuclear, já que com a maturação da fibra recém reparada, o núcleo migra de volta para a periferia (SIGOLI et al., 2022; CORNACHIONE, et al., 2008; DUBUISSON et al., 2022).

A centralização nuclear é observada em diversas miopatias e distrofias, como por exemplo na Distrofia Muscular de Duchenne (VATTEMI et al., 2014; SIGOLI et al., 2022), assim como em músculos saudáveis, isso acontece devido as microlesões causadas pelas atividades físicas diárias (CLOSE et al., 2005), e por isso é normal a presença dessa alteração observada nos músculos do grupo controle, entretanto, no grupo COVID-Longa, foi possível visualizar uma maior quantidade de centralização nuclear, o que indica a presença de um amplo processo de regeneração mesmo meses após a infecção.

Além da centralização nuclear outras alterações foram encontradas, como infiltrado inflamatório, necrose e alteração do tecido conjuntivo. Essas alterações

podem ocorrer com o aumento do influxo de cálcio nas fibras devido às rupturas na membrana muscular (BOZYCKI et al., 2018). Essa ruptura no sarcolema pode ser causada por diversos fatores, geralmente relacionados ao estresse mecânico ou a desequilíbrios bioquímicos. A inflamação crônica é uma das causas e pode alterar a permeabilidade da membrana e levar a danos estruturais (MONTES-IBARRA et al., 2022). Outra causa pode ser a produção excessiva de radicais livres, e o estresse oxidativo pode danificar a membrana celular (WANG et al., 2020). Além disso, a COVID Longa tem mostrado um prejuízo na função mitocondrial, o que diminui a produção de ATP, necessário para manter a integridade das membranas celulares, favorecendo a ruptura (MADSEN et al., 2024). O influxo exacerbado de cálcio do meio extracelular também justificam os achados para células basofílicas, atributo da acidose citosólica, passíveis de identificação pela coloração com a hematoxilina devido a afinidade que o corante tem por estruturas ácidas (JUNQUEIRA, et al., 2017).

Mesmo que não quantificado o tecido conjuntivo, foi possível observar em algumas regiões uma distribuição desse tecido de forma não uniforme ao redor das fibras musculares do grupo COVID-Longa, e identificado locais de acúmulo de tecido conjuntivo, os quais sugerem fibrose. Alguns estudos explicam que isso acontece devido à ativação excessiva das vias fibróticas durante o período agudo da infecção, associado ao fato de que a COVID Longa não promove um ambiente compensatório para a reestruturação desse tecido conjuntivo comprometido e nem a remoção total dos pontos de fibrose (DANESINI et al., 2024; TYAGI et al. 2022; SALOMÃO et al., 2023).

Outro achado importante é a presença de "*splitting*", este termo é amplamente utilizado e se refere a fibras musculares que parecem ser divididas ou fragmentadas em duas ou mais fibras filhas menores, é um processo que ocorre devido à sobrecarga funcional ou ao aumento de volume (ERIKSSON et al., 2006; MURACH et al., 2019). De acordo com Makovicky et al. (2020) a divisão das fibras musculares esqueléticas também pode ser interpretada como uma degeneração seguida pela regeneração das fibras musculares esqueléticas.

Outros estudos também encontraram as mesmas alterações, corroborando com nossos achados. Soares et al. (2022) observaram a presença de núcleos centralizados, atrofia, infiltrado celular e necrose em pacientes com síndrome pós-COVID, da mesma forma Hejbøl et al. (2022) também observaram a presença de

núcleos centralizados, atrofia e infiltrado inflamatório nos músculos de pacientes com sintomas musculares persistentes por 14 meses após a infecção por COVID-19.

## 6.2 Alteração na $\alpha$ -actinina sarcomérica do músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa

A  $\alpha$ -actinina é uma das principais proteínas dos discos Z do músculo esquelético de humanos, é essencial para manter a estrutura e função do sarcômero, funcionam como uma rede reticular nos filamentos finos de actina, dando estabilidade ao sarcômero durante a contração (YOUNG et al., 2000). No músculo humano, a  $\alpha$ -actinina-2 (ACTN2) é expressa em todas as fibras musculares, (codificada por ACTN2), enquanto a  $\alpha$ -actinina-3 (ACTN3) tem uma expressão mais especializada, e é restrita às fibras musculares glicolíticas, responsáveis pela rápida geração de força (MACARTHUR et al., 2004; MILLS et al., 2001). Nossos resultados para  $\alpha$ -actinina-2 apresentados pelo ensaio de *Western Blotting* mostraram aumento do conteúdo da proteína no grupo COVID-Longa quando comparado ao grupo controle, que indicam uma resposta compensatória da  $\alpha$ -actinina no músculo afetado.

Um estudo recente investigou a interação entre o SARS-CoV-2 com a  $\alpha$ -actinina-4 (ACTN4) expressas em células endoteliais e fibroblastos, como regulador da replicação viral (ZHU et al., 2024). Já Yenmis et al. (2025) demonstraram um efeito protetor da ACTN3 contra a infecção grave pela COVID-19, no entanto, infelizmente não há estudos que tenham analisados  $\alpha$ -actinina-2 em músculos esqueléticos de pacientes nas condições de COVID-19 aguda e COVID-Longa.

Embora não há estudos que descrevem diretamente sobre esse achado em músculos de pacientes com COVID-Longa, experimentos realizados em outros modelos indicam que a  $\alpha$ -actinina-2 pode ser regulada positivamente em situações de adaptação muscular (FLUCK et al., 2003). Um estudo com camundongos Knockout para ACTN3 apresentaram elevação da ACTN2, o que sugere uma adaptação compensatória do sarcômero (SETO et al., 2011), além disso o estudo de Witt et al. (2017) demonstrou em culturas humanas que fatores de crescimento aumentam a ACTN2 durante a diferenciação muscular. Esses estudos podem fortalecer nossa hipótese de resposta compensatória ou regenerativa, visto que na análise morfológica observamos aumento da centralização nuclear.

### 6.3 Disfunção endotelial e estresse oxidativo no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa

No presente estudo, encontramos a nível morfológico alterações capilares, onde foi possível observar uma redução da razão capilar-fibra em pacientes com COVID-Longa quando comparado ao controle. Essa redução pode estar contribuindo para sintomas como fraqueza muscular, fadiga intensa e intolerância ao exercício, devido a diminuição da oxigenação e nutrição muscular (SOARES et al., 2022).

A disfunção endotelial e o dano vascular pode ser uma das causas dessa rarefação capilar, uma vez que o SARS-CoV-2 infecta as células endoteliais dos capilares através dos receptores ECA2 causando inflamação e danos nos vasos sanguíneos. Esta situação favorece a destruição e a rarefação dos capilares, tanto pela inflamação local como sistêmica, prejudicando o reparo vascular e a angiogênese, ou seja, a síntese de novos capilares (OSTERGAARD et al., 2021; OSIAEVI et al., 2022; SOARES et al., 2022). Aschaman et al. (2023) realizaram biópsias musculares em 11 indivíduos que apresentavam sintomas musculares e intolerância ao exercício após meses a infecção aguda pelo SARS-CoV-2, os mesmos observaram alterações capilares, como a redução na capilarização no músculo vasto lateral, o que corrobora com os nossos resultados. Outro estudo foi de Hejbøl et al. (2022) que biopsiou o músculo bíceps braquial de 16 indivíduos com sintomas musculares persistentes pós COVID-19 e encontrou degeneração capilar. Além disso, outros estudos mostram que o desuso e o descondicionamento físico reduz rapidamente a densidade capilar muscular e danifica as mitocôndrias (TANAKA et al., 2024; LAMPERT et al., 1996; TYML et al., 1999; HYATT et al., 2021), o que pode ocorrer também na COVID-Longa, em casos de inatividade prolongada, que pode desenvolver um ambiente favorável à redução de capilar, piorando a perfusão e o condicionamento físico.

A rarefação de capilares no músculo esquelético em pacientes com COVID-Longa também está fortemente associada ao aumento do estresse oxidativo e a diminuição da biodisponibilidade de óxido nítrico (ON), dois fatores centrais na saúde vascular e muscular (MONTIEL et al., 2022; LOBATO et al., 2024; COOK et al., 2002). O estresse oxidativo é propriamente dito como “um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor das espécies oxidantes, potencialmente levando a danos”

(BALDELLI et al., 2019; GUTTERIDGE E HALLIWELL, 2018), sendo prejudicial às células musculares, pois envolve a geração excessiva de ERO que podem danificar o músculo esquelético e resultar em danos mitocondriais duradouros (LIAN et al., 2022; SHANKAR et al., 2024; NOONONG et al., 2023). De acordo com Lian et al. (2022), o excesso de ERO também pode afetar a função das células satélites do músculo esquelético, o que comprometera regeneração muscular.

O ON, uma molécula sinalizadora que é produzida principalmente por enzimas óxido nítrico sintase (NOS) no músculo por NOS endotelial (eNOS) e a NOS neuronal (nNOS) (STAMLER E MEISSNER 2001), tem como principal função no músculo esquelético a regulação do fluxo sanguíneo muscular através da vasodilatação, melhorando a entrega de oxigênio e nutrientes principalmente durante exercícios físicos (MUELLER et al., 2025). O ON em níveis adequados modula a liberação de cálcio dentro das fibras musculares auxiliando na força e contração (MUELLER et al., 2025; CYR et al., 2020), estimula a biogênese mitocondrial por meio da ativação do PGC-1 $\alpha$  (TENGGAN et al., 2012) e atua na ativação de células satélites favorecendo o processo de reparo muscular (ANDERSON, 2000). Em concentrações fisiológicas o ON atua como um importante antioxidante, neutralizando as ERO (MUELLER et al., 2025).

No caso da COVID-Longa a redução de ON pode ser resultado de alterações endoteliais, inflamatórias e oxidativas que comprometem a sua produção e biodisponibilidade, e conseqüentemente, a diminuição pode ser devido a menor produção no caso de eNOS disfuncionais, maior degradação por ERO ou, até mesmo, menor estímulo físico pela inatividade. A deficiência de ON no músculo esquelético pode contribuir para sintomas como fadiga, intolerância ao exercício físico e mialgia (MONTIEL et al., 2022; YANAI et al., 2024).

O presente estudo observou tanto o aumento de ERO no músculo esquelético como a redução de ON no soro de pacientes do grupo COVID-Longa quando comparado ao grupo controle, o que em conjunto com a redução dos capilares caracteriza-se uma disfunção endotelial. Alguns estudos apoiam a hipótese de disfunção endotelial continua em pacientes pós COVID-19, tendo como principais mecanismos prováveis a presença viral persistente, inflamação crônica e desregulação imunológica (WU et al., 2023; CHIOH et al., 2021; LAMBADIARI et al., 2021; MEHANDRU E MERAD, 2022). O estudo de Hofmann et al. (2023) sugerem que a fadiga pós COVID tem conexão com o aumento de ERO e estresse oxidativo,

além disso observaram também que os mesmos reduzem na medida que os sintomas de fadiga atenuem.

Portanto esses mecanismos de aumento de estresse oxidativo e a queda nos níveis de ON podem explicar muitos dos sintomas musculoesqueléticos persistentes da COVID-Longa, como por exemplo a fraqueza, fadiga e mialgia, mesmo em pacientes que tiveram a forma leve ou moderada da doença.

#### 6.4 Inflamação de baixo grau no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa

Muitos estudos descrevem a fase aguda da COVID-19 como uma resposta imune exacerbada que leva a liberação de várias citocinas e a geração de ERO, principalmente nos casos graves, no qual é muito discutido os efeitos da “tempestade de citocinas” (ALBUQUERQUE et al., 2021; VANINOV 2020; ELIJAALY et al., 2021; LAGE et al., 2022; DE SOUZA et al., 2020).

No tópico anterior foi discutido sobre o aumento de ERO na fase pós COVID-19 e umas das possíveis causas para esse aumento de acordo com a literatura é a de inflamação crônica (WU et al., 2023; CHIOH et al., 2021; LAMBADIARI et al., 2021; MEHANDRU E MERAD, 2022), e um resultado que contribui para essa hipótese, é o aumento de IL-1 $\beta$  encontrado nos indivíduos do grupo COVID-Longa quando comparado aos indivíduos do grupo Controle.

A IL-1 $\beta$  é uma citocina pró-inflamatória potente, crucial para as respostas de defesa do hospedeiro a infecção, é uma das principais moléculas a serem produzidas e liberadas pelo inflamossoma NLRP3 via caspase-1, a partir do reconhecimento do vírus (LAGE et al., 2022; DUBUISSON et al., 2021). Por mais que seu papel seja de proteger contra infecções e danos celulares, a ativação exagerada do NLRP3 leva a hiperinflamação causando e agravando assim a lesão tecidual (LAGE et al., 2022; PAN et al., 2021). Alguns estudos têm descrito a persistência do vírus no organismo como responsável por essa ativação mesmo após a fase aguda da doença (GUSEV E SARAPULTSEV 2024; CHEN et al., 2023). Validando esses achados, Bertoni et al. (2022) demonstraram que a proteína ORF3a do SARS-CoV-2 ativa o inflamossomo NLRP3 in vitro, enquanto estudo de Pan et al. (2021) demonstrou que a proteína do nucleocapsídeo (N) do SARS-CoV-2 pode interagir diretamente com o NLRP3 levando a produção e liberação de moléculas inflamatórias em camundongos. Estudos

também destacam a ativação do inflamassoma NLRP3 através do estresse intracelular e geração de ERO (TSCHOPP E SCHRODER 2010), o que evidencia um ciclo vicioso de inflamação crônica de baixo grau.

Os efeitos da ativação exagerada do inflamassoma NLRP3 no músculo esquelético pode reduzir a capacidade de reparo muscular, perda da massa e força, mialgia, dano mitocondrial e inflamação local pela liberação da IL-1 $\beta$  e IL-18 (KUMMER et al., 2023). Entretanto é muito escassos os estudos com dosagem de interleucinas em biópsias musculares de indivíduos com COVID-Longa, contudo, alguns estudos demonstram que o músculo esquelético tem a capacidade intrínseca de sintetizar IL-1 $\beta$  quando ativado por estresse ou dano, um mecanismo plausível que é sustentado pelos nossos achados (DUBUISSON et al., 2021; AMERICO-DA-SILVA et al., 2021). De acordo com Huang et al. (2017) a IL-1 $\beta$  atua diretamente nas fibras musculares, e concluem que a inibição da IL-1 $\beta$ , visando o NLRP3, pode ser útil para prevenir atrofia muscular induzida por inflamação.

Níveis séricos mais altos de IL-1 $\beta$  estão associados ao aumento da gravidade da COVID-19 e podem permitir a identificação de pacientes com maior risco de desfechos ruins (POTERE et al., 2022). De acordo com o estudo de Alonso-Dominguez et al. (2023), a IL-1 $\beta$  pode ser utilizado como marcador para sintomas pós COVID, uma vez que observaram a presença dessa interleucina 1 mês após a fase aguda da doença, enquanto outras citocinas apresentaram declínio. Esse achado justifica ausência de diferenças estatísticas na quantidade de IL-6 entre os grupos COVID-Longa e Controle, visto que as biópsias foram realizadas após semanas, e até meses da fase aguda da doença.

Entretanto, alguns estudos têm demonstrado o aumento de IL-6 no soro de pacientes com COVID-Longa quando comparado aos controles saudáveis, (SCHULTHEI et al., 2021; PELUSO et al., 2021), porém não há evidências sobre a mensuração da IL-6 diretamente no músculo esquelético no contexto de COVID-Longa. Estudos como o de Schulthei et al. (2021) e Peluso et al. (2021) encontraram níveis elevados de citocinas, como IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF e IP10 em soro de indivíduos com COVID-Longa.

A IL-1 $\beta$  e a IL-6 têm papéis distintos na inflamação, o que pode justificar o fato de ter sido encontrado aumento de IL-1 $\beta$  no músculo de indivíduos com COVID-Longa, enquanto que para IL-6 não foi observado o mesmo. A IL-1 $\beta$  é uma citocina chave na ativação da inflamação local, atuando diretamente nos tecidos afetados,

como por exemplo os músculos, enquanto, a IL-6 é uma citocina frequentemente encontrada no sangue, mas nem sempre nos tecidos afetados (ALIYU et al., 2022; UNVER 2018). De qualquer forma, tanto a inflamação local como a sistêmica, podem promover danos musculares (GUSEV E SARAPULTSEV 2024) e podem ser responsáveis pelos sintomas musculares persistentes na COVID-Longa.

### 6.5 Regeneração muscular prejudicada no músculo vasto lateral de humanos com COVID-Longa

Os danos musculares ocasionados pela inflamação e estresse oxidativo ocasionam em estímulos para a ativação de CS, as quais são responsáveis pela reparação das fibras musculares danificadas e manutenção do músculo esquelético (CARECCIA et al., 2024; FOSCHINI et al., 2004). Essas células são mononucleadas, fusiformes e estão localizadas na periferia das fibras musculares, entre a lâmina basal e o sarcolema (CARECCIA et al., 2024).

Enquanto o tecido muscular mantém-se livre de danos, as CS permanecem em estado de quiescência, entretanto são ativadas em resposta a estímulos (FOSCHINI et al., 2004). Durante o estado de quiescência e ativação, as CS expressam o fator de transcrição Pax7, após ativação as CS migram para o local da lesão onde proliferam pela alta expressão de MyoD e Myf-5. A próxima etapa é a diferenciação, a qual é marcada pela regulação negativa de Pax7 e pela regulação positiva de Mrf4 e Miogenina, e por fim, as CS diferenciam-se em novas miofibras multinucleadas ou se fundem às miofibras danificadas (SIGOLI et al., 2021; FOSCHINI et al., 2004; KACZMAREK et al., 2021).

No presente estudo foi investigado por meio da técnica de imunofluorescência, as CS na sua fase de quiescência e ativação por meio do marcador Pax7 e as CS na sua fase de diferenciação por meio do marcador miogenina, e com isso observamos aumento de Pax7 no grupo COVID-Longa em comparação ao grupo controle, enquanto para miogenina observamos a redução no grupo COVID-Longa quando comparado ao grupo controle. Nossa hipótese é que o aumento de Pax7 reflete em maior ativação e acúmulo de CS em uma tentativa de regeneração, porém não estariam transicionando e completando a diferenciação, indicado pela redução da miogenina, resultando assim, em uma regeneração incompleta.

Um estudo de Mayer et al. (2024) realizou biópsias do músculo vasto lateral de pacientes que sobrevivem à internação na UTI por COVID-19, e encontraram maior abundância de macrófagos semelhantes a M2 e CS, quantificadas através de Pax7, os mesmos associam os achados com a alta prevalência de fraqueza, fadiga e capacidade de exercício funcional reduzida nos pacientes. Os estudos com CS e COVID-19 são escassos e não há estudos que investigam essas células em pacientes que tiveram a forma leve ou moderada da doença. Entretanto, estudos como He et al. (2013) e Shirakawa et al. (2021), demonstram que quadros inflamatórios crônicos, como na caquexia induzida por câncer, aumentam Pax7 e inibem a expressão de miogenina por meio da TNF- $\alpha$  e NF- $\kappa$ B, o que bloqueia a diferenciação miogênica. De acordo com Akhmedov et al. (2013), é possível também que, na inflamação crônica, a coordenação normal entre macrófagos e CS musculares seja prejudicada e contribua para o comprometimento da função das CS.

O aumento da IL-1 $\beta$  no grupo COVID-Longa visto anteriormente também pode estar relacionado com a inibição da diferenciação celular, um estudo que confirma essa relação é de Cohen et al. (2015), seus achados destacam que a IL-1 $\beta$  inibe a diferenciação muscular em modelos com distrofia muscular, os mesmos utilizaram bloqueadores para IL-1 $\beta$  o que reverteu o efeito inibitório, confirmando seu impacto negativo na fusão e diferenciação celular. Contudo, mais estudos precisam ser realizados para elucidação dos processos que impactam na diferenciação das CS em pacientes com COVID-Longa, uma vez que esse comprometimento da regeneração pode contribuir para os sintomas musculoesqueléticos apresentados por esses pacientes.

## 6.6 Ausência de alteração nos biomarcadores CK e LDH em humanos com COVID-Longa

A CK é uma enzima encontrada em vários tecidos como coração, cérebro e músculo esquelético, no qual níveis elevados no sangue servem como um marcador para dano muscular, e no caso da COVID-19 é considerada um marcador para a gravidade da doença, sobretudo a progressão clínica que pode ser monitorizada através dos níveis de CK (MALIK et al., 2020). Estudos mostram que níveis elevados de CK estão associados com um pior desfecho em pacientes hospitalizados, incluindo

necessidade de intubação, UTI e óbito (AKBAR et al., 2021; ZINELLU et al., 2021; ORSUCCI et al., 2021).

O mesmo ocorre para o LDH, em que estudos como o de Han et al. (2020) descrevem uma forte correlação do LDH com a gravidade da doença e com danos pulmonares. Malik et al. (2020) também demonstram que níveis mais elevados de LDH estão significativamente associados à gravidade durante a hospitalização e a mortalidade em diferentes períodos. A LDH é uma enzima que está presente nos tecidos por todo o corpo e tem um papel central no metabolismo energético, participando da conversão de piruvato em lactato, uma reação importante durante situações de hipóxia, níveis anormais de LDH podem resultar na diminuição da oxigenação, levando a uma regulação positiva da via glicolítica e de lesões de múltiplos órgãos (MALIK et al., 2020; XIE et al., 2015).

Pacientes graves que se recuperaram da COVID-19, podem apresentar aumento de CK e LDH na fase de COVID-Longa (PAHARIA et al, 2022; UDEH et al., 2023), entretanto o presente estudo quis investigar esses biomarcadores em pacientes que tiveram a forma leve e moderada da doença, ou seja, que não precisaram de hospitalização. Nossos resultados não mostram diferença significativa para CK e nem LDH entre os grupos COVID-Longa e Controle. Embora conseguimos observar uma tendência maior nos níveis de CK no grupo COVID-Longa em relação ao controle, os resultados não foram estatísticos.

#### 6.7 Alteração no pico de torque e na frequência média do sinal eletromiográfico em humanos com COVID-Longa

Através do dinamômetro isocinético (Biodex) conseguimos definir o PT, ou seja, o maior valor de força rotacional que o músculo consegue produzir durante um movimento, (TAYLOR et al., 1991; JOKIEL et al., 2024) muito utilizado em reabilitações, esporte e pesquisas como o presente estudo que buscou investigar os efeitos da COVID-19 na musculatura esquelética. Na comparação do PT do grupo COVID-Longa com o grupo controle, não encontramos diferenças significativas entre os grupos, mesmo observando uma tendência maior nas colunas do grupo COVID-Longa, assim como, quando realizamos comparações entre as três contrações isométricas dentro dos grupos, não observamos diferenças no grupo Controle, no entanto, encontramos aumento do pico de torque no grupo COVID-Longa, o que pode

parecer contra intuitivo, no entanto esse resultado pode ser explicado por alguns fatores.

Um deles é que o grupo controle, foi composto totalmente por mulheres, enquanto o grupo COVID-Longa foi composto por homens e mulheres, de acordo com a literatura os homens apresentam maior força e torque em comparação às mulheres. (LINDLE et al., 1997; YASUDA et al., 2005; KRITZER et al., 2024). Outra hipótese é de que tenha ocorrido alterações compensatórias e uma reorganização nas fibras musculares, ou seja, uma redução de fibras tipo I pode ter levado ao maior uso das fibras tipo II, que são mais explosivas o que favorece picos de torque mais altos mesmo em exercícios isométricos (HEJBØL et al., 2022; BELTMAN et al., 2004; YOUNG., 1984). De acordo com Muddle et al. (2018) conforme o nível de força aumenta as fibras tipo II são recrutadas, portanto o que pode ter acontecido, é que nos participantes COVID-Longa as fibras tipo II foram recrutadas precocemente devido a ineficiência das fibras tipo I, achado que é respaldado por Hejbøl et al. (2022) que descreveram a atrofia das fibras tipo I em pacientes COVID-Longa. Resultados paralelos, ainda não publicados, obtidos em nosso laboratório, relacionados aos tipos de fibras musculares, mostraram um comprometimento do trofismo das FTI dos participantes com Covid-Longa.

Concomitantemente, uma diminuição da frequência média do sinal eletromiográfico no músculo vasto lateral foi observada no decorrer das sessões no grupo COVID-Longa o que indica fadiga neuromuscular progressiva. Embora o grupo COVID-Longa esteja conseguindo gerar maior torque por mecanismos compensatórios, a diminuição de frequência média ao longo das sessões sugere que esse esforço é insustentável, podendo levar a fadiga precoce e declínio da função neuromuscular com o tempo (RETORNAZ et al., 2022; KOWAL et al., 2024; AGERGAARD., 2023). No entanto, não foi possível observar o mesmo resultado para o músculo reto femoral, uma explicação é a diferença funcional, anatômica e de recrutamento desses músculos durante exercício de extensão isométrica do joelho, onde uma hipótese é que o músculo vasto lateral esteja sendo mais recrutado e exigido, pois são um dos principais extensores do joelho quando o quadril está flexionado (posição realizada no teste), o que implica maior suscetibilidade a fadiga e menor frequência média (PINCIVERO et al., 2006; BARONI et al., 2013).

Embora o protocolo isométrico utilizado (3 x 5 segundos com 2 minutos de intervalo) não seja tipicamente suficiente para induzir fadiga significativa em adultos

saudáveis como visto nas análises com o grupo o controle, para os indivíduos com COVID-Longa foi suficiente, este achado pode refletir uma menor capacidade de recuperação e maior suscetibilidade à fadiga neuromuscular, o que pode explicar os sintomas relatados de fadiga e intolerância ao exercício físico.

### 6.8 Limitações do estudo

Uma das principais limitações deste estudo foi o tamanho reduzido dos participantes no grupo controle quando comparado ao grupo COVID-Longa em algumas análises. Isso ocorreu devido ao contexto pandêmico vigente durante o período de coleta, na qual grande parte da população já havia sido infectada pelo SARS-CoV-2 dificultando o recrutamento de indivíduos elegíveis como controle, além disso, as pessoas dispostas a realização de biópsias musculares representaram um desafio adicional, considerando a natureza invasiva do procedimento e a baixa adesão geralmente observada em estudos desse tipo. Estudos futuros com maior amostragem são recomendados para reforçar os dados obtidos.

### 6.9 Implicações clínicas

Diante dos achados deste estudo, torna-se essencial o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e reabilitações voltadas a inflamação crônica de baixo grau, redução do estresse oxidativo e melhora da função regenerativa do músculo em pacientes com sintomas musculares persistentes. Além disso, os resultados contribuem para futuros estudos e o avanço dos conhecimentos sobre as consequências musculares na COVID-19, principalmente em pacientes que tiveram a forma leve e moderada da doença. Portanto o presente estudo pode contribuir no direcionamento de futuras investigações que possam testar intervenções para restaurar a integridade e funcionalidade muscular desses pacientes.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

A presente tese investigou de forma integrada os efeitos da infecção pelo SARS-CoV-2 sobre os aspectos morfológicos, bioquímicos e funcionais do músculo

Vasto Lateral em humanos que tiveram a forma leve e moderada da doença, com persistência dos sintomas musculares. Os resultados revelaram que, mesmo após a fase aguda da infecção, indivíduos com histórico de COVID-19 apresentaram alterações musculares significativas, caracterizadas por aumento da inflamação local (IL-1 $\beta$ ), do estresse oxidativo (ERO), da presença de células satélites em ativação (Pax7) e da centralização nuclear, além de redução de células satélites em diferenciação (miogenina), óxido nítrico (ON) e capilarização, evidenciando um ambiente muscular desfavorável. No aspecto funcional, foi observado aumento do pico de torque ao longo das sessões de contração isométrica, porém acompanhado de redução da frequência média no sinal eletromiográfico, sugerindo possíveis mecanismos compensatórios na ativação neuromuscular. As alterações histológicas reforçam a presença de um processo de remodelação muscular ainda em curso, com impacto potencial na capacidade funcional e no desempenho físico desses indivíduos.

Sendo assim, concluímos que a infecção pelo SARS-CoV-2 pode desencadear efeitos duradouros na estrutura e função muscular, mesmo em indivíduos não hospitalizados.

A compreensão dessas alterações contribui para o reconhecimento da COVID-Longa como uma condição com implicações musculares importantes, e reforça a necessidade de estratégias terapêuticas individualizadas, bem como de acompanhamento clínico e funcional prolongado.

---

## REFERÊNCIAS

---

- ABDELRAHMAN, Z.; LI, M.; WANG, X. Comparative review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A respiratory viruses. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 2020.
- ABDULLAHI, A.; CANDAN, S. A.; ABBA, Muhammad Aliyu. Neurological and musculoskeletal features of COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Neurology**, v. 11, jun. 2020.
- ABU-RUMEILEH, S.; ABDELHAK, A.; FOSCHI, M.; TUMANI, H.; OTTO, M. Guillain-Barré syndrome spectrum associated with COVID-19: an up-to-date systematic review of 73 cases. **Journal of Neurology**, v. 268, n. 4, p. 1133-1170, 2021.
- AGERGAARD, J.; LETH, S.; PEDERSEN, T. H.; HARBO, T.; BLICHER, J. U.; KARLSSON, P.; ØSTERGAARD, L.; ANDERSEN, H.; TANKISI, H. Myopathic changes in patients with long-term fatigue after COVID-19. **Clinical Neurophysiology**, v. 132, n. 8, p. 1974-1981, 2021.
- AHMAD, I.; RATHORE, F. A. Neurological manifestations and complications of COVID-19: a literature review. **Journal of Clinical Neuroscience**, v. 77, p. 8-12, 2020.
- AKBAR, N.; ALI, M. K.; ANSARI, S. A.; MALIK, I.; HUSSAIN, M.; KHAN, A.; TAHIR, H.; KHAN, M. B. Elevated creatine kinase as a predictor of poor outcomes in hospitalized COVID-19 patients: a retrospective cohort study. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 18, p. 4101, 2021.
- AKHMEDOV, D.; BERDEAUX, R. The effects of obesity on skeletal muscle regeneration. **Frontiers in Physiology**, v. 4, dez. 2013.
- ALBUQUERQUE, A. S.; SILVA, J. R.; SOUZA, M. T.; MENEZES, R. O.; FIGUEIREDO, F. B.; SOUSA, D. H.; NASCIMENTO, L. P. Cytokine storm in COVID-19: pathogenesis and potential therapeutic interventions. **Life Sciences**, v. 277, p. 119344, 2021.
- AL-RAMADAN, A.; RABAB'H, O.; SHAH, J.; GHARAIBEH, A. Acute and post-acute neurological complications of COVID-19. **Neurology International**, v. 13, n. 1, p. 102-119, 2021.
- ALONSO-DOMÍNGUEZ, J.; GALLEGO-RODRÍGUEZ, M.; MARTÍNEZ-BARROS, I.; LÓPEZ-VALVERDE, A.; GARCÍA-SÁNCHEZ, A.; FERNÁNDEZ-LIZANA, C.; et al. High levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and MIP-1 $\alpha$  one month after the onset of the acute SARS-CoV-2 infection, predictors of post COVID-19 in hospitalized patients. **Microorganisms**, v. 11, n. 10, 2023.
- ALSHEBRI, M. S. Neurological complications of SARS-CoV, MERS-CoV, and COVID-19. **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 11, jan. 2020, p. 2037-2047.
- ALKHOULI, M.; SANNAD, A.; ELJERF, N.; MUKHERJEE, R.; SHEKHAWAT, G. S.; ZIA, U.; et al. Sex differences in COVID-19 outcomes in the United States: analysis of a large hospital-based database. **American Journal of Preventive Medicine**, v. 60, n. 3, p. 335-339, 2020.

ALIYU, M. H.; ABDULLAH, M. M.; ABDULKADIR, I. A.; USMAN, S.; MUHAMMAD, B.; ABUBAKAR, A.; BELLO, S. The role of interleukin-6 in inflammatory diseases and COVID-19. **Journal of Inflammation Research**, v. 15, p. 1949–1967, 2022.

AMÉRICO-DA-SILVA, L.; AGUILERA, J.; QUINTEROS-WALTEMATH, O.; BARROS, M.; BARTOLOMEU, R.; MENDES, C. E.; VASCONCELOS, L.. Activation of the NLRP3 inflammasome increases the IL-1 $\beta$  level and decreases GLUT4 translocation in skeletal muscle during insulin resistance. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 19, 2021.

AMENTA, E.; SPOTO, S.; RICCARDI, N.; COLANERI, M.; BRUZZONE, B.; PACE, L.; et al. Postacute COVID-19: an overview and approach to classification. **Open Forum Infectious Diseases**, v. 7, n. 12, ofaa509, 2020.

ANDALIB, S.; BILLER, J.; DI NAPOLI, M.; MOGHIMI, N.; MCCULLOUGH, L. D.; RUBINOS, C. A.; MOHAMMED, I. B.; et al. Peripheral nervous system manifestations associated with COVID-19. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 21, n. 3, 2021.

ANDERSON, J. E. A role for nitric oxide in muscle repair: nitric oxide-mediated activation of muscle satellite cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 11, p. 1859-1874, 2000.

ANTONELLI, M.; PENNISI, L. F.; BROWNE, D.; HOFFMAN, K. L.; RAMAN, B.; COKER, Z.; et al. Risk factors and disease profile of post-vaccination SARS-CoV-2 infection in UK users of the COVID Symptom Study app: a prospective, community-based, nested, case-control study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 1, p. 43–55, 2022.

ASCHMAN, T.; WYLER, E.; BAUM, O.; HENTSCHEL, A.; RUST, R.; LEGLER, F.; PREUSSE, C.; SCHWAB, C.; SCHWAB, N.; KUNZ, A. B.; SCHULZ, M.; SCHULZ, T.; KLEIN, C.; MEYER, T.; et al. Post-COVID exercise intolerance is associated with capillary alterations and immune dysregulations in skeletal muscles. **Acta Neuropathologica Communications**, v. 11, n. 1, 2023.

AYOUBKHANI, D.; BOSWELL, M.; JOHNSON, M.; BOGDANOVA, V.; WALKER, A.; COYNE, K.; HARRISON, J.; EVANS, J.; KHAIR, M.; EVANS, H.; TOMLINSON, J.; et al. Risk of post-acute sequelae of COVID-19 after vaccination: retrospective cohort study. **medRxiv**, 2022.

BAJ, J.; KARAKUŁA-JUCHNOWICZ, H.; TERESIŃSKI, G.; BUSZEWICZ, G.; NOWAKOWSKA, K.; FORMINSKI, B.; PORTALSKA, K.; PRZYWARA, P.; ROGOWSKA, W.; ROGOWSKI, M.; FLIEGER, J. COVID-19: specific and non-specific clinical manifestations and symptoms: the current state of knowledge. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n. 6, p. 1753, 2020.

BALDELLI, S.; CICCARONE, F.; LIMONGI, D.; CHECCONI, P.; PALAMARA, A. T.; CIRIOLO, M. R.. Glutathione and nitric oxide: key team players in use and disuse of skeletal muscle. **Nutrients**, v. 11, n. 10, 2019.

BARONI, B. M.; GEREMIA, J. M.; RODRIGUES, R.; DE SOUZA, L. A.; VIEIRA, A.; BIEGELMEYER, D.; DOS SANTOS, G. M.; VIEIRA, A. Muscle architecture adaptations to knee extensor eccentric training: rectus femoris vs. vastus lateralis. **Muscle & Nerve**, v. 48, n. 4, p. 498–506, 2013.

BATUR, E. B.; KOREZ, M. K.; GEZER, I. A.; LEVENDOGLU, F.; URAL, O. Musculoskeletal symptoms and relationship with laboratory findings in patients with COVID-19. **International Journal of Clinical Practice**, v. 75, n. 6, p. 1-7, 2021.

BELTMAN, J. G. M.; DE HAAN, A.; HAAN, H.; GERRITS, H. L.; VAN MECHELEN, W.; SARGEANT, A. J. Metabolically assessed muscle fibre recruitment in brief isometric contractions at different intensities. **European Journal of Applied Physiology**, v. 92, n. 4-5, p. 485-492, 2004.

BERTONI, A.; SMITH, J.; LIMA, R.; FONSECA, C.; SANTOS, F.; BORGES, M.; COSTA, G.; RODRIGUES, L. Spontaneous NLRP3 inflammasome-driven IL-1 $\beta$  secretion is induced in severe COVID-19 patients and responds to anakinra treatment. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 150, n. 3, p. 796–805, 2022.

BOŻYCKI, Ł.; SIERZPUTOWSKI, J.; RYDZYŃSKA, M.; KACZMAREK, P.; CHMIELEWSKI, D.; BRYNDAL, A. Calcium dysregulation and muscle cell damage: implications for muscular dystrophies. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 39, n. 4, p. 245–258, 2018.

BROUSSARD, S. R.; MCCUSKER, R. H.; NOVAKOFSKI, J. E.; STRLE, K.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W.; DANTZER, R.; KELLEY, K. W. IL-1 $\beta$  impairs insulin-like growth factor I-induced differentiation and downstream activation signals of the insulin-like growth factor I receptor in myoblasts. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 12, p. 7713-7720, 2004.

BRÜSSOW, H.; TIMMIS, K. COVID-19: long covid and its societal consequences. **Environmental Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 4077–4091, Aug. 2021.

BURN, E.; TEBÉ, C.; FERNANDEZ-BERTOLIN, S.; ARAGON, M.; RECALDE, M.; ROEL, E.; PRATS-URIBE, A.; PRIETO-ALHAMBRA, D.; DUARTE-SALLES, T. The natural history of symptomatic COVID-19 during the first wave in Catalonia. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1-12, 2021.

CARECCIA, G.; MANGIAVINI, L.; CIRILLO, F.. Regulation of satellite cells functions during skeletal muscle regeneration: a critical step in physiological and pathological conditions. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, 2024.

CHARLTON, B. T.; GOULDING, R. P.; JASPERS, R. T.; APPELMAN, B.; VAN VUGT, M.; WÜST, R. C. I. Skeletal muscle adaptations and post-exertional malaise in long COVID. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 2024.

CHEN, B.; JULG, B.; MOHANDAS, S.; BRADFUTE, S. B. Viral persistence, reactivation, and mechanisms of long COVID. **eLife**, v. 12, 2023.

CHEN, Y. F.; LEE, C. W.; WU, H. H.; LIN, W. T.; LEE, O. K. Immunometabolism of macrophages regulates skeletal muscle regeneration. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 10, 2022.

CHIOH, F. W.; FONG, S. W.; YOUNG, B. E.; BAO, L.; LEE, C. W.; YI, Y. W.; LEE, B. Z.; LIM, S. Y.; ZHU, F. M.; NEO, P. E.; KHOO, C. M.; LEE, B.; VADREVU, S.; AZIZ, A. B.; TAN, G. E.; LIM, P. Y.; et al. Convalescent COVID-19 patients are susceptible to endothelial dysfunction due to persistent immune activation. **eLife**, v. 10, art. e64909, 2021.

- CIPOLLARO, L.; GIORDANO, L.; PADULO, J.; OLIVA, F.; MAFFULLI, N. Musculoskeletal symptoms in SARS-CoV-2 (COVID-19) patients. **Journal of Orthopaedic Surgery and Research**, v. 15, n. 1, 2020.
- CLOSE, G. L.; KAYANI, A.; VASILAKI, A.; MCARDLE, A. Skeletal muscle damage with exercise and aging. **Sports Medicine**, v. 35, n. 5, p. 413-427, 2005.
- COELHO, E. B. S.; BOLSONI, C. C.; WARMLING, D.; CONCEIÇÃO, T. B.; CAMPOS, D. A. Orientações sobre a COVID-19 na Atenção Especializada. Florianópolis: Universidade Federal de Santa Catarina, **UNA-SUS**, 2020. 49 p. Disponível em: <https://www.unasus.gov.br/cursos/curso/46162>. Acesso em: 26 ago. 2025.
- COHEN, T. V.; MANY, G. M.; FLEMING, B. D.; GNOCCHI, V. F.; GHIMBOVSCHI, S.; MOSSER, D. M.; HOFFMAN, E. P.; PARTRIDGE, T. A. Upregulated IL-1 $\beta$  in dysferlin-deficient muscle attenuates regeneration by blunting the response to pro-inflammatory macrophages. **Skeletal Muscle**, v. 5, n. 1, 2015.
- COOKE, J. P.; LOSORDO, D. W. Nitric oxide and angiogenesis. **Circulation**, v. 105, n. 18, p. 2133-2135, 2002.
- CORNACHIONE, A.; CACAO-BENEDINI, L. O.; SHIMANO, M. M.; VOLPON, J. B.; MARTINEZ, E. Z.; MATTIELLO-SVERZUT, A. C. Morphological comparison of different protocols of skeletal muscle remobilization in rats after hindlimb suspension. **Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports**, v. 18, n. 4, p. 453-461, 2008.
- CORNELL UNIVERSITY ERGONOMICS WEB. Cornell Musculoskeletal Discomfort Questionnaires (CMDQ). **Cornell University**, p. 1-2, 2021.
- CYR, A. R.; HUCKABY, L. V.; SHIVA, S. S.; ZUCKERBRAUN, B. S. Nitric oxide and endothelial dysfunction. **Critical Care Clinics**, v. 36, n. 2, p. 307-321, 2020.
- DA C. MENEZES COSTA, L.; MAHER, C. G.; MCAULEY, J. H.; HANCOCK, M. J.; OLIVEIRA, W. D. M.; et al. 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.
- DANESINI, P. C.; HEIM, M.; TOMALKA, A.; SIEBERT, T.; ATES, F. Endomysium determines active and passive force production in muscle fibers. **Journal of Biomechanics**, v. 168, 2024.
- DAVIS, H. E.; ASSAF, G. S.; MCCORKELL, L.; WEI, H.; LOW, R. J.; RE'EM, Y.; REDFIELD, S.; AUSTIN, J. P.; AKRAMI, A. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. **eClinicalMedicine**, v. 38, 2021.
- DAVIS, H. E.; MCCORKELL, L.; MOORE VOGEL, J.; TOPOL, E. J. Long COVID: major findings, mechanisms and recommendations. **Nature Reviews Microbiology**, v. 21, n. 3, p. 133-146, 2023.
- DE SOUZA, W. M.; BUSS, L. F.; CANDIDO, D. S.; CARRERA, J. P.; et al. Epidemiological and clinical characteristics of the COVID-19 epidemic in Brazil. **Nature Human Behaviour**, v. 4, n. 8, p. 856-865, 2020.
- DI GIROLAMO, F. G.; FIOTTI, N.; SISTO, U. G.; NUNNARI, A.; COLLA, S.; MEARELLI, F.; VINCI, P.; SCHINCARIOL, P.; BIOLO, G. Skeletal Muscle in Hypoxia

and Inflammation: Insights on the COVID-19 Pandemic. **Frontiers in Nutrition, Lausanne**, v. 9, art. 865402, 22 abr. 2022.

DISER, N. P.; DE MICHELI, A. J.; SCHONK, M. M.; KONNARIS, M. A.; PIACENTINI, A. N.; EDON, D. L.; TORESDAHL, B. G.; RODEO, S. A.; CASEY, E. K.; MENDIAS, C. L. Musculoskeletal consequences of COVID-19. **Journal of Bone and Joint Surgery – American Volume**, v. 102, p. 1197-1204, 2020.

DIKALOV S., GRIENDLING K. K., Harrison D. G. Measurement of reactive oxygen species in cardiovascular studies. **Hypertension** 49, 717–727, 2007.

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 Materials**, v. 13, 2022.

DUBUISSON, N.; VERSELE, R.; DAVIS-LÓPEZ DE CARRIZOSA, M. A.; SELVAIS, C. M.; BRICHARD, S. M.; ABOU-SAMRA, M. Walking down skeletal muscle lane: from inflammasome to disease. **Cells**, v. 10, n. 11, 2021.

DUBUISSON, N.; VERSELE, R.; PLANCHON, C.; SELVAIS, C. M.; NOEL, L.; ABOU-SAMRA, M.; DAVIS-LÓPEZ DE CARRIZOSA, M. A. Histological methods to assess skeletal muscle degeneration and regeneration in Duchenne muscular dystrophy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 24, 2022.

ELIJAALY, S.; KHALIL, H. E.; AHMED, M. F.; et al. Cytokine storm and oxidative stress in COVID-19: potential role of antioxidants. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, p. 707051, 2021.

EL JADDAOUI, I.; HAMDI, S.; AL IDRISSE, N. et al. SARS-CoV-2 transmission pathways within the indoor environment. **Safety in Health**, v. 11, n. 1, p. 1-17, 2025.

ERIKSSON, A.; LINDSTRÖM, M.; CARLSSON, L.; THORNELL, L. E.. Hypertrophic muscle fibers with fissures in power-lifters: fiber splitting or defect regeneration? **Histochemistry and Cell Biology**, v. 126, n. 4, p. 409-417, 2006.

EVCİK, D. Musculoskeletal involvement: COVID-19 and post COVID-19. **Turkish Journal of Physical Medicine and Rehabilitation**, v. 69, n. 1, p. 1-7, 2023.

FARA, A.; MITREV, Z.; ROSALIA, R. A.; ASSAS, B. M. Cytokine storm and COVID-19: a chronicle of pro-inflammatory cytokines: Cytokine storm: The elements of rage! **Open Biology**, v. 10, n. 9, 2020.

FENG, Y.; LING, Y.; BAI, T.; XIE, Y.; HUANG, J.; LI, J.; XIONG, W.; YANG, D.; CHEN, R.; et al. COVID-19 with different severities: A multicenter study of clinical features. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 201, n. 11, p. 1380-1388, 2020.

FERNÁNDEZ-DE-LAS-PEÑAS, C.; PALACIOS-CEÑA, Do.; GÓMEZ-MAYORDOMO, V.; CUADRADO, M. L.; FLORENCIO, L. L. Defining post-covid symptoms (Post-acute covid, long covid, persistent post-covid): An integrative classification. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 18, n. 5, p. 1-9, 2021.

FERRANDI, P. J.; ALWAY, S. E.; MOHAMED, J. S. The interaction between SARS-CoV-2 and ACE2 may have consequences for skeletal muscle viral susceptibility and myopathies. **Journal of Applied Physiology**, v. 129, n. 4, p. 864-867, 2020.

- FLÜCK, M.; HOPPELER, H. Molecular basis of skeletal muscle plasticity— from gene to form and function. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, v. 146, p. 159-216, 2003.
- FOSCHINI, M.; ZANCONATO, S.; SARTORE, S. Satellite cell activation and muscle regeneration in humans. **Muscle & Nerve**, v. 29, n. 2, p. 174–179, 2004.
- FRONTERA, W. R. Aging of skeletal muscle fibers. **Annals of Rehabilitation Medicine**, Seul, v. 39, n. 2, p. 155-162, abr. 2015.
- GIUSTARINI D.; DALLE-DONNE I.; COLOMBO R.; MILZANI A.; ROSSI R. Adaptation of the Griess reaction for detection of nitrite in human plasma. **Free Radic Res**.Nov;38(11):1235-40, 2004.
- GODLEE, F. Living with Covid-19. **BMJ**, v. 370, 2020.
- GREENHALGH, T.; KNIGHT, M.; A’COURT, C.; BUXTON, M.; HUSAIN, L. Management of post-acute covid-19 in primary care. **The BMJ**, v. 370, p. 1-8, 2020.
- GU, J.; LIU, Q.; ZHANG, J.; XU, S. COVID-19 and trained immunity: the inflammatory burden of long covid. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.
- GUO, Y. R.; CAO, Q. D.; H., Z. Si; TAN, Y. Y.; et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak— An update on the status. **Military Medical Research**, v. 7, n. 1, 2020.
- GUSEV, E.; SARAPULTSEV, A. Exploring the pathophysiology of long COVID: The central role of low-grade inflammation and multisystem involvement. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 12, 2024.
- GUTTERIDGE, J. M. C.; HALLIWELL, Barry. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 502, n. 2, p. 183–186, jul. 2018.
- HARTENIAN, E.; JACKSON, R.; BHATIA, S.; BAILEY, K.; et al. The molecular virology of coronaviruses. **Journal of Biological Chemistry**, 2020.
- HAN, Y.; YANG, H.; HONG, L.; LI, J.; WANG, P.; ZHAO, X.; et al. Lactate dehydrogenase, a risk factor of severe COVID-19 patients. **medRxiv**, 2020.
- HAN, Hui; LUO, Rong Hua; LONG, Xin Yan; WANG, Li Qiong; ZHU, Qian; TANG, Xin Yue; ZHU, Rui; MA, Yi Cheng; ZHENG, Yong Tang; ZOU, Cheng Gang. Transcriptional regulation of SARS-CoV-2 receptors ACE2 by SP1. **eLife**, v. 13., 2024.
- HE, W.; BARAK, Y.; HEINEMAN, F.; SMITH, A.; MILLER, B.; et al. Tumor necrosis factor- $\alpha$  induces Pax7 expression and inhibits myogenic differentiation through NF- $\kappa$ B signaling pathway in cachexia. **Journal of Cellular Physiology**, v. 228, n. 4, p. 828–838, 2013.
- 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.
- HEJBØL, E. K.; HARBO, T.; AGERGAARD, J.; MADSEN, L. B.; PEDERSEN, T. H.; ØSTERGAARD, L. J.; ANDERSEN, H.; SCHRØDER, H. D.; TANKISI, H. Myopathy as a cause of fatigue in long-term post-COVID-19 symptoms: Evidence of skeletal muscle histopathology. **European Journal of Neurology**, v. 29, n. 9, p. 2832-2841, 2022.

HELENO, S. A.; CAROCHO, M.; REIS, F. S.; PIRES, T. C. S. P.; PINTADO, M.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L. Plant Extracts and SARS-CoV-2: Research and Applications. **Life**, v. 13, n. 2, p. s.p., 2023.

HENRINA, J.; PUTRA, I. C. S.; LAWRENSIA, Sherly; HANDOYONO, Quinta Febryani; CAHYADI, Alius. Coronavirus Disease of 2019: a Mimicker of Dengue Infection? **SN Comprehensive Clinical Medicine**, v. 2, n. 8, p. 1109-1119, 2020.

HOFMANN, H.; ÖNDER, A.; BECKER, J.; GRÖGER, M.; MÜLLER, M.; ZINK, F.; STEIN, B.; RADERMACHER, P.; WALLER, C. Markers of oxidative stress during post-COVID-19 fatigue: a hypothesis-generating, exploratory pilot study on hospital employees. **Frontiers in Medicine**, v. 10, n. n.s., p. s.p., 2023.

HUMPHREYS, H.; WANG, S.; RAINES, D.; MILLER, J.; THOMAS, K.; et al. Long COVID and the role of physical and rehabilitation medicine. **Journal of Rehabilitation Medicine**, v. 53, n. 1, p. jrm00115, 2021.

HUANG, N.; KNY, M.; RIEDIGER, F.; HOFFMAN, T.; JONES, L.; et al. Deletion of Nlrp3 protects from inflammation-induced skeletal muscle atrophy. **Intensive Care Medicine Experimental**, v. 5, n. 1, p. 3, 2017.

HYATT, H. W.; POWERS, S. K. Mitochondrial dysfunction is a common denominator linking skeletal muscle wasting due to disease, aging, and prolonged inactivity. **Antioxidants**, v. 10, n. 4, p. s.p., 2021.

JAMIESON, A.; WILSON, B.; TAYLOR, M.; JOHNSON, C.; et al. Mechanisms underlying exercise intolerance in long COVID: an accumulation of multisystem dysfunction. **Physiological Reports**, v. 12, n. 3, e15940, feb. 2024.

JACKSON, C. B.; FARZAN, M.; CHEN, B.; CHOE, H. Mechanisms of SARS-CoV-2 entry into cells. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 23, n. 1, p. 3-20, 2022.

JIN, J. M.; BAI, P.; HE, W.; LIU, S.; CHEN, X.; et al. Gender differences in patients with COVID-19: focus on severity and mortality. **Frontiers in Public Health**, v. 8, p. 152, 2020.

JOKIEL, M.; KAZMIERCZAK, K.; CZARNECKI, P.; BARTKOWIAK-GRACZYK, A.; KOWALSKI, T.; et al. Biomechanical Examination of Wrist Flexors and Extensors with Biodex System Dynamometer—Isometric, Isokinetic and Isotonic Protocol Options. **Medicina (Lithuania)**, v. 60, n. 7, p. s.p., 2024.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J.; KELLY, P. *Histologia Básica*. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 432 p, 2017.

KACEM, I.; GHARBI, A.; HARIZI, C.; SOUISSI, E.; SAFER, M.; NASRI, A.; LETAIEF, Hajer; et al. Characteristics, onset, and evolution of neurological symptoms in patients with COVID-19. *Periódico desconhecido*, v. v.s., n. n.s., p. s.p., 2021.

KACZMAREK, Agnieszka; KACZMAREK, Mateusz; CIAŁOWICZ, Maria; CLEMENTE, F. M.; WOLAŃSKI, P.; BADICU, G.; MURAWSKA-CIAŁOWICZ, E. The role of satellite cells in skeletal muscle regeneration—the effect of exercise and age. **Biology**, v. 10, n. 10, p. s.p., 2021.

KATZ, J.; MELZACK, R.; TURK, D. C.; MELZACK, R. The McGill Pain Questionnaire: Development, psychometric properties, and usefulness of the long-form, short-form, and short-form-2. **Handbook of pain assessment**, v. v.s., n. n.s., p. 45-66, 2011.

- KHOJA, O.; PASSADOURO, B. S.; MULVEY, M.; DELIS, I.; ASTILL, S.; TAN, A. L.; SIVAN, M. Clinical Characteristics and Mechanisms of Musculoskeletal Pain in Long COVID. **Journal of Pain Research**, v. 15, n. n.s., p. 1729-1748, 2022.
- KIM, G. U.; KIM, M. J.; KWON, H. J.; et al. Clinical characteristics of asymptomatic and symptomatic patients with mild COVID-19. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 26, n. 7, p. 948.e1–948.e3, 2020.
- KOLIFARHOOD, G.; AGHAALI, M.; SAADATI, H. M.; TAHERPOUR, N.; RAHIMI, S.; IZADI, N.; SAEED, S.; NAZARI, H. COVID-19; a Narrative Review. **Clinical Aspects of COVID**, v. 8, n. 1, p. 41, 2020.
- KORALNIK, I. J.; TYLER, K. L. COVID-19: A Global Threat to the Nervous System. **Annals of Neurology**, v. 88, n. 1, p. 1-11, 2020.
- KOWAL, M.; MORGIEL, E.; WINIARSKI, S.; DYMAREK, R.; et al. Ebbing Strength, Fading Power: Unveiling the Impact of Persistent Fatigue on Muscle Performance in COVID-19 Survivors. **Sensors**, v. 24, n. 4, p. s.p., 2024.
- KRITZER, T. D.; LANG, C. J.; HOLMES, M. W.R.; CUDLIP, A. C. Sex differences in strength at the shoulder: a systematic review. **PeerJ**, v. 12, n. n.s., p. s.p., 2024.
- KUMAR, L.; BISEN, M.; KHAN, A.; KUMAR, P.; PATEL, S. K. S. Role of Matrix Metalloproteinases in Musculoskeletal Diseases. **Biomedicines**, v. 10, n. 10, p. s.p., 2022.
- KUMMER, K.; BERTRAM, I.; ZECHEL, S.; et al. Inflammasome in skeletal muscle: NLRP3 is an inflammatory cell stress component in inclusion body myositis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 13, p. 10675, 2023.
- LAGE, S. L.; AMARAL, E. P.; HILLIGAN, K. L.; LAIDLAW, E.; et al. Persistent Oxidative Stress and Inflammasome Activation in CD14<sup>high</sup>CD16<sup>–</sup> Monocytes From COVID-19 Patients. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. n.s., p. s.p., 2022.
- LAING, A. G.; LORENC, A.; DEL MOLINO DEL BARRIO, I.; DAS, A.; et al. A dynamic COVID-19 immune signature includes associations with poor prognosis. **Nature Medicine**, v. v.s., n. n.s., p. 1-33, 2020.
- LAMERS, M. M.; HAAGMANS, B. L. SARS-CoV-2 pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 20, n. 5, p. 270–284, 2022.
- LAMPERT, E.; METTAUER, B.; HOPPELER, H.; CHARLOUX, A.; CHARPENTIER, A.; LONSDORFER, J. Structure of skeletal muscle in heart transplant recipients. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 28, n. 4, p. 980-984, 1996.
- LAMBADIARI, V.; KATSIMIRAS, V.; PAPAMICHALIS, P.; et al. Association of COVID-19 with impaired endothelial glycocalyx, vascular function and myocardial deformation 4 months after infection. **European Journal of Heart Failure**, 2021.
- LARSEN, J. R.; MARTIN, M. R.; MARTIN, J. D.; KUHN, P.; HICKS, J. B. Modeling the Onset of Symptoms of COVID-19. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. n.s., p. s.p., 2020.
- LEUNG, T. W.; WONG, K. S.; HUI, A. C.; TO, Ka Fai; LAI, Sik To; NG, Wai Fu; NG, Ho Keung. Myopathic changes associated with severe acute respiratory syndrome: A postmortem case series. **Archives of Neurology**, v. 62, n. 7, p. 1113-1117, 2005.

LECHIEN, J. R.; CHOUVEL, P.; PEROLA, L.; et al. Clinical and epidemiological characteristics of patients with mild COVID-19. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 277, p. 2251–2261, 2020.

LEJAY A., CHOQUET P., THAVEAU F., SINGH F., SCHLAGOWSKI A., CHARLES A. L., et al. A new murine model of sustainable and durable chronic critical limb ischemia fairly mimicking human pathology. **Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.** 49, 205–212, 2015.

LIANG, L. Three-month Follow-up Study of Survivors of Coronavirus Disease 2019 after Discharge. **Journal of Korean Medical Science**, Seoul, v. 35, n. 47, e418, 2020.

LIAN, D.; CHEN, M. M.; WU, H.; DENG, S.; HU, X. The Role of Oxidative Stress in Skeletal Muscle Myogenesis and Muscle Disease. **Antioxidants**, v. 11, n. 4, p. s.p., 2022.

LINDLE R. S.; METTER E. J, LYNCH N. A, FLEG J. L, FOZARD J.L, TOBIN J, ROY T.A, HURLEY B.F. Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. **J Appl Physiol**. Nov;83(5):1581-7. 1997.

LOBATO, M. Y. F.; BORGES, J. F. T.; AZEVEDO, P. F. L.; OLIVEIRA, R.C. Relação entre estresse oxidativo e COVID-19: uma breve revisão sistemática. **Revista de Medicina**, v. 103, n. 6, p. s.p., 2024.

LU, L.; ZHONG, W.; BIAN, Z.; LI, Z.; ZHANG, K.; LIANG, B.; ZHONG, Y.; et al. A comparison of mortality-related risk factors of COVID-19, SARS, and MERS: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 81, n. 4, p. e18-e25, 2020.

MACARTHUR, D. G.; NORTH, K. N. ACTN3: A genetic influence on muscle function and athletic performance. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 35, n. 1, p. 30-34, 2007.

MADSEN, H. B.; DURHUUS, J. A.; ANDERSEN, O.; STRATEN, P. T.; RAHBECH, A.; DESLER, C. Mitochondrial dysfunction in acute and post-acute phases of COVID-19 and risk of non-communicable diseases. **npj Metabolic Health and Disease**, v. 2, n. 1, p. 36, 2024.

MAKOVICKY, P. J.; HESTER, S. A.; JENSEN, M. M.; et al. Skeletal muscle regeneration: mechanisms and therapies. **Journal of Muscle Research and Cell Motility**, v. 41, n. 3, p. 199–210, 2020.

MAISON, David P.; TASISSA, Hawi; DEITCHMAN, Amelia; PELUSO, Michael J.; DENG, Youping; MILLER, F. DeWolfe; HENRICH, Timothy J.; GERSCHENSON, Mariana. COVID-19 clinical presentation, management, and epidemiology: a concise compendium. **Frontiers in Public Health**, v. 13, 31 jan. 2025.

MALIK, P.; PATEL, U.; MEHTA, D.; et al. Biomarkers and outcomes of COVID-19 hospitalizations: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 92, n. 10, p. 2283–2294, 2020.

MANAM, A.; CHENNATH, A.; SINHA, Y.; ARYA, A.; JAIN, A. Clinical manifestations and complication of COVID-19. **Praxis Undergraduate Medical Research Journal**, v. s.n., n. s.n., p. 16-21, 2020.

MARSHALL, M. The four most urgent questions about long COVID. **Nature, London**, v. 594, n. 7862, p. 168–170, 2021.

- MAYER, K. P.; ISMAEEL, A.; KALEMA, A. G.; MONTGOMERY-YATES, A. A.; et al. Persistent fatigue, weakness, and aberrant muscle mitochondria in survivors of critical COVID-19. **Critical Care Explorations**, v. 6, n. 10, p. e1164, 2024.
- MEHANDRU, S.; MERAD, M. Pathological sequelae of long-haul COVID. **Nature Immunology**, v. 23, n. 2, p. 194-202, 2022.
- MEHTA, O. P.; BHANDARI, P.; RAUT, A.; KACIMI, S. E. O.; HUY, N. T.. Coronavirus disease (COVID-19): comprehensive review of clinical presentation. **Frontiers in Public Health**, v. 8, n. s.n., p. s.p., 2021.
- MIYAZATO, Y.; INOUE, T.; MIZUNO, T.; et al. Prolonged and late-onset symptoms of coronavirus disease 2019. **Open Forum Infectious Diseases**, Oxford, v. 7, n. 11, p. ofaa507, 2020.
- MILLS, M.; YANG, N.; WEINBERGER, R.; VANDER WOUDE, D. L.; BEGGS, A. H.; EASTEAL, S.; et al. Differential expression of the actin-binding proteins, alpha-actinin-2 and -3, in different species: implications for the evolution of functional redundancy. **Human Molecular Genetics**, v. 10, n. 13, p. 1335–1346, 2001.
- MONTIEL, V. Oxidative stress-induced endothelial dysfunction and decreased vascular nitric oxide in COVID-19 patients. **EBioMedicine**, v. 77, p. 103893, mar. 2022.
- MONTES-IBARRA, M.; OLIVEIRA, C. L. P.; ORSSO, C. E.; LANDI, F.; MARZETTI, E.; PRADO, C. M. The impact of long COVID-19 on muscle health. **Clinics in Geriatric Medicine**, v. 38, n. 3, p. 545-557, 2022.
- MENG, Z.; GUO, S.; ZHOU, Y.; LI, M.; WANG, M.; YING, B. Applications of laboratory findings in the prevention, diagnosis, treatment, and monitoring of COVID-19. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, p. 316, 2021.
- MORENS, D. M.; BREMAN, J. G.; CALISHER, C. H.; DOHERTY, P. C.; HAHN, B. H.; KEUSCH, G. T.; KRAMER, L. D.; LEDUC, J. W.; MONATH, T. P.; TAUBENBERGER, J. K. The origin of COVID-19 and why it matters. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 955-959, 2020.
- MORLEY, J. E. COVID-19 — The long road to recovery. *Journal of Nutrition*, **Health and Aging**, v. 24, n. 9, p. 917-919, 2020.
- MORLEY, J. E.; KALANTAR-ZADEH, K.; ANKER, S. D. COVID-19: a major cause of cachexia and sarcopenia? **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 11, n. s.n., p. 863-865, 2020.
- MUELLER, B. J.; ROBERTS, M. D.; MOBLEY, C. B.; JUDD, R. L.; KAVAZIS, A. N. Nitric oxide in exercise physiology: past and present perspectives. **Frontiers in Physiology**, v. 15, n. s.n., p. s.p., 2024.
- MUDDLE, T. W. D.; COLQUHOUN, R. J.; MAGRINI, M. A.; et al. Effects of fatiguing, submaximal high- versus low-torque isometric exercise on motor unit recruitment and firing behavior. **Physiological Reports**, v. 6, n. 8, e13675, 2018.
- MURACH, K. A.; DUNGAN, C. M.; PETERSON, C. A.; MCCARTHY, J. J. Muscle fiber splitting is a physiological response to extreme loading in animals. **Exercise and Sport Sciences Reviews**, v. 47, n. 2, p. 108-115, 2019.

MUKUND, K.; SUBRAMANIAM, S. Skeletal muscle: a review of molecular structure and function, in health and disease. Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine, **Hoboken**, e1462, 2019.

NATH, Av. Long-haul COVID. **Neurology**, v. 95, n. 13, p. 559-560, 2020.

NOONONG, K.; CHATATIKUN, M.; SURINKAEW, S.; KOTEPUI, M.; HOSSAIN, R.; et al. Mitochondrial oxidative stress, mitochondrial ROS storms in long COVID pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 14, n. s.n., p. s.p., 2023.

OTIS, J. S.; NICCOLI, S.; HAWDON, N.; SARVAS, J. L.; FRYE, M. A.; CHICCO, A. J.; LEES, S. J. Pro-inflammatory mediation of myoblast proliferation. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. 1-10, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard. Genebra: **OMS**, 2021. p. 1–5. Disponível em: <https://covid19.who.int>. Acesso em: 22 jul. 2025.

OSIAEVI, I.; SCHULZE, A.; EVERS, G.; et al. Persistent capillary rarefaction in long COVID syndrome. **Angiogenesis**, v. 26, n. 1, p. 53–61, ago. 2022.

ORSUCCI, D.; SCIACCA, G.; PUGLIESE, M.; et al. Neurological features of COVID-19 and their association with creatine kinase levels. **Neurological Sciences**, v. 42, n. 4, p. 1221–1230, 2021.

PAJAK, B.; ORZECZOWSKA, S.; PIJET, B.; POGORZELSKA, A.; GAJKOWSKA, B.; ORZECZOWSKI, A. Crossroads of cytokine signaling - the chase to stop muscle cachexia. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 59, n. 9, p. 251-264, 2008.

PAHARIA, D.; SINGH, S.; GUPTA, R.; et al. Long-term biochemical markers in post-COVID-19 syndrome: elevated creatine kinase and lactate dehydrogenase in severe cases. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 122, p. 123–130, 2022.

PAN, P.; SHEN, M.; YU, Z.; GE, W.; CHEN, K.; TIAN, M.; XIAO, F.; et al. SARS-CoV-2 N protein promotes NLRP3 inflammasome activation to induce hyperinflammation. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. s.p., 2021.

PELUSO, M. J.; DEEKS, S.G. Mechanisms of long COVID and the path toward therapeutics. **Cell**, v. 187, n. 20, p. 5500-5529, 2024.

PELUSO, M. J.; LU, S.; TANG, A. F.; DURSTENFELD, M. S.; HO, H. E.; et al. Markers of immune activation and inflammation in individuals with postacute sequelae of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 224, n. 11, p. 1839-1848, 2021.

PEREGO, E; CALLARD, F; STRAS, L; MELVILLE-JÓHANNESSEN, B.; POPE, R.; ALWAN, N. A. Why the patient-made term 'Long Covid' is needed. **Wellcome Open Research**, v. 5, n. 224, p. 1-12, 2020.

PERISETTI, A.; GOYAL, H.; GAJENDRAN, M.; BOREGOWDA, U.; MANN, R.; SHARMA, N. Prevalence, mechanisms, and implications of gastrointestinal symptoms in COVID-19. **Frontiers in Medicine**, v. 7, n. s.n., p. s.p., 2020.

PINCIVERO D. M.; CAMPY R.M.; SALFETNIKOV Y.; BRIGHT A.; COELHO A.J. Influence of contraction intensity, muscle, and gender on median frequency of the quadriceps femoris. **J Appl Physiol**. Mar;90(3):804-10. 2001.

POTERE, N.; GIUSEPPE, M.; BUONO, D.; CARICCHIO, R.; CREMER, P. C.; VECCHI, A.; PORRECA, E.; DALLA GASPERINA, D.; DENTALI, F.; ABBATE, A.; BONAVENTURA, A. Interleukin-1 and the NLRP3 inflammasome in COVID-19: pathogenetic and therapeutic implications. **eBioMedicine**, v. 85, n. s.n., p. 104299, 2022.

PRADHAN, A.; OLSSON, P. E. Sex differences in severity and mortality from COVID-19: are males more vulnerable? **Biology of Sex Differences**, v. 11, n. 1, p. s.p., 2020.

RAVI, V.; SAXENA, Sonal; PANDA, Pragyan Swagatika. Basic virology of SARS-CoV 2. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 40, n. 2, p. 182-186, 2022.

RETORNAZ, F.; REBAUDET, S.; STAVRIS, C.; JAMMES, Y. Long-term neuromuscular consequences of SARS-Cov-2 and their similarities with myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome: results of the retrospective CoLGEM study. **Journal of Translational Medicine**, v. 20, n. 1, p. s.p., 2022.

ROSSI, G. A.; SACCO, O.; MANCINO, E.; CRISTIANI, L.; MIDULLA, F. Differences and similarities between SARS-CoV and SARS-CoV-2: spike receptor-binding domain recognition and host cell infection with support of cellular serine proteases. **Infection**, v. 48, n. 5, p. 665-669, 2020.

ROTHAN, H. A.; BYRAREDDY, S. N. The epidemiology and pathogenesis of coronavirus disease (COVID-19) outbreak. **Journal of Autoimmunity**, v. 109, p. s.p., 2020.

RUBIN, R. As Their Numbers Grow, COVID-19 “Long Haulers” Stump Experts. **American Medical Association**, v. 1, p. 1-3, 2020.

RUDROFF, S. et al. Fatigue and Cognitive Dysfunction in Post-COVID-19 Syndrome: A Review of Clinical and Mechanistic Insights. **Frontiers in Neurology**, v. 11, 2020.

SANTOS, F.; FERNANDES, P.; RAMOS, M. Enzima TMPRSS2. **Revista de Ciência Elementar**, v. 9, n. 4, p. s.p., 2021.

SALAMANNA, F.; MAGLIO, M.; LANDINI, M. P.; FINI, M. Blood factors as biomarkers in osteoporosis: points from the COVID-19 era. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 32, n. 9, p. 672–679, 2021.

SALOMÃO, M. What remains in the pulmonary tissue after acute COVID-19? **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 48, p. 2022-0209, 2023.

SCHETT, G.; MANGER, B.; SIMON, D.; CAPORALI, R. COVID-19 revisiting inflammatory pathways of arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 16, n. 8, p. 465-470, 2020.

SCHNYDER, S.; HANDSCHIN, C. Skeletal muscle as an endocrine organ: PGC-1 $\alpha$ , myokines and exercise. **Bone**, v. 80, p. 115-125, nov. 2015.

SCHULTHEISS, C.; WILLSCHER, E.; PASCHOLD, L.; GOTTSCHICK, C.; et al. The IL-1 $\beta$ , IL-6, and TNF cytokine triad is associated with post-acute sequelae of COVID-19. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 6, p. s.p., 2022.

SCHULTHEISS, C.; WILLSCHER, E.; PASCHOLD, L.; GOTTSCHICK, C.; et al. From online data collection to identification of disease mechanisms: The IL-1 $\beta$ , IL-6 and

TNF- $\alpha$  cytokine triad is associated with post-acute sequelae of COVID-19 in a digital research cohort. **National Institutes of Health**, v. v.s., n. n.s., p. s.p., 2021.

SETO, J. T.; LEK, M.I; QUINLAN, K. G.R.; HOUWELING, P. J.; ZHENG, X. F.; et al. Deficiency of  $\alpha$ -actinin-3 is associated with increased susceptibility to contraction-induced damage and skeletal muscle remodeling. **Human Molecular Genetics**, v. 20, n. 15, p. 2914-2927, 2011.

SEVERO SANTOS, J. F.; DAHMER SANTOS, D. Hierarquia de sintomas de Gripe relacionados à COVID-19 de acordo com sexo e cor ou raça em notificações de pacientes com Síndrome Respiratória Aguda Grave no Brasil. **Scielo**, 2020.

SHAH, S.; DANDA, D.; KAVADICHANDA, C.; DAS, S.; ADARSH, M. B.; NEGI, V. Autoimmune and rheumatic musculoskeletal diseases as a consequence of SARS-CoV-2 infection and its treatment. **Rheumatology International**, v. 40, n. 10, p. 1539-1554, 2020.

SHANKAR, V.; WILHELMY, J.; CURTIS, E. J.; MICHAEL, B.; CERVANTES, L.; et al. Oxidative Stress is a shared characteristic of ME/CFS and Long COVID. **National Institutes of Health**, 2024.

SHIRAKAWA, K.; OKADA, S.; KAWANO, F.; et al. Chronic inflammation induces Pax7 expression and inhibits myogenin via TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B signaling, leading to impaired muscle differentiation in cancer cachexia. **Frontiers in Physiology**, v. 12, p. 789654, 2021.

SIGOLI, E.; ANTÃO, R. A.; GUERREIRO, M. P.; DE ARAÚJO, T. O. P.; DOS SANTOS, P. K.; DA ROZA, D. L.; RASSIER, D. E.; CORNACHIONE, A. S. Effects of Low-Intensity and Long-Term Aerobic Exercise on the Psoas Muscle of mdx Mice: An Experimental Model of Duchenne Muscular Dystrophy. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, p. s.p., 2022.

SOARES, M. N.; EGGELBUSCH, M.; NADDAF, E.; GERRITS, K. H.L.; VAN DER SCHAAF, M.; et al. Skeletal muscle alterations in patients with acute Covid-19 and post-acute sequelae of Covid-19. **Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle**, v. 13, n. 1, p. 11-22, 2022.

STAVEM, K. Persistent symptoms 1 year after COVID-19 in non-hospitalized subjects: a population-based cohort study. **European Journal of Internal Medicine**, v. 92, p. 1–7, 2021.

STAMLER, J. S; MEISSNER, G. Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. **Physiol Rev** 81: 209-237. 2001.

TANAKA, M.; KANAZASHI, M.; TSUMORI, T.; FUJINO, H. Prazosin improves insulin-induced anabolic signaling by protecting capillary regression in the soleus muscle of hindlimb-unloaded rats. **Journal of Diabetes and Metabolic Disorders**, v. 23, n. 2, p. 1989-1999, 2024.

TAYLOR, N. A. S.; SANDERS, R. H.; HOWICK, E. I.; STANLEY, S. N. Static and dynamic assessment of the Biodex dynamometer. **Applied Journal of Physiology and Occupational Physiology**, v. 62, p. 180-188, 1991.

- TEJPAL, N.; MAHESHWARI, P.; GUPTA, P.; et al. Sex-specific differences in COVID-19 severity: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Infection**, v. 83, n. 1, p. 17–22, 2021.
- TENGAN, C. H.; RODRIGUES, G. S.; GODINHO, R. O. Nitric oxide in skeletal muscle: Role on mitochondrial biogenesis and function. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 12, p. 17160-17184, 2012.
- TSCHOPP, J.; SCHRÖDER, K.; ZIMMERMANN, T. NLRP3 inflammasome: activation and regulation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 7, p. 488–498, 2010.
- TYAGI, R. Pulmonary fibrosis: post-COVID-19 complications and evidences. **International Immunopharmacology**, v. 116, p. 109418, 2022.
- TROVATO, F. M. Morphological and functional aspects of human skeletal muscle. **Journal of Functional Morphology and Kinesiology**, v. 1, n. 3, p. 289–302, 2016.
- TRYFONOS, A. Functional limitations and exercise intolerance in patients with post-COVID condition: a randomized crossover clinical trial. **JAMA Network Open**, v. 7, n. 4, e244386, 2024.
- TROTT, M.; DRISCOLL, R.; PARDHAN, S. The prevalence of sensory changes in post-COVID syndrome: A systematic review and meta-analysis. **Frontiers in Medicine**, v. 9, p. s.p., 2022.
- TUZUN, S.; KELES, A.; OKUTAN, D.; YILDIRAN, T.; PALAMAR, D. Assessment of Musculoskeletal Pain, Fatigue and Grip Strength in Hospitalized Patients with COVID-19. **European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine**. 1-10, 2020.
- TYML, K.; MATHIEU-COSTELLO, O.; CHENG, L.; NOBLE, E. G; BURTON, A C. Differential microvascular response to disuse in rat hindlimb skeletal muscles. **J Appl Physiol**. Oct;87(4):1496-505. 1999.
- UDEH, R.; UTRERO-RICO, A.; DOLJA-GORE, X.; RAHMATI, M.; MCEVOY, M.; KENNA, T. Lactate dehydrogenase contribution to symptom persistence in long COVID: A pooled analysis. **Reviews in Medical Virology**, v. 33, n. 6, p. s.p., 2023.
- UÇAROĞLU CAN, N.; KAYA, Ö.; KOTAN, D. Myalgia frequency in patients with COVID-19 and its relationship with creatine kinase levels. **Duzce Medical Journal**, v. 22, Special Issue 1, p. 34-38, 2020.
- UNVER, N.; KANWAR, S. Inflammation, cytokines and STAT3 signaling in COVID-19: IL-6 pathway as a potential target for therapeutic intervention. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 9, n. 5, p. 1–7, 2018.
- VANINOV, N.; PETROV, P.; IVANOVA, S.; et al. In the eye of the COVID-19 cytokine storm. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 5, p. 277, 2020.
- VARGHESE, M. Prevalence and clinical features of long COVID from omicron infection in children and adults. **Journal of Infection**, v. 87, n. 6, p. 609–617, 2023.
- 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.
- VASILIADIS, A. V.; TSATLIDOU, M.; METAXIOTIS, D.; PSOMIADIS, C.; BELETSIOTIS, A.; ARVANITI, K. Non-Respiratory Symptoms of Patients Infected with

SARS-CoV-2 (Coronavirus Disease 2019): Lessons from Their Initial Presentation at the Hospital. **Medicina**, v. 57, n. 344, p. 1-8, 2021.

VATTEMI, G.; MIRABELLA, M.; GUGLIELMI, V.; LUCCHINI, M.; TOMELLERI, G.; GHIRARDELLO, A.; DORIA, A. Muscle biopsy features of idiopathic inflammatory myopathies and differential diagnosis. **Autoimmunity Highlights**, v. 5, n. 3, p. 77-85, 2014.

WANG, D.; HU, B.; HU, C.; et al. Clinical Characteristics of 138 Hospitalized Patients With 2019 Novel Coronavirus–Infected Pneumonia in Wuhan, China. **JAMA**, v. 323, n. 11, p. 1061–1069, 2020.

WHO. COVID-19 Explorer - Early October 2020. **World Health Organization**, p. 1. 2020.

WHO. Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination. **World Health Organization**, p. 1-5. 2021.

WITT, R.; WEIGAND, A.; BOOS, A. M.; CAI, A.; DIPPOLD, D.; BOCCACCINI, A. R.; SCHUBERT, D. W.; HARDT, M.; LANGE, C.; ARKUDAS, A.; HORCH, R. E.; BEIER, J. P. Mesenchymal stem cells and myoblast differentiation under HGF and IGF-1 stimulation for 3D skeletal muscle tissue engineering. **BMC Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. s.p., 2017.

WU, X. Damage to endothelial barriers and its contribution to long COVID. **Angiogenesis**, 2023.

XIE, J.; WANG, Q.; XU, Y.; ZHANG, T.; CHEN, L.; ZUO, X.; LIU, J.; HUANG, L.; ZHAN, P.; LV, T.; SONG, Y. Clinical characteristics, laboratory abnormalities and ct findings of covid-19 patients and risk factors of severe disease: A systematic review and meta-analysis. **Annals of Palliative Medicine**, v. 10, n. 2, p. 1928-1949, 2021.

YANAI, H.; ADACHI, H.; HAKOSHIMA, M.; KATSUYAMA, H.; SAKO, A.. The Significance of Endothelial Dysfunction in Long COVID-19 for the Possible Future Pandemic of Chronic Kidney Disease and Cardiovascular Disease. **Biomolecules**, v. 14, n. 8, p. s.p., 2024.

YENMIS, G.; KALLENCI, I.; DOKUR, M.; KOC, S.; YALINKILIC, S. B.; ATAK, E.; DEMIRBILEK, M.; ARKAN, H. The distribution of sport performance gene variations through COVID-19 disease severity. **Diagnostics (Basel)**, v. 15, n. 6, p. 701, 12 mar. 2025.

YASUDA, N.; GLOVER, E. I.; PHILLIPS, S. M.; ISFORT, R. J.; TARNOPOLSKY, M. A. Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization. **J Appl Physiol**, v. 99, p. 1085-1092, 2005.

YOUNG, A. The relative isometric strength of type I and type II muscle fibres in the human quadriceps. **Clinical Physiology**, v. 4, n. 1, p. 23-32, 1984.

ZAIM, S.; CHONG, J. H.; SANKARANARAYANAN, V.; HARKY, A. COVID-19 and Multiorgan Response. **Curr Probl Cardiol**, v. 45, p. 1-22, 2020.

ZINELLU, A.; PANDEY, A.; COSSU, M.; et al. Creatine kinase and COVID-19: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Clinical Medicine**, v. 10, n. 7, p. 1439, 2021.

ZHU, M. Characterization of ACTN4 as a novel antiviral target against SARS-CoV-2. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 9, n. 1, art. 243, 2024.

ØSTERGAARD, L. SARS CoV-2 related microvascular damage and symptoms during and after COVID-19: Consequences of capillary transit-time changes, tissue hypoxia and inflammation. **Physiological Reports**, v. 9, n. 3, p. s.p., 2021.

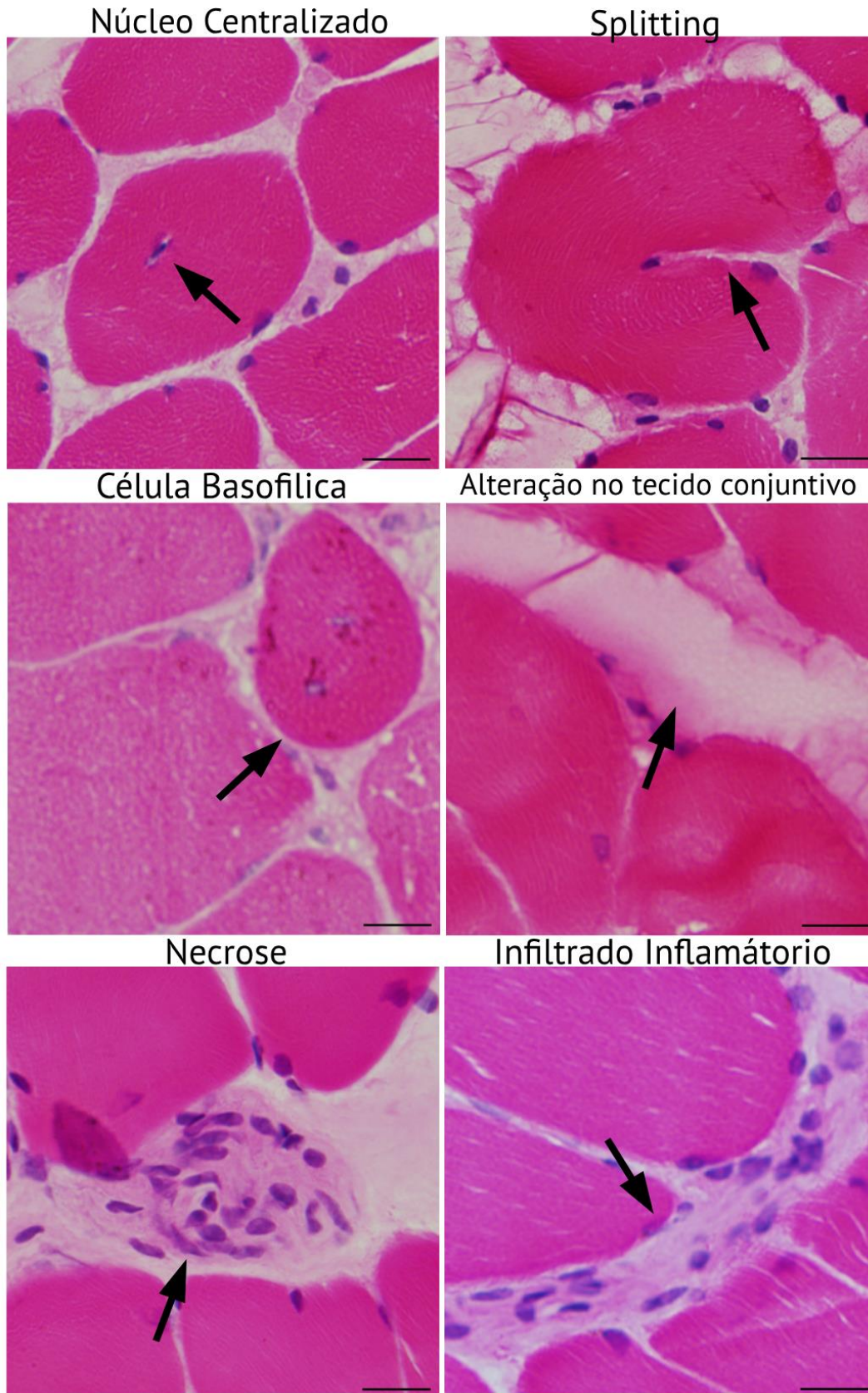
## APÊNDICE

### Apêndice I – Tabela com itens do formulário de participação na pesquisa

Nome	
Idade	
Sexo	Masculino
	Feminino
e-mail	
Telefone para contato	
Cidade / estado	
Você tem algum vínculo com a UFSCar?	Não
	Sim, professor
	Sim, estudante
	Sim, funcionário
	Prefiro não responder
Você pratica exercícios físicos com frequência?	Sim, três vezes por semana
	Sim, todos os dias
	Não
	Prefiro não responder
	Outro:
Você tem alguma das doenças abaixo?	Hipertensão
	Diabetes
	Doença cardiovascular
	Doença muscular
	Asma
	Tuberculose
	Câncer
	Obesidade
	Não apresento
	Prefiro não responder
Outro:	
Teve COVID-19?	Sim
	Não
	Eu não sei
	Prefiro não responder
Que tipo de tratamento foi realizado?	Casa (isolamento)
	Hospital – enfermaria
	Hospital – UTI
	Não tive COVID-19
	Prefiro não responder
Você tomou vacina?	Sim, apenas a primeira dose
	Sim, duas doses
	Sim, dose única
	Sim, incluindo a dose adicional
	Não
	Prefiro não responder
Se a resposta acima for positiva, qual vacina foi aplicada?	Butantan (Coronavirus)
	Fiocruz (AstraZeneca/Oxford)
	Pfizer
	Janssen
	Prefiro não responder
Sintomas na fase aguda da infecção (durante a doença). Marque todos os sintomas que você apresentou	Falta de ar
	Cansaço/Fadiga
	Fraqueza muscular
	Dor muscular (dor no corpo)
	Dor nas articulações

	Dor de cabeça / enxaqueca
	Febre
	Nariz entupido (coriza)
	Tosse
	Perda ou diminuição de olfato (cheiro)
	Perda ou diminuição do paladar (gosto)
	Diarreia
	Desmaio
	Queda de pressão (hipotensão)
	Tontura
	Desorientação
	Sem sintomas (assintomático)
	Não tive COVID-19
	Prefiro não responder
	Outro:
Sintomas no mês seguinte à quarentena (após 15 dias de isolamento em casa). Marque todos os sintomas que você apresentou	Falta de ar
	Cansaço/Fadiga
	Fraqueza muscular
	Dor muscular (dor no corpo)
	Dor nas articulações
	Dor de cabeça / enxaqueca
	Febre
	Nariz entupido (coriza)
	Tosse
	Perda ou diminuição de olfato (cheiro)
	Perda ou diminuição do paladar (gosto)
	Diarreia
	Desmaio
	Queda de pressão (hipotensão)
	Tontura
	Desorientação
	Sem sintomas (assintomático)
Sintomas que persistiram após o fim da COVID-19. Marque todos os sintomas que você ainda apresenta.	Não tive COVID-19
	Prefiro não responder
	Outro:
	Falta de ar
	Cansaço/Fadiga
	Fraqueza muscular
	Dor muscular (dor no corpo)
	Dor nas articulações
	Dor de cabeça / enxaqueca
	Febre
	Perda ou diminuição do olfato (cheiro)
	Perda ou diminuição do paladar (gosto)
	Dificuldade para praticar exercícios físicos
	Dificuldade para caminhar (percorrer curtas distâncias)
	Dificuldade para realizar atividades do dia a dia
	Dificuldade de concentração nas tarefas
	Perda de memória
Sem sintomas	
Não tive COVID-19	
Prefiro não responder	
Outro:	

Apêndice II- Tipos de alterações celulares encontradas no músculo vasto letal de humanos.



## ANEXO

### Anexo I – Aprovação da Comissão de ética

**Público** **Pesquisador** **CEP** **Alterar Meus Dados** **ANABELLE SILVA CORNACHIONE - Pesquisador | V4.0.7\_RC06**  
Sua sessão expira em: 39min 15

#### DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

**DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA**

**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 II – Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)**

**(Resolução 510/2016 do CNS)**

**“O impacto do novo coronavírus SARS-CoV-2 no músculo esquelético.  
Análises morfológicas, bioquímicas e funcionais”**

Somos pesquisadores do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular do Departamento de Ciências Fisiológicas (UFSCar) e estamos estudando as causas da fraqueza muscular após infecção pelo novo coronavírus (COVID-19).

O(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a responder este questionário como parte do projeto: “O impacto do novo coronavírus SARS-CoV-2 no músculo esquelético” . Análises morfológicas, bioquímicas e funcionais”. Sua participação nesta pesquisa nos ajudará a entender como a musculatura é afetada por este vírus e assim, novos estudos poderão traçar tratamentos eficazes para a reabilitação de pessoas após a COVID-19.

Esse estudo englobará:

- 1) pessoas que tiveram COVID-19 com sintomas leves a moderados, incluindo fraqueza muscular (dor no corpo), fadiga e/ou dor nas juntas, os quais podem estar persistindo mesmo após o término da doença;
- 2) pessoas que não foram infectadas pelo novo coronavírus, visando comparar os efeitos a longo prazo da doença no sistema muscular.

Este questionário tem como objetivos principais: (1) o recrutamento de indivíduos interessados em participar da etapa presencial de nossa pesquisa (avaliação muscular); (2) a coleta de dados (respostas) que nos ajudarão a entender os aspectos relacionados à persistência de sintomas musculares em indivíduos pós fase aguda da infecção viral (COVID-crônica), e que serão utilizados na escrita de um artigo científico (o/a senhor/a terá suas respostas tornadas anônimas e será tratado como um coletivo); e (3) os dados fornecidos nos auxiliarão na separação dos indivíduos

interessados em participar da etapa presencial em grupo controle (COVID-19-negativo) e grupo teste (COVID-19-positivo pós fase aguda).

Sua participação é voluntária, isto é, a qualquer momento o(a) senhor(a) decidirá se (1) deseja participar e preencher o questionário, ou (2) se deseja desistir da participação durante ou após o preenchimento do questionário.

Ao aceitar participar da pesquisa, o(a) senhor(a) irá: 1. Eletronicamente aceitar participar da etapa virtual do estudo, o que corresponderá à assinatura deste termo (TCLE), o qual poderá ser impresso ou solicitado ao pesquisador via endereço de e-mail fornecido, se assim o desejar. 2. Responder ao questionário on-line que terá tempo gasto para seu preenchimento em torno de 5 minutos. Caso mude de ideia e não queira responder ao formulário, basta fechar a página do seu navegador. Caso desista de preencher o formulário antes de finalizá-lo, os seus dados não serão gravados, enviados e nem recebidos pelos pesquisadores. Caso responda a esse formulário, mas desista de participar desta etapa da pesquisa, entre em contato com um dos pesquisadores do estudo (endereço para contato abaixo) para que seus dados sejam retirados da pesquisa.

As respostas deste formulário serão tornadas anônimas no momento do estudo para preservar a sua identidade. Os dados coletados serão utilizados na escrita de um artigo científico e poderão ser divulgados em eventos nacionais e internacionais. O(a) senhor(a) tem o direito de não responder qualquer questão, sem necessidade de explicação para tal, podendo desistir de responder por completo este formulário, sem penalidade alguma. Apesar da maioria das perguntas serem de preenchimento obrigatório, você tem o direito de não responder a pergunta, sem penalidade alguma ao optar pela opção "Prefiro não responder". Após a conclusão da coleta de dados (respostas) obtida por este questionário, faremos o *download* dos mesmos e os armazenaremos em um HD externo do Laboratório de Fisiologia e Biofísica Muscular (LFBM – UFSCar). Em seguida, estes dados *online* serão apagados da 'nuvem' (Google Drive) e de qualquer ambiente virtual compartilhado.

O(a) senhor(a) não terá nenhum custo ou compensação financeira ao participar desta etapa da pesquisa. A participação em responder este formulário não oferece risco imediato ao(a) senhor(a), porém considera-se a possibilidade de um risco subjetivo, pois algumas perguntas podem remeter à algum desconforto ou evocar lembranças

desagradáveis. Caso algumas dessas possibilidades ocorra, o(a) senhor(a) poderá optar pela suspensão imediata da participação na pesquisa, sem penalidade alguma. Há ainda o risco inerente a qualquer acesso à internet e como forma de minimização, as informações não fornecidas pelo(a) senhor(a) (por exemplo, IP) não serão acessadas pelos pesquisadores.

Espera-se que, como resultado deste estudo, tenhamos um melhor entendimento dos efeitos da COVID-19 no sistema musculoesquelético, proporcionando uma melhoria no diagnóstico, no manejo e no tratamento de indivíduos acometidos por essa doença. Além disso, obteremos informações importantes sobre a fraqueza muscular persistente que tem sido observada em muitos indivíduos após o término da infecção viral.

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar. Estou ciente de que esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da UFSCar, que funciona na Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de São Carlos, localizada na Rodovia Washington Luiz, Km. 235 - Caixa Postal 676 - CEP 13.565-905 - São Carlos - SP – Brasil. Fone do CEP (16) 3351-9685. Fone da Pró-Reitoria de Pesquisa (16) 3351-8028. Endereço eletrônico: cephumanos@ufscar.br. O CEP está vinculado à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), e o seu funcionamento e atuação são regidos pelas normativas do CNS/CONEP. A CONEP tem a função de implementar as normas e diretrizes regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, aprovadas pelo CNS, também atuando conjuntamente com uma rede de Comitês de Ética em Pesquisa organizados nas instituições onde as pesquisas se realizam. Endereço: SRTV 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar - Asa Norte - CEP: 70719-040 - Brasília-DF. Telefone: (61) 3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br. O CEP tem por finalidade cumprir e fazer cumprir as determinações da Resolução 510/16, do Conselho Nacional de Saúde no que diz respeito aos aspectos éticos das pesquisas envolvendo seres humanos, sob a ótica do indivíduo e das coletividades, tendo como referenciais básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, entre outros, visando assegurar os direitos e deveres que dizem respeito à comunidade científica, aos sujeitos da pesquisa e ao Estado.

Ficaremos muito gratos com a sua participação!

--Endereços para contato:

Contato: Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF), Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Rodovia Washington Luiz, Km 235. CEP 13565-905- São Carlos - SP – Brasil. E-mail: [lfbm.lab@gmail.com](mailto:lfbm.lab@gmail.com); [cornachione@ufscar.br](mailto:cornachione@ufscar.br) ; telefone: (16) 99761-3234.