

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E
REABILITAÇÃO – PPGMHR

**EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS SOBRE
A RESPOSTA CARDIOVASCULAR E IMUNOLÓGICA EM PACIENTES
PÓS-COVID-19**

GERSON FERREIRA AGUIAR

Anápolis, GO

2024

UNIVERSIDADE EVANGÉLICA DE GOIÁS – UniEVANGÉLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MOVIMENTO HUMANO E
REABILITAÇÃO – PPGMHR

**EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS SOBRE
A RESPOSTA CARDIOVASCULAR E IMUNOLÓGICA EM PACIENTES
PÓS-COVID-19**

GERSON FERREIRA AGUIAR

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Movimento Humano e Reabilitação
(PPGMHR) da Universidade
Evangélica de Goiás
(UniEVANGÉLICA), como requisito
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira

Anápolis, GO

2024

Ficha Catalográfica

A283

Aguiar, Gerson Ferreira.

Efeitos de um programa de exercícios físicos sobre a resposta cardiovascular e imunológica em pacientes pós-COVID-19 / Gerson Ferreira Aguiar – Anápolis: Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, 2024.

90p.; il.

Orientador: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira.

Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Movimento Humano e Reabilitação – Universidade Evangélica de Goiás – UniEvangélica, 2024.

1. Longa COVID-19 2. Função cardíaca 3. Hemodinâmica cardiovascular
4. Reabilitação cardiopulmonar 5. Exercício físico I. Vieira, Rodolfo de Paula
II. Título.

CDU 615.8

Catálogo na Fonte
Elaborado por Rosilene Monteiro da Silva CRB1/3038

TERMO DE APROVAÇÃO

Anápolis, 28 de Junho de 2024

EFEITOS DE UM PROGRAMA DE EXERCÍCIOS FÍSICOS SOBRE A RESPOSTA CARDIOVASCULAR E IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PÓS-COVID-19

GERSON FERREIRA AGUIAR

Dissertação apresentada à Universidade Evangélica de Goiás - UniEVANGÉLICA para obtenção do título de Mestre em Movimento Humano e Reabilitação.

Banca Examinadora

Presidente: Prof. Dr. Rodolfo de Paula Vieira – Orientador – UniEVANGÉLICA

Membro interno: Profa. Dra. Patricia Sardinha L. L. Martins – UniEVANGÉLICA

Membro Interno: Profa. Dra. Renata Kelly da Palma – UniEVANGÉLICA

Membro Externo: Profa. Dra. Regiane Albertini de Carvalho – UNIFESP

Membro Suplente: Prof. Dr. Alberto Souza de Sá Filho – UniEVANGÉLICA

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por me guiar e me proporcionar força e proteção incondicional sempre. À minha amada esposa, Laura, expresso minha mais profunda gratidão. Seu amor, e compreensão foram fundamentais para me manter focado, mesmo nos momentos mais desafiadores. A Anna, Isadora e o Antony por serem minha maior fonte de motivação, e aos meus pais que alicerçaram sempre minha jornada.

Também desejo estender meus sinceros agradecimentos ao meu estimado orientador, Rodolfo. Sua presença, conselhos perspicazes, apoio e inspiração foram cruciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, gostaria de expressar minha gratidão a todos os que acreditaram em mim e me encorajaram. Este trabalho é dedicado a vocês.

Muito obrigado.

RESUMO

A doença coronavírus 2019 (COVID-19), causada pelo vírus SARS-CoV-2, resultou numa crise de saúde global, com impacto significativo na saúde cardiovascular. A COVID-19 está associada a disfunção vascular, lesão miocárdica e uma série de complicações cardiovasculares. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos de um programa de exercício na hemodinâmica cardiovascular e resposta imunológica pós-COVID-19. **Métodos:** Trinta e três voluntários pós-COVID-19 participaram de um programa estruturado de exercícios físicos. Os parâmetros clínicos e laboratoriais foram avaliados pré e pós-intervenção, com foco nas características metabólicas, parâmetros cardiovasculares, respostas hematológicas, imunológicas e níveis séricos de citocinas. **Resultados:** O programa reduziu significativamente o peso corporal ($p < 0,0002$), o índice de massa corpórea ($p < 0,0002$), a circunferência da cintura ($p < 0,0004$) e a massa gorda ($p < 0,0001$), enquanto aumentou a massa livre de gordura ($p < 0,0002$). Foram observadas melhorias na pressão arterial sistólica e diastólica ($p < 0,0002$), na frequência cardíaca de repouso ($p < 0,0001$) e na SpO₂ de repouso ($p < 0,0001$). A análise hematológica mostrou aumento de neutrófilos ($p < 0,0004$), basófilos ($p < 0,0089$), monócitos ($p < 0,0026$) e da relação linfócitos/neutrófilos ($p < 0,0001$). A hemodinâmica cardiovascular melhorou, com aumentos significativos no volume sistólico ($p < 0,0429$) e no índice de volume sistólico ($p < 0,0251$) e na relação da função diastólica precoce ($p < 0,0463$). Além disso, o programa reduziu as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β ($p < 0,0001$), IL-2 ($p < 0,0022$) e IL-6 ($p < 0,0004$), enquanto aumentou as citocinas anti-inflamatórias IL-1RA ($p < 0,0001$) e IL-10 ($p < 0,0001$), e citocinas antivirais IFN- β ($p < 0,0001$) e IFN- γ ($p < 0,0003$). **Conclusão:** A intervenção precoce utilizando um programa de exercícios físicos em pacientes pós-COVID-19 demonstrou melhora significativa na resposta hemodinâmica cardiovascular, na resposta pró-inflamatória e aumento das respostas anti-inflamatórias e antivirais. Esses achados ressaltam a importância do exercício físico na melhora do prognóstico e da qualidade de vida dos pacientes pós-COVID-19.

Palavras-chave: longa COVID-19; função cardíaca; hemodinâmica cardiovascular; reabilitação cardiopulmonar; exercício físico.

ABSTRACT

The Coronavirus Disease 2019 (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, has resulted in a global health crisis with significant impact on cardiovascular health. COVID-19 is associated with vascular dysfunction, myocardial injury, and a range of cardiovascular complications. This study aimed to evaluate the effects of an exercise program on cardiovascular hemodynamics and immune response post-COVID-19. **Methods:** Thirty-three post-COVID-19 volunteers participated in a structured physical exercise program. Clinical and laboratory parameters were assessed pre- and post-intervention, focusing on metabolic characteristics, cardiovascular parameters, hematological and immunological responses, and serum cytokine levels. **Results:** The program significantly reduced body weight ($p<0.0002$), body mass index (BMI) ($p<0.0002$), waist circumference ($p<0.0004$), and fat mass ($p<0.0001$), while increasing lean mass ($p<0.0002$). Improvements were observed in systolic and diastolic blood pressure ($p<0.0002$), resting heart rate ($p<0.0001$), and resting SpO₂ ($p<0.0001$). Hematological analysis showed increased neutrophils ($p<0.0004$), basophils ($p<0.0089$), monocytes ($p<0.0026$), and lymphocyte-to-neutrophil ratio ($p<0.0001$). Cardiovascular hemodynamics improved, with significant increases in stroke volume ($p<0.0429$) and stroke volume index ($p<0.0251$), and early diastolic function ratio ($p<0.0463$). Additionally, the program reduced pro-inflammatory cytokines IL-1 β ($p<0.0001$), IL-2 ($p<0.0022$), and IL-6 ($p<0.0004$), while increasing anti-inflammatory cytokines IL-1RA ($p<0.0001$) and IL-10 ($p<0.0001$), and antiviral cytokines IFN- β ($p<0.0001$) and IFN- γ ($p<0.0003$). **Conclusion:** Early intervention using a physical exercise program in post-COVID-19 patients demonstrated significant improvement in cardiovascular hemodynamic response, pro-inflammatory response, and increased anti-inflammatory and antiviral responses. These findings highlight the importance of physical exercise in improving the prognosis and quality of life for post-COVID-19 patients.

Keywords: long COVID-19; cardiac function; cardiovascular hemodynamics; cardiopulmonary rehabilitation; physical exercise.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
1.1 COVID-19 – Definição	11
1.2 COVID-19 – Epidemiologia.....	13
1.3 COVID-19 – Fisiopatologia	14
1.4 COVID-19 – Sequelas (COVID Longa).....	15
1.5 COVID-19 – Efeitos Cardiovasculares Agudos	16
1.6 COVID-19 – Efeitos cardiovasculares crônicos	17
1.7 COVID-19 – Exercício Físico na Reabilitação Cardiopulmonar	18
1.8 Avaliação hemodinâmica por cardiografia por impedância	19
2. Objetivos	21
2.1 Objetivos primários	21
2.2 Objetivos secundários.....	21
3. Material e métodos.....	22
3.1 Recrutamento e seleção dos voluntários	22
3.2 Protocolo Experimental.....	22
3.3 Protocolo de Exercícios	22
3.4 Avaliação hemodinâmica por cardiografia por impedância	23
3.5 Coleta, Processamento e Análise do Sangue.....	23
3.6 Medidas dos Níveis de Citocinas.....	24
3.7 Análise Estatística	24
4. Resultados	25
4.1 Caracterização Clínico-laboratorial dos Voluntários Pós-COVID-19	25
4.2 Efeitos do programa sobre a Hemodinâmica Cardiovascular	26
5. Discussão.....	36
6. Conclusão	41
7. Referências bibliográficas	42
8. Anexos	51
Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	51
Anexo II. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa	57
Anexo III. Artigo Publicado	62
Anexo IV. Artigo Submetido à Publicação	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Efeitos do programa sobre a frequência cardíaca de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	26
Figura 2. Efeitos do programa sobre o volume sistólico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	26
Figura 3. Efeitos do programa sobre o índice do volume sistólico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	27
Figura 4. Efeitos do programa sobre o débito cardíaco de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	27
Figura 5. Efeitos do programa sobre o índice cardíaco de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	28
Figura 6. Efeitos do programa sobre a resistência vascular sistêmica de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	28
Figura 7. Efeitos do programa sobre o índice da resistência vascular sistêmica de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	29
Figura 8. Efeitos do programa sobre índice de trabalho do ventrículo esquerdo de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	29
Figura 9. Efeitos do programa sobre a fração de ejeção de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	30
Figura 10. Efeitos do programa sobre o volume diastólico final de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	30
Figura 11. Efeitos do programa sobre o índice de fluidos torácico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	31
Figura 12. Efeitos do programa sobre a taxa de função diastólica precoce (%) de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	31
Figura 13. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-1 β de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	32
Figura 14. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-6 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	32
Figura 15. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-2 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	33
Figura 16. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-1RA de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	33

Figura 17. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-10 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	34
Figura 18. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IFN- β de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	34
Figura 19. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IFN- γ de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AVC	Acidente vascular cerebral
CK-MB	Creatina quinase-MB
COVID-19	Doença do coronavírus 2019
DC	Débito cardíaco
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EP	Embolia pulmonar
FC	Frequência cardíaca
FE	Fração de ejeção
IAM	Infarto agudo do miocárdio
IC	Índice cardíaco
ICG	Cardiografia por impedância
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IFT	Índice de fluido torácico
IMC	Índice de massa corpórea
LBA	Lavado broncoalveolar
OMS	Organização Mundial de Saúde
POTS	Síndrome de taquicardia ortostática pósural
RVP	Resistência vascular periférica
SDRA	Síndrome do desconforto respiratório agudo
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
TVP	Trombose venosa profunda
UBS	Unidades Básica de Saúde
UPA	Unidades de Pronto Atendimento
UTI	Unidade de terapia intensiva
VDF	Volume diastólico final
VFC	Variabilidade da frequência cardíaca
VS	Volume sistólico

1. Introdução

A pandemia da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) desencadeou uma série de desafios e complexidades em todo o mundo, deixando um legado de impactos significativos na saúde física e mental das pessoas. Após a luta para controlar a propagação do vírus, uma nova batalha surgiu: a síndrome pós-COVID-19, que continua a afetar indivíduos mesmo após a recuperação inicial da infecção. Entre as muitas facetas dessa síndrome, as repercussões cardiopulmonares emergem como uma preocupação central. Pois pacientes que se recuperaram da COVID-19 frequentemente enfrentam uma série de sintomas persistentes, incluindo fadiga persistente, falta de ar, dores no peito e palpitações cardíacas. Esses sintomas podem indicar uma variedade de complicações cardiopulmonares, como inflamação do músculo cardíaco (miocardite), disfunção ventricular esquerda, coagulação sanguínea anormal e fibrose pulmonar. Essas condições, se não forem adequadamente gerenciadas, podem levar a complicações graves e até mesmo à morte prematura.

Nesse cenário desafiador, a intervenção em reabilitação cardiopulmonar emerge como uma peça fundamental no processo de recuperação pós-COVID. No entanto, apesar de sua importância, a acessibilidade e a disponibilidade de desses programas permanecem aquém do ideal, bem como, lidamos com o fato que existem ainda poucas evidências científicas que embasem programas especializados nesta área.

Assim, é imperativo reconhecer a prevalência da síndrome pós-COVID, seus impactos e repercussões cardiovasculares. E que programas especializados de reabilitação cardiopulmonar tem que ser aprimorados, pois não são apenas uma opção terapêutica, mas sim uma necessidade urgente para garantir uma recuperação completa e qualidade de vida ótima para os para os pacientes em recuperação pós infecção por COVID-19.

1.1 COVID-19 – Definição

A COVID-19, causada pelo coronavírus SARS-CoV-2, emergiu como uma das maiores pandemias da história recente, desencadeando uma crise global

sem precedentes. Descoberto pela primeira vez em Wuhan, China, no final de 2019, o vírus rapidamente se disseminou pelo mundo, afetando milhões de pessoas e sobrecarregando sistemas de saúde em todo o globo. Estudos iniciais sugeriram que a COVID-19 compartilha semelhanças genéticas com outros coronavírus, como o SARS-CoV e o MERS-CoV, ambos associados a surtos anteriores de doenças respiratórias agudas.⁽¹⁾ No entanto, o SARS-CoV-2 demonstrou uma capacidade única de transmissão eficiente entre humanos, resultando em uma disseminação rápida e sustentada.⁽²⁾

A doença apresenta uma ampla gama de sintomas, desde casos assintomáticos até formas graves que requerem hospitalização e ventilação mecânica. Os sintomas mais comuns incluem febre, tosse seca, fadiga, perda de paladar e olfato, enquanto sintomas graves podem incluir falta de ar, dor no peito e confusão.⁽³⁾ Estudos epidemiológicos revelaram que certos grupos populacionais, como idosos e pessoas com condições médicas subjacentes, correm maior risco de desenvolver complicações graves de COVID-19, como pneumonia e falência de órgãos. Além disso, a transmissão do vírus pode ocorrer mesmo em indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos, tornando o controle da disseminação uma tarefa desafiadora.⁽⁴⁾

Diante da rápida propagação do vírus, medidas de saúde pública foram implementadas em todo o mundo para conter a disseminação da COVID-19. Essas medidas incluem o distanciamento físico, uso de máscaras faciais, higienização frequente das mãos e restrições de viagens. Além disso, a vacinação em massa tem desempenhado um papel crucial na redução da morbidade e mortalidade associadas à doença.⁽⁵⁾ No entanto, o acesso equitativo às vacinas tem sido um desafio, especialmente em países de baixa e média renda, destacando a necessidade de cooperação global para garantir uma distribuição justa e eficaz. A resposta à COVID-19 continua a evoluir à medida que novas variantes do vírus surgem e os cientistas trabalham para entender sua transmissibilidade e resistência a tratamentos e vacinas existentes.⁽⁶⁾ Em última análise, a luta contra a COVID-19 exige uma abordagem multifacetada e colaborativa, envolvendo governos, organizações internacionais, comunidades científicas e o público em geral.

1.2 COVID-19 – Epidemiologia

A epidemiologia do COVID-19 tem sido objeto de extensa pesquisa desde o surgimento da doença. Estudos epidemiológicos fornecem insights cruciais sobre a transmissão, distribuição e impacto da doença em populações globais. A disseminação do vírus ocorre principalmente através de gotículas respiratórias, contato próximo com pessoas infectadas e superfícies contaminadas, com a transmissão ocorrendo de forma mais eficiente em ambientes fechados e com grande aglomeração de pessoas.^(7,8) A ampla gama de sintomas e a possibilidade de transmissão por indivíduos assintomáticos ou pré-sintomáticos complicam os esforços de controle da doença.^(4,9)

A epidemiologia também revelou disparidades significativas na prevalência e gravidade da COVID-19 entre diferentes grupos populacionais. Estudos demonstraram que idosos e pessoas com condições médicas subjacentes, como doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade, têm maior risco de desenvolver complicações graves e morte.⁽¹⁰⁾ Além disso, minorias étnicas e grupos socioeconômicos desfavorecidos enfrentam um ônus desproporcional da doença devido a disparidades no acesso aos cuidados de saúde e condições de trabalho que os expõem a um maior risco de infecção.^(11,12)

A evolução da COVID-19 também é influenciada pela emergência de variantes do vírus, que podem apresentar diferentes graus de transmissibilidade, gravidade da doença e resistência a tratamentos e vacinas. Estudos genômicos têm rastreado a propagação de variantes como a Alpha, Beta, Gamma e Delta em diferentes regiões do mundo, destacando a importância da vigilância genômica contínua para informar estratégias de saúde pública e desenvolvimento de vacinas atualizadas.^(13,14)

Diante desses desafios, intervenções baseadas em evidências, como vacinação em massa, distanciamento social e rastreamento de contatos, continuam a ser fundamentais na contenção da pandemia. No entanto, a compreensão contínua da epidemiologia do COVID-19 é essencial para informar políticas de saúde pública eficazes e adaptáveis que possam mitigar o impacto da doença e promover a recuperação global.

1.3 COVID-19 – Fisiopatologia

A fisiopatologia do COVID-19 é um campo complexo que envolve uma interação intrincada entre o vírus SARS-CoV-2 e o sistema imunológico humano. A infecção geralmente começa com a ligação do vírus às células epiteliais do trato respiratório através dos receptores da enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), permitindo sua entrada nas células. Este processo é facilitado pela proteína spike (S) do vírus, que se liga à ECA2 como receptor primário.^(15,16) Uma vez dentro das células hospedeiras, o vírus se replica rapidamente, causando dano direto às células epiteliais e desencadeando uma resposta imunológica.

A resposta imune à infecção pelo SARS-CoV-2 envolve a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucina-6 (IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), como parte da resposta do hospedeiro à presença viral.^(17,18) Em alguns pacientes, essa resposta imunológica pode se tornar desregulada, resultando em uma tempestade de citocinas, onde há uma liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias. Isso pode levar a um estado de hiperinflamação sistêmica, contribuindo para a patogênese de complicações graves, como a síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA).^(19,20)

Além disso, a coagulopatia associada à COVID-19 é uma complicação comum que contribui significativamente para a morbidade e mortalidade da doença. Esta coagulopatia é caracterizada por uma resposta pró-coagulante exacerbada, levando à formação de trombos em vários órgãos e sistemas, aumentando o risco de eventos tromboembólicos venosos e arteriais. Múltiplos mecanismos contribuem para a coagulopatia, incluindo a inflamação sistêmica, disfunção endotelial e ativação plaquetária.^(21,22)

Além da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa desempenha um papel fundamental na fisiopatologia do COVID-19. Estudos demonstraram que a ativação de células T CD4+ e CD8+ é essencial para a eliminação do vírus e a resolução da infecção. No entanto, em casos graves da doença, observa-se uma supressão da resposta imune adaptativa, com diminuição da contagem e função das células T, o que pode contribuir para a progressão da infecção e agravamento do quadro clínico.^(23,24) A compreensão desses mecanismos fisiopatológicos é fundamental para o desenvolvimento de estratégias

terapêuticas direcionadas e intervenções clínicas para melhorar os resultados em pacientes com COVID-19.

1.4 COVID-19 – Sequelas (COVID Longa)

As sequelas de longo prazo do COVID-19, conhecidas como COVID-19 de longa duração ou "COVID longo", têm despertado preocupações significativas devido à sua persistência e impacto na qualidade de vida dos pacientes. Estudos têm relatado uma variedade de sintomas persistentes que persistem por semanas ou meses após a recuperação inicial da infecção aguda pelo SARS-CoV-2. Sintomas comuns incluem fadiga extrema, dispneia, dor torácica, palpitações, dificuldade de concentração, insônia e sintomas neurológicos, como perda de memória e confusão mental.^(25,26)

Além dos sintomas persistentes, alguns pacientes experimentam complicações médicas graves como resultado da COVID-19 de longa duração. Estas podem incluir danos pulmonares irreversíveis, como fibrose pulmonar, comprometimento da função cardíaca, disfunção cognitiva, síndrome pós-intensiva, distúrbios psiquiátricos e efeitos adversos sobre vários sistemas orgânicos, como o renal e o hepático.^(27,28) Essas complicações podem levar à incapacidade permanente e impactar negativamente a qualidade de vida dos sobreviventes da COVID-19.

A fisiopatologia das sequelas de longo prazo do COVID-19 ainda não está totalmente compreendida, mas evidências sugerem que uma combinação de fatores, incluindo inflamação persistente, disfunção imunológica, lesão endotelial, resposta autoimune e dano tecidual direto causado pelo vírus, podem contribuir para a persistência dos sintomas e complicações.^(29,30) A presença de comorbidades pré-existentes, como obesidade, diabetes e doenças cardiovasculares, também pode aumentar o risco de desenvolvimento de sequelas de longo prazo.^(31,32)

A abordagem clínica para pacientes com COVID-19 de longa duração geralmente envolve uma equipe multidisciplinar de profissionais de saúde, incluindo médicos, fisioterapeutas, terapeutas ocupacionais, psicólogos e outros especialistas, para abordar os diversos aspectos dos sintomas persistentes e complicações médicas.^(33,34) Estratégias de tratamento podem incluir reabilitação

pulmonar, terapia cognitivo-comportamental, suporte psicológico, manejo da dor e tratamento farmacológico para controlar sintomas específicos.

A identificação precoce e a compreensão das sequelas de longo prazo do COVID-19 são fundamentais para garantir o acompanhamento adequado e o manejo eficaz dos sobreviventes da doença. Além disso, a pesquisa contínua é necessária para elucidar os mecanismos subjacentes e desenvolver abordagens terapêuticas direcionadas para mitigar o impacto das sequelas de longo prazo e melhorar os resultados a longo prazo dos pacientes afetados.

1.5 COVID-19 – Efeitos Cardiovasculares Agudos

Os efeitos cardiovasculares agudos do COVID-19 representam uma preocupação significativa devido à sua associação com complicações graves e aumento da mortalidade. Pacientes com COVID-19 podem apresentar uma ampla gama de manifestações cardiovasculares, incluindo lesões miocárdicas, arritmias, miocardite, pericardite, trombose arterial e venosa, além de complicações relacionadas à aterosclerose, como infarto agudo do miocárdio (IAM) e acidente vascular cerebral (AVC).^(35,36)

A lesão miocárdica é uma das complicações cardiovasculares mais comuns e é caracterizada pela elevação dos níveis de biomarcadores cardíacos, como troponina e creatina quinase-MB (CK-MB), em pacientes com COVID-19. Estudos têm demonstrado uma associação entre lesão miocárdica e maior gravidade da doença e desfechos desfavoráveis, incluindo necessidade de ventilação mecânica, internação em unidades de terapia intensiva (UTIs) e mortalidade hospitalar.^(37,38)

Além disso, a COVID-19 está associada a distúrbios do ritmo cardíaco, como taquicardia, fibrilação atrial e taquicardia ventricular, que podem aumentar o risco de complicações cardiovasculares graves, como insuficiência cardíaca, choque cardiogênico e morte súbita cardíaca.⁽³⁹⁾ A inflamação sistêmica e a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) podem desempenhar um papel importante na patogênese das arritmias associadas à COVID-19.

Outra complicação cardiovascular aguda observada em pacientes com COVID-19 é a ocorrência de eventos tromboembólicos, incluindo trombose

venosa profunda (TVP), embolia pulmonar (EP), AVC isquêmico e IAM.^(40,41) A inflamação sistêmica, a hipercoagulabilidade e a disfunção endotelial são fatores que contribuem para o aumento do risco de trombose em pacientes com COVID-19, especialmente aqueles em estado grave ou crítico da doença.

1.6 COVID-19 – Efeitos cardiovasculares crônicos

Os efeitos cardiovasculares crônicos do COVID-19 emergem como uma preocupação crescente à medida que mais evidências sugerem que a doença pode deixar sequelas duradouras no sistema cardiovascular. Estudos longitudinais têm demonstrado que mesmo após a recuperação aparente da infecção aguda, alguns pacientes continuam a apresentar disfunção cardiovascular persistente. Entre as sequelas mais comuns estão a disfunção ventricular esquerda, a redução da fração de ejeção (FE), a remodelação cardíaca adversa e a persistência de biomarcadores cardíacos elevados, como a troponina e a proteína C reativa.^(28,42)

A miocardite é uma complicação cardiovascular crônica frequentemente associada ao COVID-19. Esta condição inflamatória do miocárdio pode resultar em fibrose cardíaca, cicatrizes e disfunção sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo, predispondo os pacientes a insuficiência cardíaca crônica e arritmias cardíacas.⁽⁴³⁾ A inflamação persistente e a ativação imune inadequada podem desempenhar um papel significativo na patogênese da miocardite pós-COVID-19.

Além disso, a COVID-19 pode acelerar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares crônicas preexistentes, como aterosclerose, hipertensão arterial, doença coronariana e insuficiência cardíaca.^(44,45) A inflamação crônica, a disfunção endotelial e a ativação do SRAA podem contribuir para o agravamento e progressão dessas condições, aumentando o risco de eventos cardiovasculares adversos a longo prazo.

Complicações tromboembólicas crônicas também foram relatadas em pacientes após a recuperação da COVID-19, incluindo TVP, EP, AVC e eventos isquêmicos periféricos.^(21,46) A persistência da hipercoagulabilidade e da inflamação crônica pode contribuir para o desenvolvimento e recorrência desses eventos tromboembólicos ao longo do tempo.

Outras complicações cardiovasculares crônicas relacionadas à COVID-19 incluem a síndrome de taquicardia ortostática pósural (POTS), disautonomia cardíaca, síndrome de fadiga crônica e distúrbios do sono, que podem afetar negativamente a qualidade de vida e a capacidade funcional dos pacientes a longo prazo.^(47,48) A compreensão dessas sequelas cardiovasculares crônicas é essencial para garantir o acompanhamento adequado e o manejo precoce dos pacientes afetados, visando prevenir ou minimizar o impacto dessas complicações a longo prazo.

1.7 COVID-19 – Exercício Físico na Reabilitação Cardiopulmonar

A reabilitação cardiopulmonar em pacientes pós-COVID-19 desempenha um papel crucial na recuperação e na melhoria da qualidade de vida após a doença. Esses programas multidisciplinares visam restaurar a função cardiorrespiratória, reduzir sintomas persistentes e promover o retorno à atividade física e à funcionalidade normal. As intervenções de reabilitação cardiopulmonar para pacientes pós-COVID-19 geralmente incluem exercícios aeróbicos, treinamento de resistência, educação sobre estilo de vida saudável, gerenciamento do estresse e suporte psicológico.^(49,50)

Os exercícios aeróbicos, como caminhadas, ciclismo e natação, são fundamentais na reabilitação cardiopulmonar, pois ajudam a melhorar a capacidade cardiovascular, a resistência e a função pulmonar. O treinamento de resistência, por sua vez, fortalece os músculos respiratórios e periféricos, melhorando a capacidade de realização de atividades diárias e reduzindo a fadiga relacionada à doença.^(6,51)

A educação sobre estilo de vida saudável desempenha um papel importante na prevenção de complicações cardiovasculares e pulmonares a longo prazo, abordando fatores de risco modificáveis, como tabagismo, dieta pouco saudável, sedentarismo e estresse. Programas de reabilitação cardiopulmonar também fornecem orientação sobre estratégias de gerenciamento de sintomas, como dispneia, dor no peito e fadiga, ajudando os pacientes a desenvolverem habilidades para lidar com esses desafios.^(51,52)

Além disso, o suporte psicológico desempenha um papel crucial na reabilitação cardiopulmonar, pois muitos pacientes pós-COVID-19 enfrentam

ansiedade, depressão e estresse relacionados à doença e às preocupações com a saúde. Os programas de reabilitação oferecem aconselhamento individualizado, terapia cognitivo-comportamental e grupos de apoio para ajudar os pacientes a lidarem com o impacto emocional da COVID-19 e desenvolver estratégias de enfrentamento eficazes.^(53,54)

A reabilitação cardiopulmonar baseada em evidências demonstrou benefícios significativos na melhoria da capacidade funcional, qualidade de vida e resultados clínicos em pacientes pós-COVID-19. Estudos têm mostrado que a participação em programas de reabilitação cardiopulmonar está associada a uma redução na mortalidade, readmissões hospitalares e custos de saúde, além de uma melhora na função cardiorrespiratória e bem-estar psicológico dos pacientes.^(6,55)

Em resumo, a reabilitação cardiopulmonar desempenha um papel vital na recuperação e no manejo dos sintomas persistentes em pacientes pós-COVID-19. E o treinamento físico especializado é um componente fundamental para o sucesso desses programas multidisciplinares que oferecem uma abordagem abrangente e personalizada para ajudar os pacientes a reconstruírem sua saúde cardiovascular e pulmonar, recuperar a funcionalidade e retomar uma vida ativa e saudável após a doença.

1.8 Avaliação hemodinâmica por cardiografia por impedância

A avaliação hemodinâmica desempenha um papel crucial na compreensão da função cardíaca e na gestão de diversas condições clínicas. A cardiografia por impedância (ICG) emergiu como uma técnica não invasiva promissora para avaliação hemodinâmica, oferecendo insights precisos sobre o débito cardíaco (DC), resistência vascular periférica (RVP) e volume intravascular. A ICG baseia-se na medição das mudanças na impedância elétrica do tórax, relacionadas às variações de volume sanguíneo durante o ciclo cardíaco.⁽⁵⁶⁾ Esta técnica tem demonstrado ser particularmente útil em pacientes com insuficiência cardíaca, permitindo uma monitorização contínua e não invasiva da função cardíaca.⁽⁵⁷⁾

O equipamento PhysioFlow é um sistema avançado de ICG oferece uma abordagem inovadora para a avaliação hemodinâmica. Este dispositivo utiliza

um conjunto de eléctrodos multifásicos colocados no tórax do paciente para medir as variações de impedância ao longo do tempo, proporcionando uma estimativa precisa do DC e outros parâmetros hemodinâmicos.⁽⁵⁸⁾ Além disso, o PhysioFlow oferece a vantagem adicional de ser portátil e fácil de usar, o que o torna uma ferramenta versátil para a monitorização contínua em ambientes clínicos e ambulatoriais.⁽⁵⁹⁾

Estudos clínicos têm validado a eficácia do equipamento PhysioFlow em diversas condições, incluindo insuficiência cardíaca, choque séptico e hipovolemia. Por exemplo, uma pesquisa de Scharf et al.⁽⁵⁸⁾ demonstrou a capacidade do PhysioFlow em detectar alterações hemodinâmicas precoces em pacientes com choque séptico, permitindo uma intervenção rápida e precisa. Esses achados destacam o potencial do PhysioFlow como uma ferramenta invaluable na avaliação hemodinâmica e no gerenciamento de pacientes criticamente enfermos.

Em resumo, a ICG e o equipamento PhysioFlow representam avanços significativos na avaliação hemodinâmica não invasiva. Com sua precisão, facilidade de uso e capacidade de monitoramento contínuo, essas tecnologias desempenham um papel vital na otimização do manejo clínico de uma variedade de condições cardiovasculares e hemodinâmicas.

2. Objetivos

2.1 Objetivo primário

Avaliar os efeitos de um programa de exercício físico combinado na performance hemodinâmica e cardiopulmonar de pacientes pós-COVID-19 através da cardiografia por impedância.

2.2 Objetivo secundário

Avaliar se o programa de exercício proposto pode se relacionar com a modulação da resposta imunológica celular e humoral sistêmica nesta população.

3. Material e métodos

3.1 Recrutamento e seleção dos voluntários

Os voluntários foram recrutados através das redes sociais e de divulgação nas Unidades de Pronto Atendimento (UPA) e Unidades Básica de Saúde (UBS) do município de São José dos Campos-SP. Foram recrutados indivíduos de ambos os sexos entre 18 e 85 anos de idade, que tenham tido COVID-19, comprovadamente por meio de exame de RT-PCR ou antígeno, os quais foram posteriormente estratificados em pacientes moderados e graves, de acordo com os critérios adotados pela Organização Mundial de Saúde (OMS).⁽⁶⁰⁾

3.2 Protocolo Experimental

Foram estudados 33 pacientes pós-COVID-19, classificados com critério de gravidade entre moderado e grave de acordo com os critérios adotados pela OMS.

Os indivíduos foram avaliados antes do início do projeto e após 90 dias de reabilitação. Foram considerados indivíduos pós-COVID-19 moderados, àqueles que apresentaram teste rápido positivo ou teste de antígeno positivo ou teste de RT-PCR, e que apresentaram os seguintes sintomas: tosse seca, coriza, inflamação de garganta, dores corporais difusas, hipertermia persistente, sem hipoxemia. Foram considerados indivíduos pós-COVID-19 graves, aqueles, que além de algum ou vários dos sintomas descritos acima, apresentarem hipoxemia (saturação de oxigênio – $SPO_2 \leq 93\%$) necessitando de internação com ou sem suporte ventilatório (invasivo ou não invasivo).⁽⁶⁰⁾

3.3 Protocolo de Exercícios

O programa de exercícios foi constituído de 3 sessões semanais em dias alternados de 5 minutos de aquecimento, 5 minutos de alongamento, 20 minutos de exercício aeróbio contínuo de intensidade moderada, 20 minutos de exercício resistido de intensidade moderada, 10 minutos de alongamento para o

resfriamento. O treinamento físico aeróbio foi realizado em esteira ou em bicicleta ergométrica, de acordo com a preferência do voluntário do estudo, mas foi realizado em intensidade leve para moderada (iniciando-se a 60% da frequência cardíaca máxima e aumentando-se a intensidade em 2% a cada semana), por um período de 20 minutos. O treinamento físico resistido, foi realizado a uma intensidade moderada, correspondendo a 75% da carga máxima, e foram executadas 4 séries de 10-15 repetições, com intervalos de descanso de 1 minuto entre as séries. Foram realizados os seguintes exercícios: Supino Reto, Puxador Alto, Elevação Lateral, Extensão de Pernas, Flexão de Pernas e Elevação nas pontas dos pés. Os exercícios de alongamento foram realizados com exercícios clássicos para membros superiores e inferiores.

3.4 Avaliação hemodinâmica por cardiografia por impedância

A ecocardiografia por impedância foi realizada utilizando-se o equipamento Physioflow® (Bristol, EUA), que fornece medições contínuas, precisas, reprodutíveis e sensíveis da frequência cardíaca (FC), do DC, volume sistólico (VS), índice cardíaco (IC), FE, e o volume diastólico final (VDF), índice de fluido torácico (IFT) e a RVP. Os voluntários foram orientados a despir-se (retirando a camiseta/camisa/blusa) e se deitar na maca em decúbito dorsal, e assim realizou-se a assepsia com álcool 70% das áreas onde os 6 eletrodos foram posicionados. Após o posicionamento dos eletrodos, foi aguardado 1 minuto para estabilização dos sinais. Após esse período de estabilização do sinal, iniciou-se a gravação do sinal por um período de 3 minutos.

3.5 Coleta, Processamento e Análise do Sangue

10 ml de sangue venoso foram coletados, após 10 minutos de repouso, utilizando-se material estéril à vácuo, dos quais 5 ml foram coletados em tubo contendo anticoagulante EDTA K3 e 5 ml coletados em tubo contendo fator pró-coagulação. Após a coleta, 25 microlitros do sangue coletado em tubo contendo EDTA K3 foi utilizado para a realização do hemograma completo, com equipamento Sysmex XS-800i. Em seguida, os dois tubos de sangue coletados

foram centrifugados a 1000g, 7 minutos a 4°C e o soro e o plasma foram armazenados a -86°C para a dosagem de citocinas.

3.6 Medidas dos Níveis de Citocinas

Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-1RA, IL-10, IFN- β e IFN- γ foram medidos no ar condensado, e no soro e/ou plasma dos voluntários utilizando-se kits de ELISA DuoSet (R&D Systems, EUA) e ELISA Max Deluxe (Biolegend, EUA). As leituras foram realizadas conforme instrução do fabricante, utilizando-se a multileitora SpectraMax i3 (Molecular Devices, EUA). Os resultados foram apresentados em pg/mL.

3.7 Análise Estatística

O software GraphPad Prism 5.0 foi utilizado para a avaliação da análise estatística e construção dos gráficos. A normalidade dos dados foi avaliada utilizando-se o teste de Pearson. Os dados com distribuição paramétrica foram avaliados através do teste ONE WAY ANOVA seguido do teste Newman-Keuls. Os dados com distribuição não paramétrica foram avaliados pelo teste ANOVA ON RANKS seguido do teste de Dunns para comparação entre os grupos. O valor a partir de $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados

4.1 Caracterização Clínico-laboratorial dos Voluntários Pós-COVID-19

A tabela 1 demonstra as características clínico-laboratoriais dos voluntários Pós-COVID-19.

Tabela 1. Características clínicas e laboratoriais dos voluntários pós-COVID-19. Voluntários submetidos à reabilitação (n = 33). Resultados expressos como média e desvio padrão.

Parâmetros	Antes	Depois	P Valor
Idade (anos)	45.44 (3,5)	46.52 (3,1)	0.2737
Peso (kg)	74.03 (4,2)	65.89 (6,3)	0.0002
Altura (m)	1,68 (4,2)	1,68 (4,6)	0.5086
IMC (kg/m ²)	30.43 (2,3)	25.88 (3,5)	0.0002
Pressão arterial sistólica (mmHg)	142,1(1,4)	118,1(1,4)	0.0002
Pressão arterial diastólica (mmHg)	95,4 (0,7)	74,4 (0,9)	0.0002
Circunferência de cintura (cm)	92.24 (4,7)	78.85 (1,6)	0.0004
Leucócitos totais (células/mm ³)	7.96 (2,0)	6.22 (2,7)	0.5940
Basófilos (células /mm ³)	34.5 (7,0)	26.8 (8,7)	0.0089
Monócitos (células /mm ³)	414.5 (4,1)	218.42 (3,2)	0.0026
Eosinófilos (células /mm ³)	158.22 (2,6)	146.42 (2,8)	0.7044
Linfócitos (células /mm ³)	3.5 (2,4)	2.46 (2,8)	0.2544
Neutrófilos (células /mm ³)	4.25 (2,3)	2.52 (2,3)	0.0004
Razão linfócito/neutrófilo (células /mm ³)	10,31 (0,54)	1,88 (0,21)	0.0001
Frequência cardíaca de repouso (bpm)	112.2 (3,2)	85,6 (2,5)	0.0001
Massa gorda (%)	42.57 (4,2)	35.89 (2,4)	0.0001
Massa livre de gordura (%)	62.35 (3,5)	64.48 (4,6)	0.0002
SpO ₂ % de Repouso	92.05 (0,6)	97.25 (0,8)	0.0001
Sexo (M/F) #	14/19	-----	-----

IMC: índice de massa corpórea; SpO₂%; saturação parcial de oxigênio.

4.2 Efeitos do programa sobre a Hemodinâmica Cardiovascular

Os resultados apresentados na Figura 1 demonstram que os exercícios reduziram significativamente a **frequência cardíaca de repouso (heart rate)**.

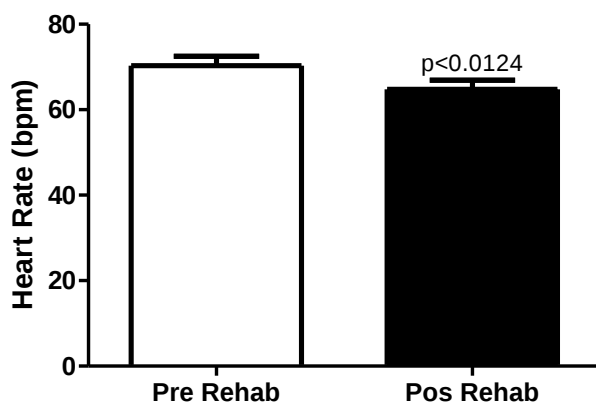


Figura 1. Efeitos sobre a frequência cardíaca de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 2 evidenciam que o programa melhorou significativamente o **VS (stroke volume)**.

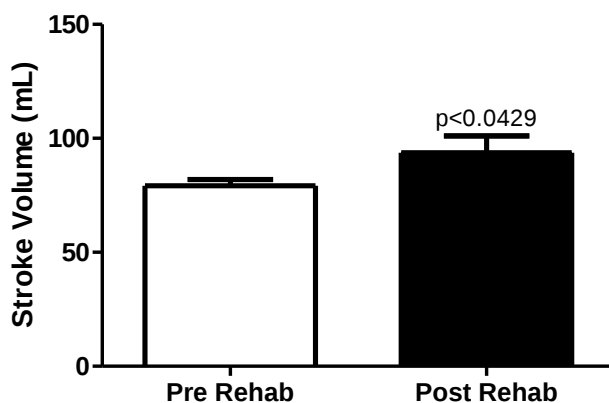


Figura 2. Efeitos do programa sobre o volume sistólico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 3 demonstram que o programa melhorou significativamente o **índice do VS (stroke volume index)**.

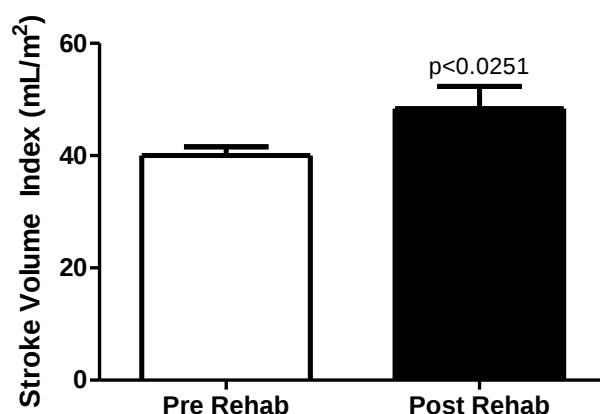


Figura 3. Efeitos do programa sobre o índice do volume sistólico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 4 demonstram que o programa não alterou significativamente o **DC (cardiac output)**.

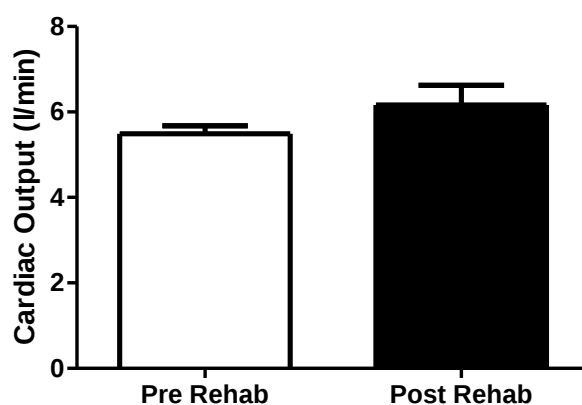


Figura 4. Efeitos do programa sobre o débito cardíaco de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 5 demonstram que o programa não alterou significativamente o **IC (DC corrigido pela superfície corporal; cardiac output)**.

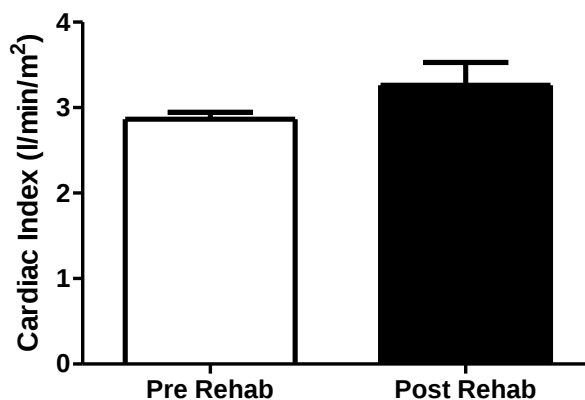


Figura 5. Efeitos do programa sobre o índice cardíaco de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 6 demonstram que o programa não alterou significativamente a **resistência vascular sistêmica (Systemic Vascular Resistance)**.

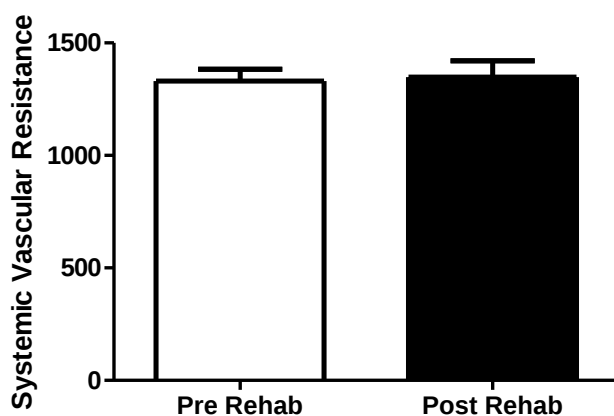


Figura 6. Efeitos do programa sobre a resistência vascular sistêmica de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 7 demonstram que o programa não alterou significativamente o **índice da resistência vascular sistêmica (Systemic Vascular Resistance Index)**.

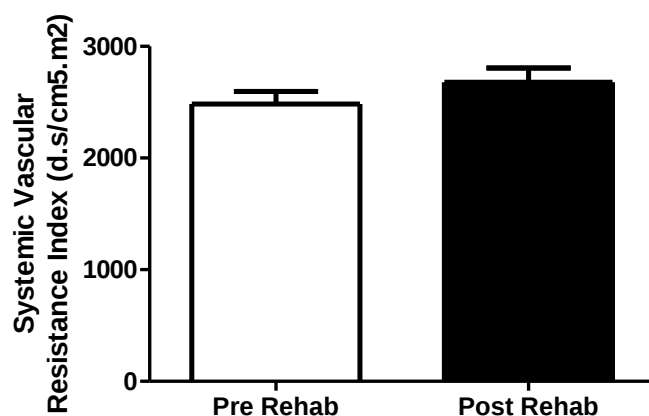


Figura 7. Efeitos do programa sobre o índice da resistência vascular sistêmica de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 8 demonstram que a reabilitação cardiopulmonar não alterou significativamente **o índice de trabalho do ventrículo esquerdo (Left Cardiac Work Index)**.

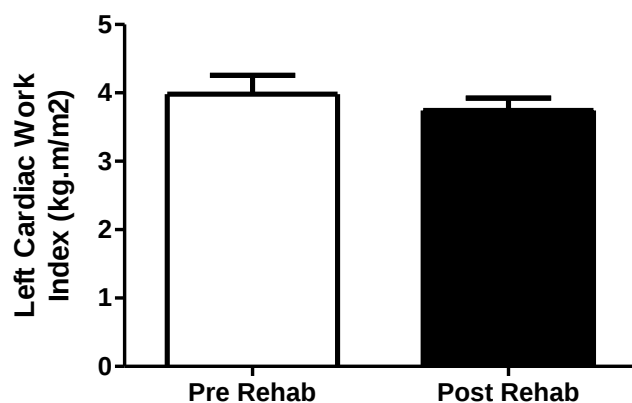


Figura 8. Efeitos do programa sobre índice de trabalho do ventrículo esquerdo de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 9 demonstram que o programa não alterou significativamente **a FE estimada (Ejection Fraction Estimated %)**.

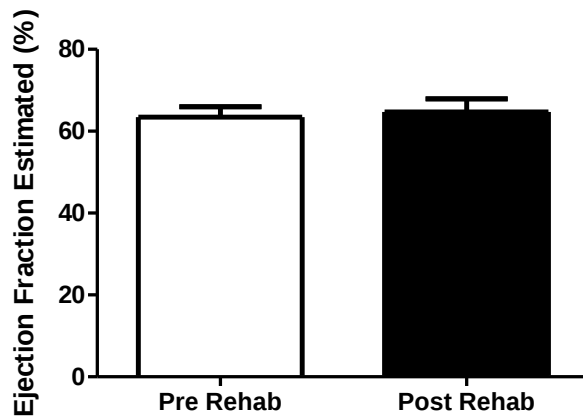


Figura 9. Efeitos do programa sobre a fração de ejeção de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 10 demonstram que o programa não alterou significativamente o **VDF (End Diastolic Volume)**.

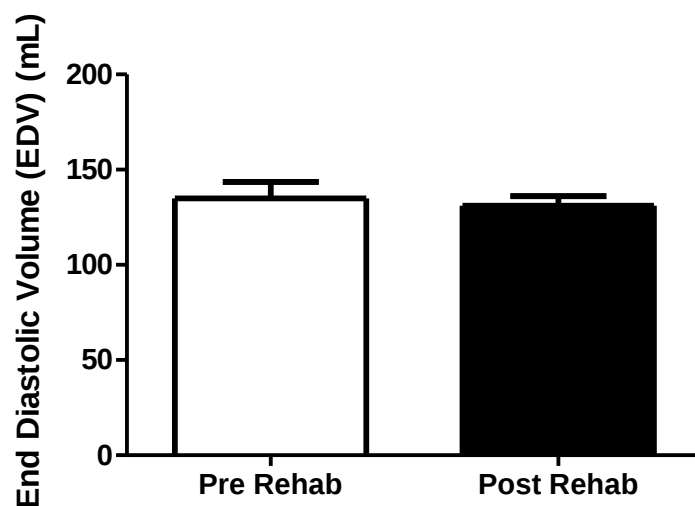


Figura 10. Efeitos do programa sobre o volume diastólico final de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 11 demonstram que o programa não alterou significativamente o **índice de fluido torácico (Thoracic Fluid Index)**.

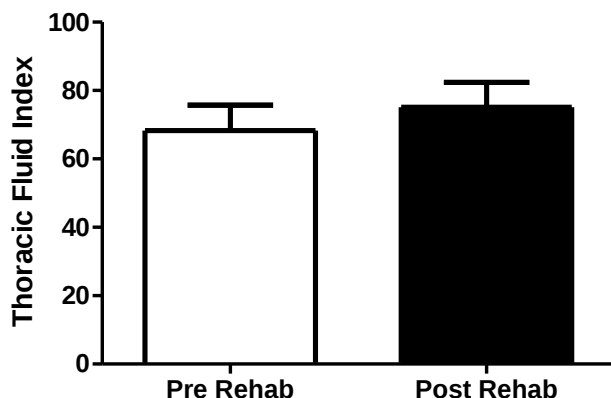


Figura 11. Efeitos do programa sobre o índice de fluidos torácico de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 12 demonstram que o programa melhorou significativamente **a taxa de função diastólica precoce (%) [Early Diastolic Function Ratio (%)]**.

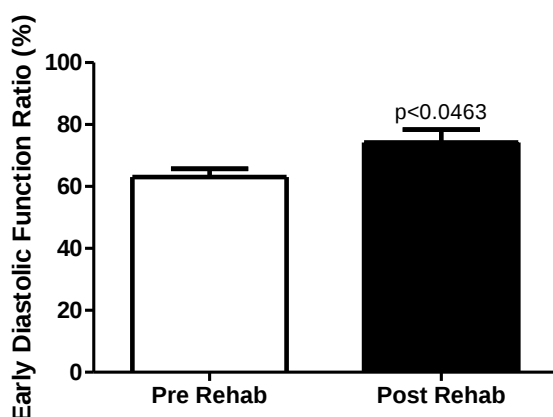


Figura 12. Efeitos do programa sobre a taxa de função diastólica precoce (%) de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 13 demonstram que o programa reduziu significativamente **os níveis séricos da citocina pró-inflamatória, interleucina 1 beta (Serum IL-1 β)**.

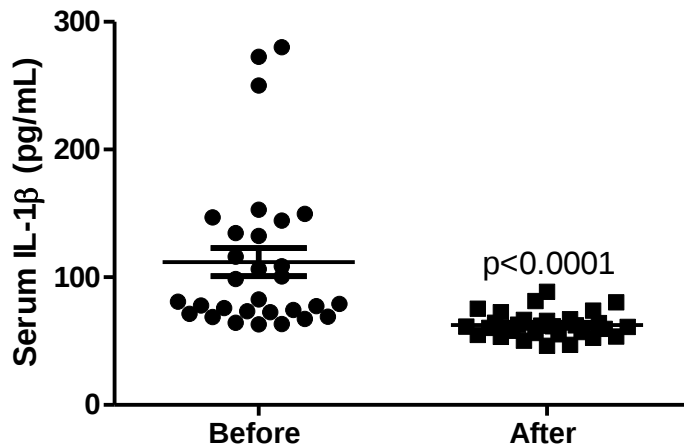


Figura 13. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-1 β de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 14 demonstram que o programa reduziu significativamente **os níveis séricos da citocina pró-inflamatória, interleucina 6 (Serum IL-6)**.

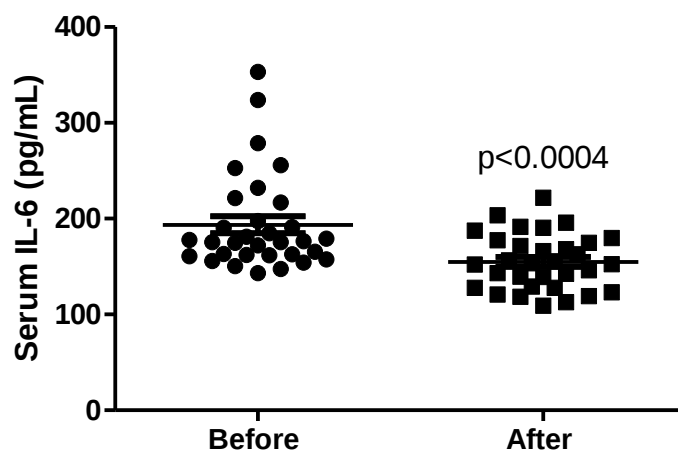


Figura 14. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-6 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 15 demonstram que o programa reduziu significativamente **os níveis séricos da citocina pró-inflamatória, interleucina 2 (Serum IL-2)**.

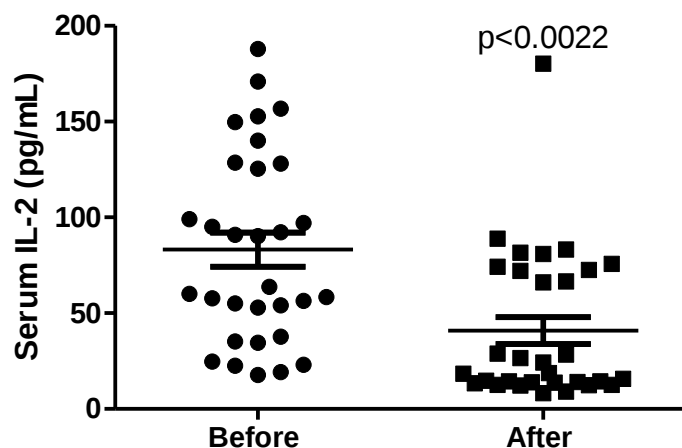


Figura 15. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-2 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 16 demonstram que o programa aumentou significativamente **os níveis séricos da citocina anti-inflamatória, interleucina 1 RA (Serum IL-1RA)**.

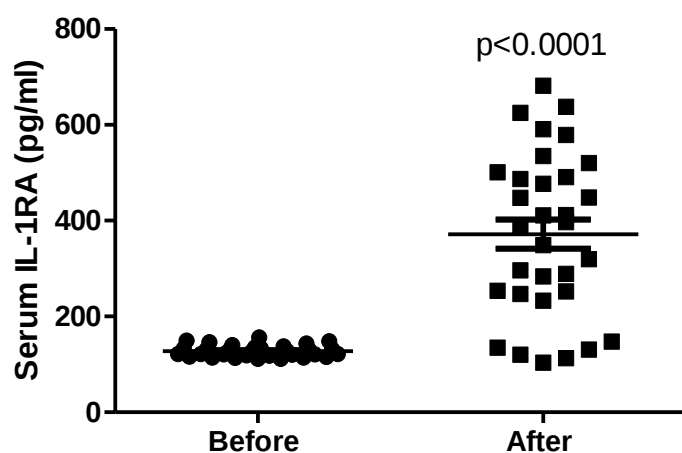


Figura 16. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-1RA de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 17 demonstram que o programa aumentou significativamente **os níveis séricos da citocina anti-inflamatória, interleucina 10 (Serum IL-10)**.

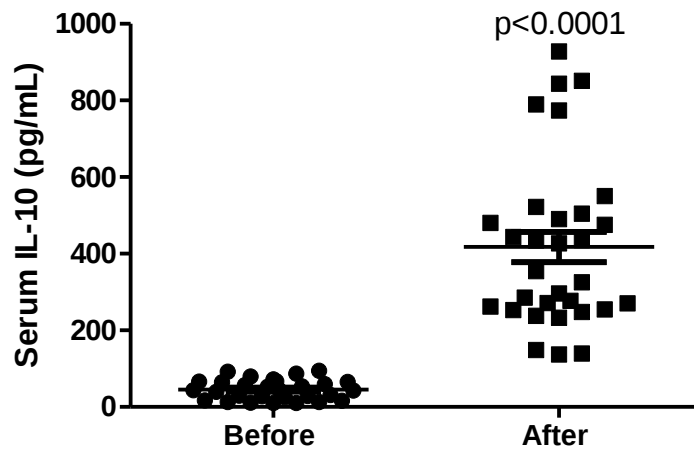


Figura 17. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IL-10 de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 18 demonstram que o programa aumentou significativamente **os níveis séricos da citocina anti-inflamatória, interferon beta (Serum IFN-beta).**

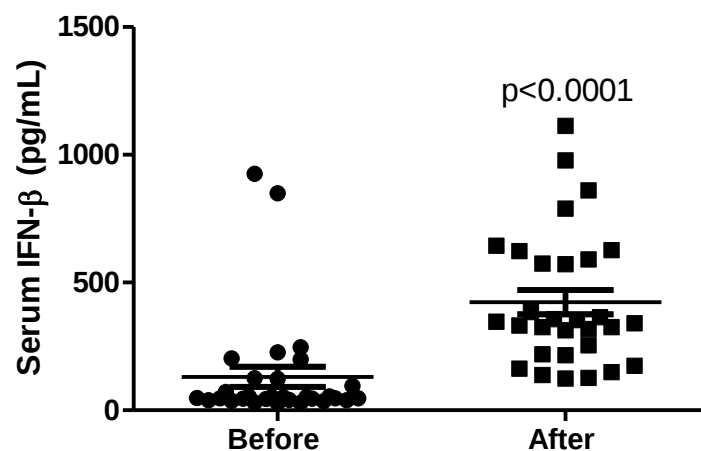


Figura 18. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IFN-β de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

Os resultados apresentados na Figura 19 demonstram que o programa aumentou significativamente **os níveis séricos da citocina antiviral, interferon gama (Serum IFN-gama).**

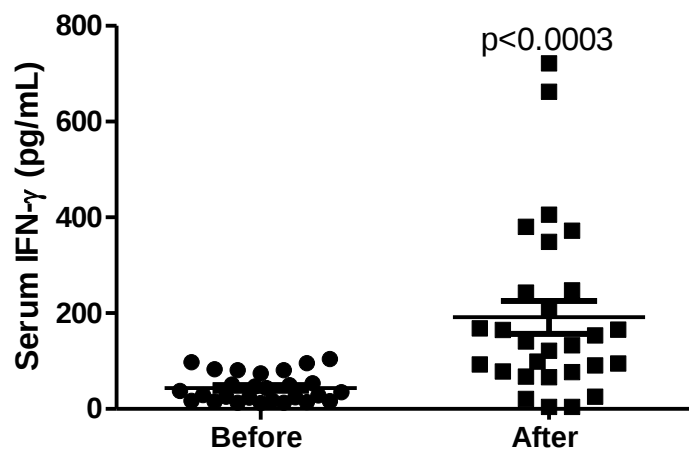


Figura 19. Efeitos do programa sobre os níveis séricos de IFN- γ de voluntários pós-COVID-19 (n = 33).

5. Discussão

O presente estudo demonstrou que as alterações hemodinâmicas cardiovasculares induzidas pela COVID-19 são persistentes e silenciosas e necessitam de intervenção. Nesse sentido esse estudo também demonstra que um “programa combinado”, constituído por exercícios aeróbios e resistidos, foi capaz de reestabelecer uma resposta hemodinâmica cardiovascular normal.

Um estudo recente envolvendo 5 milhões de pacientes descobriu que indivíduos que sobreviveram à COVID-19 enfrentaram um risco marcadamente maior—até 2.000%—de desenvolver problemas cardiovasculares (como infarto e arritmias), problemas pulmonares (incluindo hipoxemia e dispneia), distúrbios metabólicos (como diabetes e dislipidemia) e condições neurológicas (tais como comprometimento cognitivo, distúrbios do sono e infarto cerebral) dentro de 1 a 6 meses após a infecção.⁽⁶¹⁾ Nesse sentido, o presente trabalho reforça esses achados, mas de uma maneira aprofundada, por mostrar quais alterações hemodinâmicas cardiovasculares estão alteradas no paciente pós-COVID-19 de gravidade moderada e grave através da cardiografia por impedância. Além disso, o presente estudo aponta para a importância da intervenção com base em exercícios físicos precoce nesses pacientes, uma vez que alterações hemodinâmicas cardiovasculares foram revertidas através de 3 meses de intervenção com exercício combinado, realizados 3x por semana.

Inicialmente observamos que a frequência cardíaca de repouso foi reduzida significativamente. Tais efeitos são particularmente importantes, uma vez que o aumento da FC na pós-COVID-19 tem sido reportado como uma alteração típica na pós-COVID-19, normalmente devido ao desbalanço autonômico.⁽⁶²⁾ Entretanto, no presente estudo não pudemos realizar a análise do balanço/desbalanço autonômico através da VFC, o que constitui uma limitação do presente estudo, através do qual poderíamos verificar se os efeitos positivos bradicárdicos observados após os 3 meses do programa foram em decorrência da melhora da resposta autonômica.

Além da diminuição da frequência cardíaca de repouso, o presente estudo observou uma redução da pressão arterial sistólica e diastólica de repouso. Esse resultado é extremamente importante levando-se em consideração que apesar

de ser um fator de risco para quase todos os eventos cardiovasculares adversos, doenças renais e danos aos órgãos terminais conhecidos, a importância da hipertensão arterial é frequentemente subestimada pelos clínicos⁽⁶³⁾ além de ser uma doença silenciosa. No caso da pós-COVID-19, esse fator passa a ser ainda mais importante, pois muitos pacientes apresentando pós-COVID-19 não eram hipertensos antes da COVID-19, e muito facilmente não se atentarão em avaliar e acompanhar sua pressão arterial após terem contraído da COVID-19. Além disso, é sabido que a hipertensão arterial resultará em alterações do VS final resultando em um menor VS.⁽⁶⁴⁾ Interessantemente, no presente estudo, observamos exatamente o clássico explicado acima pela literatura científica, onde juntamente com a redução da pressão arterial sistêmica (sistólica e diastólica), observamos uma melhora significativa no VS, no índice do VS, e no VDF, o que é resultante da diminuição da pressão arterial sistêmica.⁽⁶⁴⁾

O presente estudo também avaliou o VS nesses pacientes com pós-COVID-19, mostrando uma melhora significativa, não somente do VS, mas também do índice de VS, que é o VS corrigido pela superfície corporal, reforçando ainda mais os dados, com 3 meses de reabilitação cardiopulmonar. É importante ressaltar que indivíduos com baixo VS que já tiveram um evento cardiovascular apresentam aumentado índice de mortalidade por eventos cardiovasculares nos 10 anos seguintes, comparados àqueles com VS normal.⁽⁶⁴⁾ Além disso, a literatura demonstra que o VS indica um funcionamento melhor e mais eficiente da bomba cardíaca e também da perfusão sanguínea.⁽⁶⁵⁾ Dessa forma, é possível afirmar que uma vez que o programa diminuiu a FC, o duplo produto, a pressão arterial sistólica e diastólica e aumentou o VS, de que este programa de exercício combinado exerceu importante fator não só de reabilitação, mas também de cardioproteção para esses pacientes com pós-COVID-19. Entretanto, essas melhoras observadas nos parâmetros descritos acima não foram evidenciadas no DC, no IC, na resistência vascular sistêmica, no índice da resistência vascular sistêmica, no índice de trabalho do ventrículo esquerdo, na FE, no VDF, e no IFT.

Por outro lado, além da melhora da FC, pressão arterial sistólica e diastólica, duplo produto, VS e índice do VS, o programa também melhorou a taxa de função diastólica precoce, sugerindo uma melhora na capacidade de preenchimento dos ventrículos e uma melhora na função diastólica. De fato, um

decréscimo da função diastólica tem sido reportado em pacientes pós-COVID-19 por períodos de até 6 meses da infecção.⁽⁶⁶⁾ Entretanto, esse é o primeiro estudo demonstrando que um programa de 3 meses de exercício combinado foi capaz de melhorar significativamente a taxa de função diastólica precoce (função diastólica), reforçando mais uma vez, a importância da intervenção precoce com treinamento físico especializado nos pacientes pós-COVID-19.

Boa parte dos pacientes pós-COVID-19 apresentam um distúrbio autonômico cardiovascular chamado disautonomia, o qual leva a alterações hemodinâmicas cardiovasculares. No entanto, os mecanismos autonômicos patofisiológicos precisos que causam essa condição ainda não são totalmente compreendidos. As teorias atuais sugerem causas potenciais como neurotropismo, tempestades de citocinas e inflamação persistente.⁽⁶⁷⁾ Nesse sentido, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que um programa de exercício combinado foi capaz de diminuir os níveis séricos das principais citocinas pró-inflamatórias relacionadas à tempestade de citocinas da COVID-19, sendo elas a IL-1 β , IL-2, IL-6. Além disso, de maneira inédita, o programa de exercícios proposto induziu um aumento nos níveis séricos das citocinas anti-inflamatórias IL-1RA e IL-10 além de aumentar também os níveis das citocinas com propriedades antivirais interferon beta (IFN- β) e interferon gama (IFN- γ).

Especificamente sobre a IL-1 β , níveis aumentados dessa citocina pró-inflamatória foram encontradas tanto no lavado broncoalveolar (LBA) quanto no plasma / soro de pacientes com COVID-19 moderados, graves e críticos, em comparação com àqueles com nível de severidade leve e controles não portadores de COVID-19.⁽⁶⁸⁾ Além disso, os níveis aumentados de IL-1 β têm sido associados com a insuficiência cardíaca em pacientes com COVID-19 críticos.⁽⁶⁸⁾ Nesse sentido, embora não possamos estabelecer uma relação causal entre o efeito supressor do programa sobre os níveis de IL-1 β com a melhora observada na hemodinâmica cardíaca no presente estudo em pacientes com pós-COVID-19 de gravidade moderada e grave, estudos futuros poderão esclarecer essa possível relação causal.

Além da IL-1 β , a rotina de exercícios foi capaz de reduzir os níveis de IL-2. A importância desse efeito se deve ao fato de níveis aumentados de IL-2 estarem associados à disfunção cardíaca na COVID-19, além de estar associada ao desenvolvimento do remodelamento cardíaco na COVID-19.⁽⁶⁹⁾

Classicamente, níveis aumentados de IL-2 também foram associados com diminuição severa do cronotropismo e depressão cardíaca.⁽⁷⁰⁾ Entretanto, esclarecemos que não podemos associar diretamente os efeitos observados pós programa a disfunção e remodelamento cardíaco, nem mesmo com diminuição do cronotropismo e depressão, cardíaca, embora esses efeitos foram observados em paralelo no presente estudo.

A literatura demonstra que níveis sistêmicos aumentados de IL-6 na COVID-19 estão associados com aumento da mortalidade e morbidade, e estão especificamente associados com a disfunção cardíaca.⁽⁷¹⁾ Um estudo também revelou que pacientes hospitalizados com COVID-19 que apresentavam níveis significativamente mais altos de IL-6 experimentaram desfechos clínicos piores, incluindo maiores taxas de admissão na UTI e mortalidade.⁽⁷²⁾ Além disso, níveis aumentados e persistentes de IL-6 têm sido associados à lesão miocárdica no paciente pós-COVID-19 em razão da inflamação.⁽⁷³⁾ Nesse sentido, os efeitos observados do programa proposto na diminuição dos níveis de IL-6 nos pacientes pós-COVID-19 de gravidade moderada e grave, seguidos da melhora da hemodinâmica cardiovascular observadas no presente estudo, apontam novamente para a importância da intervenção precoce com exercícios combinados para se evitar o desenvolvimento e o agravamento de afecções cardiovasculares.

De outro lado, a análise das citocinas anti-inflamatórias IL-1RA e IL-10, revelaram que o programa aumentou significativamente os níveis de IL-1RA e IL-10. Interessantemente, níveis elevados de IL-1RA e IL-10 no início dos sintomas da COVID-19 foram associados com pior prognóstico da doença e com a manifestação das formas mais graves da doença.⁽⁷⁴⁾ Por outro lado, em casos de miocardite induzida pela segunda dose de vacina contra o SARS-CoV-2, uma baixa expressão de IL-1RA no tecido cardíaco e baixos níveis sanguíneos de IL-1RA foram encontrados em 75% dos pacientes de 14 a 21 anos de idade e em menor proporção em pacientes de 21 a 79 anos de idade, sugerindo um importante papel anti-inflamatório e protetor da IL-1RA para o tecido cardíaco.⁽⁷⁵⁾ Nesse sentido, o presente estudo demonstrou pela primeira vez que um programa semanal baseado em exercício físico combinado foi capaz de aumentar os baixos níveis encontrados de IL-1RA e IL-10 nos pacientes pós-

COVID-19 de gravidade moderada e grave, reforçando a importância da desse tipo de intervenção para estes pacientes.

Além da avaliação das citocinas pró e anti-inflamatórias, o presente estudo também avaliou pela primeira vez os efeitos do exercício combinado sobre os níveis das citocinas com efeitos antivirais, IFN- β e IFN- γ , demonstrando que o programa elevou significativamente os níveis dessas citocinas após os 3 meses de intervenção. Esses resultados são extremamente significativos e de importância clínica, uma vez que níveis reduzidos de IFN- γ durante a fase inicial da COVID-19 foram fortemente associados com formas mais graves da COVID-19 e com elevada mortalidade e morbidade.⁽⁷⁶⁾ O IFN- γ é um dos principais interferons para lidar com infecções virais, pois restringe a replicação viral ao estimular os linfócitos T para a produção de citocinas, além de ativar os linfócitos T citotóxicos, contribuindo para a inativação viral.⁽⁷⁶⁾ Além disso, inúmeros estudos demonstraram que tanto o IFN- γ quanto o IFN- β reduzem a replicação do SARS-CoV-2 e apresentam um papel antiviral sinérgico contra o vírus.^(76,77) Dessa forma, embora o presente estudo não tenha realizado um estudo *in vitro* com o sangue dos pacientes voluntários do estudo, antes e após os 3 meses de intervenção, através do qual poderíamos avaliar diretamente o quanto o programa inibiu a replicação viral, o presente estudo é o primeiro a demonstrar que o exercício combinado recorrente aumenta os níveis dessas citocinas, IFN- γ e IFN- β , as quais possuem um clássico papel antiviral.

6. Conclusão

Concluimos que um programa de treinamento físico combinado, composto de exercícios aeróbicos de resistência cardiovascular e resistidos para ganho de competência musculoesquelética, realizado com frequência de 3x/semana pelo período de 03 meses, foi capaz de melhorar a resposta hemodinâmica cardiovascular, e gerar uma intensa regulação imunológica, caracterizada pela redução das citocinas pró-inflamatórias, aumento das citocinas anti-inflamatórias e aumento das citocinas antivirais, demonstrando que intervenções com esse tipo de programa podem ter efeitos benéficos e devem ser adotadas precocemente em pacientes pós-COVID-19 de gravidade moderada e grave.

7. Referências bibliográficas

1. Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020;579(7798):270-3. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7.
2. Schmidt B, Crepaldi MA, Bolze SDA, Neiva-Silva L, Demenech LM. Saúde mental e intervenções psicológicas diante da pandemia do novo coronavírus (COVID-19). *Estud Psicol*. 2020;37:e200063. doi: 10.1590/1982-0275202037e200063
3. Mesenburg MA, Hallal PC, Menezes AMB, Barros AJD, Horta BL, Hartwig FP, et al. Prevalence of symptoms of COVID-19 in the state of Rio Grande do Sul: results of a population-based study with 18,000 participants. *Rev Saude Publica*. 2021;55:82. doi: 10.11606/s1518-8787.2021055004030.
4. Gandhi M, Yokoe DS, Havlir DV. Asymptomatic Transmission, the Achilles' Heel of Current Strategies to Control Covid-19. *N Engl J Med*. 2020;382(22):2158-60. doi: 10.1056/NEJMe2009758.
5. Polack FP, Thomas SJ, Kitchin N, Absalon J, Gurtman A, Lockhart S, et al. Safety and Efficacy of the BNT162b2 mRNA Covid-19 Vaccine. *N Engl J Med*. 2020;383(27):2603-15. doi: 10.1056/NEJMoa2034577.
6. Liu X, Huang J, Li C, Zhao Y, Wang D, Huang Z, et al. The role of seasonality in the spread of COVID-19 pandemic. *Environ Res*. 2021;195:110874. doi: 10.1016/j.envres.2021.110874.
7. Li LQ, Huang T, Wang YQ, Wang ZP, Liang Y, Huang TB, et al. Response to Char's comment: Comment on Li et al: COVID-19 patients' clinical characteristics, discharge rate, and fatality rate of meta-analysis. *J Med Virol*. 2020;92(9):1433. doi: 10.1002/jmv.25924.
8. Lauer SA, Grantz KH, Bi Q, Jones FK, Zheng Q, Meredith HR, et al. The Incubation Period of Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) From Publicly Reported Confirmed Cases: Estimation and Application. *Ann Intern Med*. 2020;172(9):577-82. doi: 10.7326/M20-0504.

9. Oran DP, Topol EJ. Prevalence of Asymptomatic SARS-CoV-2 Infection: A Narrative Review. *Ann Intern Med.* 2020;173(5):362-7. doi: 10.7326/M20-3012.
10. Williamson EJ, Walker AJ, Bhaskaran K, Bacon S, Bates C, Morton CE, et al. Factors associated with COVID-19-related death using OpenSAFELY. *Nature.* 2020;584(7821):430-6. doi: 10.1038/s41586-020-2521-4.
11. Kirby T. Evidence mounts on the disproportionate effect of COVID-19 on ethnic minorities. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):547-548. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30228-9.
12. Pareek M, Bangash MN, Pareek N, Pan D, Sze S, Minhas JS, et al. Ethnicity and COVID-19: an urgent public health research priority. *Lancet.* 2020;395(10234):1421-2. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30922-3.
13. Davis HE, Assaf GS, McCorkell L, Wei H, Low RJ, Re'em Y, et al. Characterizing long COVID in an international cohort: 7 months of symptoms and their impact. *EClinicalMedicine.* 2021;38:101019. doi: 10.1016/j.eclinm.2021.101019.
14. Planas D, Veyer D, Baidaliuk A, Staropoli I, Guivel-Benhassine F, Rajah MM, et al. Reduced sensitivity of SARS-CoV-2 variant Delta to antibody neutralization. *Nature.* 2021 Aug;596(7871):276-280. doi: 10.1038/s41586-021-03777-9.
15. Hoffmann M, Kleine-Weber H, Schroeder S, Krüger N, Herrler T, Erichsen S, et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020;181(2):271-280.e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052.
16. Lan J, Ge J, Yu J, Shan S, Zhou H, Fan S, et al. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;58:215-20. doi: 10.1038/s41586-020-2180-5.
17. Jose RJ, Manuel A. COVID-19 cytokine storm: the interplay between inflammation and coagulation. *Lancet Respir Med.* 2020;8(6):e46-7. doi: 10.1016/S2213-2600(20)30216-2.
18. Mehta P, McAuley DF, Brown M, Sanchez E, Tattersall RS, Manson JJ, et al. COVID-19: consider cytokine storm syndromes and

- immunosuppression. *Lancet*. 2020;395(10229):1033-4. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30628-0.
19. Ragab D, Salah Eldin H, Taeimah M, Khattab R, Salem R. The COVID-19 Cytokine Storm; What We Know So Far. *Front Immunol*. 2020;11:1446. doi: 10.3389/fimmu.2020.01446.
 20. Siddiqi HK, Mehra MR. COVID-19 illness in native and immunosuppressed states: A clinical-therapeutic staging proposal. *J Heart Lung Transplant*. 2020;39(5):405-7. doi: 10.1016/j.healun.2020.03.012.
 21. Connors JM, Levy JH. COVID-19 and its implications for thrombosis and anticoagulation. *Blood*. 2020;135(23):2033-40. doi: 10.1182/blood.2020006000.
 22. Iba T, Levy JH, Levi M, Thachil J. Coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost*. 2020;18(9):2103-9. doi: 10.1111/jth.14975.
 23. Diao B, Wang C, Tan Y, Chen X, Liu Y, Ning L, et al. Reduction and Functional Exhaustion of T Cells in Patients With Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *Front Immunol*. 2020;11:827. doi: 10.3389/fimmu.2020.00827.
 24. Zheng YY, Ma YT, Zhang JY, Xie X. COVID-19 and the cardiovascular system. *Nat Rev Cardiol*. 2020;17(5):259-60. doi: 10.1038/s41569-020-0360-5.
 25. Nalbandian A, Sehgal K, Gupta A, Madhavan MV, McGroder C, Stevens JS, et al. Post-acute COVID-19 syndrome. *Nat Med*. 2021;27:601-15. doi: 10.1038/s41591-021-01283-z.
 26. Carfi A, Bernabei R, Landi F, Gemelli Against COVID-19 Post-Acute Care Study Group. Persistent Symptoms in Patients After Acute COVID-19. *JAMA*. 2020;324(6):603-5. doi: 10.1001/jama.2020.12603.
 27. Logue JK, Franko NM, McCulloch DJ, McDonald D, Magedson A, Wolf CR, et al. Sequelae in Adults at 6 Months After COVID-19 Infection. *JAMA Netw Open*. 2021;4(2):e210830. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.0830. Erratum in: *JAMA Netw Open*. 2021;4(3):e214572. doi: 10.1001/jamanetworkopen.2021.4572.
 28. Huang C, Huang L, Wang Y, Li X, Ren L, Gu X, et al. 6-month consequences of COVID-19 in patients discharged from hospital: a

- cohort study. *Lancet*. 2021;397(10270):220-32. doi: 10.1016/S0140-6736(20)32656-8. Retracted and republished in: *Lancet*. 2023 Jun;401(10393):2025. doi: 10.1016/S0140-6736(23)01175-3.
29. Datta P, Nwankpa JK. Digital transformation and the COVID-19 crisis continuity planning. *Journal of Information Technology Teaching Cases*. 2021;11(2), 81-9. doi: 10.1177/2043886921994821.
 30. Townsend L, Dyer AH, Jones K, Dunne J, Mooney A, Gaffney F, et al. Persistent fatigue following SARS-CoV-2 infection is common and independent of severity of initial infection. *PLoS One*. 2020;15(11):e0240784. doi: 10.1371/journal.pone.0240784.
 31. Ayoubkhani D, Khunti K, Nafilyan V, Maddox T, Humberstone B, Diamond I, et al. Post-covid syndrome in individuals admitted to hospital with covid-19: retrospective cohort study. *BMJ*. 2021;372:n693. doi: 10.1136/bmj.n693.
 32. Dennis A, Wamil M, Alberts J, Oben J, Cuthbertson DJ, Wootton D, et al. Multiorgan impairment in low-risk individuals with post-COVID-19 syndrome: a prospective, community-based study. *BMJ Open*. 2021;11(3):e048391. doi: 10.1136/bmjopen-2020-048391.
 33. Ferner RE, Aronson JK. Remdesivir in covid-19. *BMJ*. 2020;369:m1610. doi: 10.1136/bmj.m1610.
 34. Greenhalgh T, Knight M, A'Court C, Buxton M, Husain L. Management of post-acute covid-19 in primary care. *BMJ*. 2020;370:m3026. doi: 10.1136/bmj.m3026.
 35. Varga Z, Flammer AJ, Steiger P, Haberecker M, Andermatt R, Zinkernagel AS, et al. Endothelial cell infection and endotheliitis in COVID-19. *Lancet*. 2020;395(10234):1417-8. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30937-5.
 36. Guo YR, Cao QD, Hong ZS, Tan YY, Chen SD, Jin HJ, et al. The origin, transmission and clinical therapies on coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak - an update on the status. *Mil Med Res*. 2020;7(1):11. doi: 10.1186/s40779-020-00240-0.
 37. Lala A, Johnson KW, Januzzi JL, Russak AJ, Paranjpe I, Richter F, et al. Prevalence and Impact of Myocardial Injury in Patients Hospitalized With

- COVID-19 Infection. *J Am Coll Cardiol.* 2020;76(5):533-46. doi: 10.1016/j.jacc.2020.06.007.
38. Shi S, Qin M, Shen B, Cai Y, Liu T, Yang F, et al. Association of Cardiac Injury With Mortality in Hospitalized Patients With COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Cardiol.* 2020;5(7):802-10. doi: 10.1001/jamacardio.2020.0950.
 39. Kochav SM, Coromilas E, Nalbandian A, Ranard LS, Gupta A, Chung MK, et al. Cardiac Arrhythmias in COVID-19 Infection. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 2020;13(6):e008719. doi: 10.1161/CIRCEP.120.008719.
 40. Klok FA, Kruip MJHA, van der Meer NJM, Arbous MS, Gommers DAMPJ, Kant KM, et al. Incidence of thrombotic complications in critically ill ICU patients with COVID-19. *Thromb Res.* 2020;191:145-7. doi: 10.1016/j.thromres.2020.04.013.
 41. Nopp S, Moik F, Jilma B, Pabinger I, Ay C. Risk of venous thromboembolism in patients with COVID-19: A systematic review and meta-analysis. *Res Pract Thromb Haemost.* 2020;4(7):1178-91. doi: 10.1002/rth2.12439.
 42. Puntmann VO, Carerj ML, Wieters I, Fahim M, Arendt C, Hoffmann J, et al. Outcomes of Cardiovascular Magnetic Resonance Imaging in Patients Recently Recovered From Coronavirus Disease 2019 (COVID-19). *JAMA Cardiol.* 2020;5(11):1265-73. doi: 10.1001/jamacardio.2020.3557. Erratum in: *JAMA Cardiol.* 2020;5(11):1308. doi: 10.1001/jamacardio.2020.4648.
 43. Lindner D, Fitzek A, Bräuninger H, Aleshcheva G, Edler C, Meissner K, et al. Association of Cardiac Infection With SARS-CoV-2 in Confirmed COVID-19 Autopsy Cases. *JAMA Cardiol.* 2020;5(11):1281-5. doi: 10.1001/jamacardio.2020.3551.
 44. Nishiga M, Wang DW, Han Y, Lewis DB, Wu JC. COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives. *Nat Rev Cardiol.* 2020;17:543-58. doi: 10.1038/s41569-020-0413-9.
 45. Libby P, Lüscher T. COVID-19 is, in the end, an endothelial disease. *Eur Heart J.* 2020;41(32):3038-44. doi: 10.1093/eurheartj/ehaa623.

46. Di Minno A, Ambrosino P, Calcaterra I, Di Minno MND. COVID-19 and Venous Thromboembolism: A Meta-analysis of Literature Studies. *Semin Thromb Hemost*. 2020;46(7):763-71. doi: 10.1055/s-0040-1715456.
47. Dani M, Dirksen A, Taraborrelli P, Torocastro M, Panagopoulos D, Sutton R, ET AL. Autonomic dysfunction in 'long COVID': rationale, physiology and management strategies. *Clin Med (Lond)*. 2021;21(1):e63-e67. doi: 10.7861/clinmed.2020-0896.
48. Townsend L, Dyer AH, Naughton A, Kiersey R, Holden D, Gardiner M, et al. Longitudinal Analysis of COVID-19 Patients Shows Age-Associated T Cell Changes Independent of Ongoing Ill-Health. *Front Immunol*. 2021;12:676932. doi: 10.3389/fimmu.2021.676932.
49. Cattadori G, Di Marco S, Baravelli M, Picozzi A, Ambrosio G. Exercise Training in Post-COVID-19 Patients: The Need for a Multifactorial Protocol for a Multifactorial Pathophysiology. *J Clin Med*. 2022;11(8):2228. doi: 10.3390/jcm11082228.
50. Barker-Davies RM, O'Sullivan O, Senaratne KPP, Baker P, Cranley M, Dharm-Datta S, et al. The Stanford Hall consensus statement for post-COVID-19 rehabilitation. *Br J Sports Med*. 2020;54(16):949-9. doi: 10.1136/bjsports-2020-102596.
51. Singh R, Kang A, Luo X, Jeyanathan M, Gillgrass A, Afkhami S, et al. COVID-19: Current knowledge in clinical features, immunological responses, and vaccine development. *FASEB J*. 2021;35(3):e21409. doi: 10.1096/fj.202002662R.
52. Gimeno-Santos E, Raste Y, Demeyer H, Louvaris Z, de Jong C, Rabinovich RA, et al. The PROactive instruments to measure physical activity in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J*. 2015;46(4):988-1000. doi: 10.1183/09031936.00183014.
53. Oliveira LMS, Gomes NP, Oliveir ES, Santos AA, Pedreira LC. Estratégia de enfrentamento para COVID-19 na atenção primária à saúde: relato de experiência em Salvador-BA. *SciELO Preprints*. 2021. doi: 10.1590/1983-1447.2021.20200138.
54. Wang C, Wang Z, Wang G, Lau JY, Zhang K, Li W. COVID-19 in early 2021: current status and looking forward. *Signal Transduct Target Ther*. 2021;6(1):114. doi: 10.1038/s41392-021-00527-1.

55. Anderson KN, Swedo EA, Trinh E, Ray CM, Krause KH, Verlenden JV, et al. Adverse Childhood Experiences During the COVID-19 Pandemic and Associations with Poor Mental Health and Suicidal Behaviors Among High School Students - Adolescent Behaviors and Experiences Survey, United States, January-June 2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2022;71(41):1301-1305. doi: 10.15585/mmwr.mm7141a2.
56. Pittman J, Bar-Yosef S, SumPing J, Sherwood M. Cardiocardiography: a review of the concept and its clinical application. *Anesthesia & Analgesia.* 2004;99(6):1602-16.
57. Chaudhry S, Hassan M, Malik M, Arshad S, Qadir I, Bukhari S. Impedance cardiography: a new noninvasive technique for assessment of left ventricular function. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2008;18(12):765-9.
58. Scharf C, Lieber A, Mager A, Gaalswijk L, von Goedecke A. Non-invasive monitoring with cardiac output and fluid responsiveness: a comparative study of the physioflow™ and EV1000™ devices. *BMC Anesthesiology.* 2017;17(1):1-8.
59. Berne P, Brunet J, Brabant Y, Quenum S. Impedance cardiography with the PhysioFlow ® device for quantification of left ventricular contractility: A reliability study in healthy volunteers. *Ann Cardiol Angeiol (Paris).* 2019;68(1):1-5.
60. World Health Organization. Coronavirus disease (COVID-19) Epidemiological Updates and Monthly Operational Updates [Internet]. 2023 [citado em 16 maio 2023]. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.
61. Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature.* 2021;594(7862):259-64. doi: 10.1038/s41586-021-03553-9.
62. Ståhlberg M, Reistam U, Fedorowski A, Villacorta H, Horiuchi Y, Bax J, et al. Post-COVID-19 Tachycardia Syndrome: A Distinct Phenotype of Post-Acute COVID-19 Syndrome. *Am J Med.* 2021;134(12):1451-6. doi: 10.1016/j.amjmed.2021.07.004.

63. Delalić Đ, Jug J, Prkačin I. Arterial Hypertension Following COVID-19: A Retrospective Study of Patients in a Central European Tertiary Care Center. *Acta Clin Croat.* 2022;61(Suppl 1):23-27. doi: 10.20471/acc.2022.61.s1.03.
64. de Simone G, Roman MJ, Koren MJ, Mensah GA, Ganau A, Devereux RB. Stroke volume/pulse pressure ratio and cardiovascular risk in arterial hypertension. *Hypertension.* 1999;33(3):800-5. doi: 10.1161/01.hyp.33.3.800.
65. Vieira SS, Lemes B, Carvalho PTC, Lima RN, Bocalini DS, Junior JAS, et al. Does Stroke Volume Increase During an Incremental Exercise? A Systematic Review. *Open Cardiovasc Med J.* 2016;10:57-63. doi: 10.2174/1874192401610010057.
66. Sharma D, Rohila A, Deora S, Garg MK, Misra S. Cardiac assessment of patients during post COVID-19 recovery phase: a prospective observational study. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2022;2022(3):e202218. doi: 10.21542/gcsp.2022.18.
67. Marques KC, Quaresma JAS, Falcão LFM. Cardiovascular autonomic dysfunction in "Long COVID": pathophysiology, heart rate variability, and inflammatory markers. *Front Cardiovasc Med.* 2023;10:1256512. doi: 10.3389/fcvm.2023.1256512.
68. Makaremi S, Asgarzadeh A, Kianfar H, Mohammadnia A, Asghariazar V, Safarzadeh E. The role of IL-1 family of cytokines and receptors in pathogenesis of COVID-19. *Inflamm Res.* 2022;71(7-8):923-947. doi: 10.1007/s00011-022-01596-w.
69. Unudurthi SD, Luthra P, Bose RJC, McCarthy JR, Kontaridis MI. Cardiac inflammation in COVID-19: Lessons from heart failure. *Life Sci.* 2020;260:118482. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118482.
70. Sobotka PA, McMannis J, Fisher RI, Stein DG, Thomas JX Jr. Effects of interleukin 2 on cardiac function in the isolated rat heart. *J Clin Invest.* 1990;86(3):845-50. doi: 10.1172/JCI114783.
71. Wang J, Yang X, Li Y, Huang JA, Jiang J, Su N. Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Virol J.* 2021;18(1):117. doi: 10.1186/s12985-021-01588-y.

72. Coomes EA, Haghbayan H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol.* 2020;30(6):1-9. doi: 10.1002/rmv.2141.
73. Hayama H, Ide S, Kitami Y, Hara H, Kutsuna S, Hiroi Y. Interleukin-6 is upregulated and may be associated with myocardial injury in some patients who have recovered from COVID-19. *Glob Health Med.* 2022;4(1):61-63. doi: 10.35772/ghm.2021.01090.
74. Zhao Y, Qin L, Zhang P, Li K, Liang L, Sun J, et al. Longitudinal COVID-19 profiling associates IL-1RA and IL-10 with disease severity and RANTES with mild disease. *JCI Insight.* 2020;5(13):e139834. doi: 10.1172/jci.insight.139834.
75. Thurner L, Kessel C, Fadle N, Regitz E, Seidel F, Kindermann I, et al. IL-1RA Antibodies in Myocarditis after SARS-CoV-2 Vaccination. *N Engl J Med.* 2022;387(16):1524-7. doi: 10.1056/NEJMc2205667.
76. Mansoor S, Butt AR, Bibi A, Mushtaq S, Ullah I, Alshahrani F, et al. Expression of IFN-Gamma is significantly reduced during severity of covid-19 infection in hospitalized patients. *PLoS One.* 2023;18(9):e0291332. doi: 10.1371/journal.pone.0291332.
77. Sainz B Jr, Mossel EC, Peters CJ, Garry RF. Interferon-beta and interferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology.* 2004;329(1):11-7. doi: 10.1016/j.virol.2004.08.011.

8. Anexos

Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

PROJETO DE PESQUISA: "EFEITOS DO COVID-19 SOBRE OS SISTEMAS CARDIOPULMONAR, NERVOSO, MUSCULAR E IMUNOHEMATOLÓGICO: MELHORA DO DIAGNÓSTICO POR SOROLOGIA E EFEITOS DA REABILITAÇÃO".

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Informações do Participante da Pesquisa

Nome:		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

Você está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa acima identificado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir de participar, a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

2. Informações do Responsável Legal

Nome:		
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador etc.):		
Documento de Identidade (tipo):	Nº.:	Sexo: () M () F
Local de Nascimento:	Data de Nascimento: / /	
Endereço:	Nº.:	
Complementos:	Bairro:	
Cidade:	Estado:	
CEP:	Telefones:	

DADOS SOBRE A PESQUISA

3. Título do Projeto de Pesquisa

EFEITOS DO COVID-19 SOBRE OS SISTEMAS CARDIOPULMONAR, NERVOSO, MUSCULAR E IMUNOHEMATOLÓGICO: MELHORA DO DIAGNÓSTICO POR SOROLOGIA E EFEITOS DA REABILITAÇÃO.

4. Nome do Pesquisador Responsável

Rodolfo de Paula Vieira
Afiliação: Universidade Federal de São Paulo



Cargo/ Função: Professor	Nº de registro do Conselho Regional: 014497-G/SP
CV Lattes: http://lattes.cnpq.br/9213556008468472	

5. Nome do Pesquisador Assistente (Orientador)

Rodolfo de Paula Vieira	
Email: rodrelena@yahoo.com.br	Fone: (12) 99141-0615
Cargo/ Função: Professor Afiliado	Afiliação: Universidade Federal de São Paulo
CV Lattes: http://lattes.cnpq.br/9213556008468472	

6. Instituição/Instituições

Universidade Federal de São Paulo	
Endereço: Rua Talim 330, Vila Nair, SJCampos, CEP 12231-280	

ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA

Esta pesquisa objetiva avaliar os efeitos da suplementação com whey protein isolado somado ou não com a atividade física, sobre a recuperação de pacientes que tiveram COVID-19. Por livre e espontânea vontade, você poderá participar do estudo, se aceitar participar pertencendo a um dos seguintes grupos: somente atividade física 3x/semana, somente suplementação com whey protein isolado 7x/semana ou atividade física 3x/semana+whey protein isolado 7x/semana.

Se aceitar participar do estudo, você será avaliado durante 1 (um) dia e será submetido aos seguintes procedimentos, sendo que as avaliações serão realizadas antes do início do protocolo, 30, 60 e 90 dias após o início do protocolo:

Avaliação clínica geral: Peso e estatura, utilizando-se um estadiômetro portátil (Sanny, SP). O peso será avaliado utilizando-se uma balança portátil. O índice de massa corpórea (IMC) será calculado como segue: $\text{Peso corporal} / \text{estatura elevada ao quadrado}$. A classificação do IMC, será realizado segundo preconizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS), conforme segue (<http://www.emro.who.int/nutrition/information-resources/bmi-calculator.html>).

Avaliação dos Níveis de Óxido Nítrico no Ar Exalado: Os níveis de óxido nítrico no ar exalado serão avaliados utilizando-se o monitor portátil de óxido nítrico V2 NoBreath (Bedfont Scientific). Os resultados serão expressos em partes por bilhão (ppb). Para a realização do exame, o paciente deverá soprar no bocal descartável por um período de 8 segundos no volume corrente de 12ml/segundo, segundo preconizado pela Sociedade Americana de Tórax e Sociedade Europeia de Respiratória.

Avaliação da Resposta Imunológica Humoral Pulmonar: O ar condensado será obtido através da respiração em volume corrente em um tubo denominado RTube (Respiratory Research, EUA), no qual o voluntário respirará por um período de 15 minutos (no caso dos pacientes COVID-19 assintomáticos e Após esse período o condensado do ar será

coletado e armazenado à -86°C para a análise dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatórias e fatores de crescimento e proteínas anti-fibróticas, conforme já padronizado em nosso laboratório.

Coleta, Processamento e Análise do Sangue: 10 ml de sangue venoso serão coletados, após 10 minutos de repouso, utilizando-se material estéril à vácuo, dos quais 5 ml serão coletados em tubo contendo anticoagulante EDTA K3. Após a coleta, 25 microlitros do sangue coletado em tubo contendo EDTA K3 será utilizado para a realização do hemograma completo, o qual será realizado no equipamento Sysmex XS-800i. Em seguida, os dois tubos de sangue coletado serão centrifugados a 1000g, 7 minutos a 4°C e o soro e o plasma serão armazenados a -86°C para a dosagem de citocinas, fatores de crescimento e proteínas anti-fibróticas.

Avaliação da Inflamação Sistêmica: conforme descrito no item acima denominado *Coleta de sangue venoso periférico*, dos 5ml de sangue venoso coletados, vinte e cinco microlitros serão utilizados para realização do hemograma completo utilizando-se o equipamento de hemograma Sysmex XS-800i, e então o restante será centrifugado à 900g, a 4°C, por 7 minutos. O soro será coletado e armazenado à -80°C, para a dosagem das seguintes citocinas IL-1beta, IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, IL-17, IL-33, TNF-alfa, IFN-gama por ELISA, utilizando-se kits DuoSet da R&D Systems, segundo as recomendações do fabricante.

Avaliação da Função Pulmonar por Espirometria: A função pulmonar será avaliada através de um espirômetro Master Screen (Jaeger, Alemanha), utilizando-se a manobra forçada, seguindo os padrões propostos pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. Todos os voluntários serão submetidos ao teste espirométrico pré e pós a administração do broncodilatador de ação rápida (salbutamol 400 mcg). Os parâmetros que serão avaliados serão a CVF, VEF1, VEF1/CVF, PFE e FEF25-75. Os resultados serão avaliados tanto em porcentual do predito quanto em valores absolutos.

Avaliação da Mecânica Pulmonar por Oscilometria: A mecânica pulmonar será avaliada através de um oscilômetro por impulso (IOS) Master Screen (Jaeger, Alemanha). Para a realização do teste, os voluntários, com as narinas obstruídas, respirarão em volume corrente por 180-200 pulsos, o que corresponde à aproximadamente 40 segundos, seguindo os padrões propostos pela Sociedade Brasileira de Pneumologia e Tisiologia. A teste será realizado pré e pós a administração do broncodilatador de ação rápida (salbutamol 400 mcg). Serão avaliados a resistência do sistema respiratório (R5Hz), resistência das vias aéreas distais (R20Hz), a resistência das vias aéreas inferiores (R5Hz – R20Hz), a impedância do sistema respiratório (Z), a reactância do sistema respiratório (X5Hz) e da frequência ressonante (Fres) do sistema respiratório. Os resultados serão avaliados tanto em porcentual do predito quanto em valores absolutos. Ilustração do exame, que pode ser realizado em bipedestação (em pé) ou em sedestação (sentado).

Coleta de escarro induzido: Após o treinamento físico aeróbico você irá inalar uma solução contendo soro fisiológico concentrado (3%) para que as secreções presentes nos seus pulmões sejam liberadas e possam ser coletadas após tosse.

Avaliação da Resposta Hemodinâmica por Cardiografia por Impedância: As seguintes medidas hemodinâmicas serão obtidas utilizando-se o equipamento PhysioFlow®: índice de



contratilidade, frequência cardíaca, tempo de ejeção ventricular, taxa de enchimento diastólico inicial, volume de ejeção, débito cardíaco, resistência vascular sistêmica, índice de trabalho cardíaco esquerdo, fração de ejeção, volume diastólico final.

Avaliação da Saturação/Dessaturação de Oxigênio: Será colocado em seu dedo um equipamento (oxímetro de pulso) para avaliar a sua oxigenação em repouso e também durante dois testes, sentar e levantar da cadeira e também durante um teste de caminhada de 6 minutos.

Treinamento Físico Aeróbico: Você fará caminhada ou corrida em esteira ergométrica ou em bicicleta ergométrica (conforme sua preferência), 3 vezes por semana, à uma intensidade leve-moderada correspondendo a 50-80% da frequência cardíaca máxima, durante o período de 12 semanas.

Treinamento Físico Resistido Tradicional: Você fará uma sequência de 8 exercícios, 3 vezes por semana, à uma intensidade leve-moderada, correspondendo a 50-80% da carga máxima de exercício.

Análise da Urina: Você receberá um potinho (coletor universal) para coletar urina, a qual será analisada como exame de urina I.

Tipo Sanguíneo: Parte do sangue coletado será utilizado para a verificação do tipo sanguíneo (A, B, AB ou O) e do Rh (positivo ou negativo).

O trabalho possui riscos. O local da coleta de sangue poderá apresentar hematoma (ficar roxo) e devido a utilização de uma agulha você sentirá um pouco de dor. Porém, a coleta do sangue será realizada com técnica e materiais estéreis. Todo o tratamento clínico continuará a ser realizado independentemente dos resultados encontrados. Além disso, o treinamento físico também pode ocasionar dores musculares, articulares, tendíneas e ligamentares, tanto no momento do treinamento quanto após o treinamento. Embora raríssimo, você também poderá apresentar crises de broncoespasmo (falta de ar) durante o procedimento da coleta do escarro induzido, ou crises de broncoespasmo (falta de ar) durante o treinamento físico, alterações de pressão arterial durante a coleta de sangue e/ou do treinamento físico e embora rara, lesão muscular durante o treinamento físico.

Asseguro-lhe que serão respeitados os seus direitos de acordo com a Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, citados abaixo, tendo você:

1º - a garantia de receber informações gerais sobre a justificativa, os objetivos e os procedimentos que serão utilizados na pesquisa, assim como o esclarecimento e orientação sobre qualquer dúvida referente a esta pesquisa;

2º - a liberdade de retirar o seu consentimento a qualquer momento e/ou deixar de participar deste estudo, sem que isto lhe traga penalização ou prejuízo de qualquer natureza a sua pessoa, ao doente e aos seus familiares;

3º - a segurança de que não será identificado (a) e que serão mantidos o sigilo e o caráter confidencial de informações relacionadas à sua privacidade. Caso haja necessidade de



identificação, o consentimento deverá ser declarado junto à assinatura do Paciente/ Sujeito do Estudo/ Responsável Legal.

4º - a garantia de não existência de riscos, ou somente riscos mínimos conforme descrito acima (hematoma no local da coleta de sangue), ou mesmo de danos físicos ou constrangimento moral e ético;

5º - a garantia de que, se houver despesas decorrentes de sua participação na pesquisa, estas serão garantidas por este pesquisador; de forma que a sua participação é isenta de despesas. Por outro lado, tenha ciência de que não será remunerado pela participação na pesquisa.

6º - a garantia de que toda e qualquer responsabilidade nas diferentes etapas desta pesquisa é deste pesquisador;

7º - a garantia de que todo o material referente à coleta dos dados para a construção dessa pesquisa e de outros estudos posteriores correlacionados ficará sob a guarda deste pesquisador, o qual poderá ser solicitado por você a qualquer momento.

8º - o sujeito da pesquisa será encaminhado ao seu médico assistente ou à rede pública, caso julgue necessário o pesquisador médico, mediante guia de encaminhamento.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias, igualmente válidas, assinadas e rubricadas em todas as suas páginas, sendo uma retida com o pesquisador responsável e outra com o participante da pesquisa conforme o disposto pela Resolução CNS nº 466 de 2012, itens IV.3.f e IV.5.d.

Pesquisa avaliada e autorizada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) Universidade Anhembi Morumbi, Rua Caso do Ator, 294 – Vila Olímpia – CEP: 04546-001 – 7º andar – Tel.: 55 (11) 3847.3033 – Fax: (11) 3847.3232. E-mail: cep@anhembi.br



CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa, e inclusive torná-lo público em trabalhos científicos do pesquisador Rodolfo de Paula Vieira, desde que respeitado o aqui estipulado.

Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas. Concordo voluntariamente em consentir na minha participação neste estudo e poderei retirar o consentimento concedido a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Sendo assim, declaro o meu consentimento na minha participação, livre e voluntariamente, como sujeito desta pesquisa, assinando com o pesquisador e rubricamos as páginas anteriores.

Assinatura do Paciente/ Responsável Legal

Data ____/____/____

Para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual:

Assinatura da testemunha

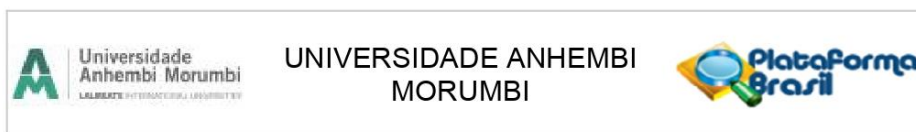
Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto) Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo
(carimbo)

Data ____/____/____

Anexo II. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: EFEITOS DO COVID-19 SOBRE OS SISTEMAS CARDIOPULMONAR, NERVOSO, MUSCULAR E IMUNOHEMATOLÓGICO: MELHORA DO DIAGNÓSTICO POR SOROLOGIA E EFEITOS DA REABILITAÇÃO

Pesquisador: Rodolfo de Paula Vieira

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 34658820.3.0000.5492

Instituição Proponente: ISCP - SOCIEDADE EDUCACIONAL LTDA.

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

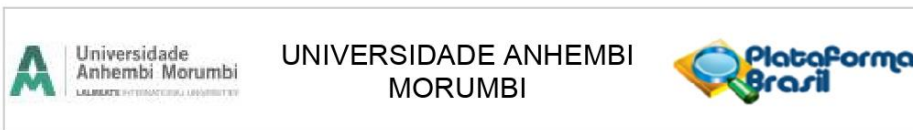
Número do Parecer: 4.349.759

Apresentação do Projeto:

As informações aqui apresentadas foram retiradas do: PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1629438_E1.pd

A infecção por SARS-Cov-2 leva à doença do novo coronavírus (COVID-19), a qual é caracterizada por um rápido quadro inflamatório sistêmico e pulmonar, levando em muitos casos à um quadro de fibrose pulmonar, além de alterações imuno-hematológicas, cardiovasculares, musculares e nervosas. Além disso, devido ao tempo de incubação do vírus e à janela imunológica existente para a soroconversão e diagnóstico preciso através da sorologia, existe uma necessidade urgente de se aprimorar os métodos diagnósticos e de se desenvolver estratégias de reabilitação para os pacientes pós-COVID-19, de maneira a permitir um diagnóstico mais preciso e precoce, além de atenuar as comorbidades pós doença. Assim, propomos testar o Smartube, já validado para o diagnóstico sorológico do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV) e para o vírus da hepatite C (HCV), onde esse tubo acelera a produção de imunoglobulinas para patógenos presentes no sangue. Além disso, propomos avaliar o impacto de um programa de reabilitação com atividade física sobre os sistemas respiratório, imuno-hematológico,

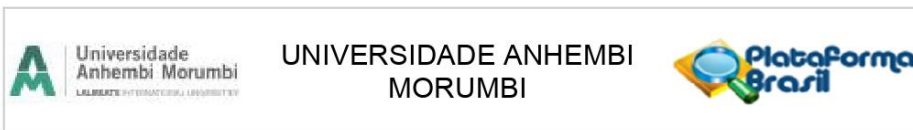
Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207
Bairro: Mooca **CEP:** 03.164-000
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)2790-4658 **E-mail:** cep@anhembibr



Continuação do Parecer: 4.349.759

cardiovascular, muscular e nervoso. Para avaliação da diminuição da janela imunológica utilizando o Smartube, o sangue venoso será coletado no tubo à vácuo Smartube (e comparado com o tubo à vácuo convencional com EDTA K3), seguindo o protocolo recomendado pela empresa, (incubação por 72 horas em estufa de cultura à 37°C e 5% de CO₂), após o qual a amostra de sangue coletada nos respectivos tubos será utilizada para avaliação da presença de IgG e IgM para SARSCov-2 utilizando-se um teste rápido, além de uma confirmação através da técnica de RT-PCR no sangue total. Em relação ao programa de reabilitação, tendo em vista a expertise de nosso grupo, avaliaremos os efeitos de um programa de reabilitação sobre os sistemas respiratório, imunohematológico, cardiovascular, muscular e nervoso. O programa de reabilitação será constituído de 3 sessões semanais em dias alternados (5 min de aquecimento, 5 min de alongamento, 20 min de exercício aeróbio contínuo de intensidade moderada, 20 min de exercício resistido de intensidade moderada, 10 minutos de alongamento para o resfriamento. Para as avaliações pulmonares serão avaliadas a função e mecânica pulmonar, a resposta imune pulmonar através da medida de mediadores inflamatórios e fibróticos e de peptídeos antimicrobianos no ar condensado, a saturação de oxigênio em repouso e a curva de dessaturação, os níveis de óxido nítrico no ar exalado, a força muscular inspiratória e expiratória. Em relação ao sistema cardiovascular, serão avaliados o eletrocardiograma de repouso, a variabilidade de frequência cardíaca, a resposta hemodinâmica utilizando-se a cardiografia por impedância, a pressão arterial, a frequência cardíaca, a pressão de pulso, o lipidograma completo e os níveis de glicose. Em relação ao sistema nervoso serão avaliados os níveis de ansiedade e depressão, a percepção de qualidade de vida, avaliação do equilíbrio dinâmico e estático, a ativação do sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático, além dos níveis séricos do fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF). Em relação ao sistema muscular, será avaliada a composição corporal total [massa magra (massa muscular, massa óssea, água), massa gorda] e também de maneira segmentada (braço direito e esquerdo, pernas direita e esquerda e tronco). Em relação ao sistema imunohematológico, serão avaliados o hemograma completo (série branca e

Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207
Bairro: Mooca **CEP:** 03.164-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2790-4658 **E-mail:** cep@anhemb.br



Continuação do Parecer: 4.349.759

vermelha e plaquetas), além da cascata de coagulação completa e dos níveis de mediadores imunológicos pró e anti-inflamatórios e fibróticos. Os grupos serão todos pós-COVID-19, serão: (1) indivíduos controle (n = 30), (2) indivíduos COVID-19 positivos assintomáticos (n = 30), (3) indivíduos COVID-19 positivos sintomáticos leves/moderados (n = 30), (4) indivíduos COVID-19 positivos sintomáticos graves (n = 30). Os indivíduos serão avaliados antes do início do e após 45 e 90 dias de reabilitação.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

2. OBJETIVOS

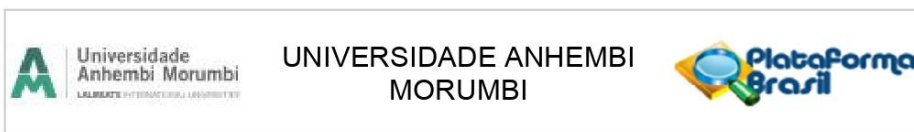
- Avaliar se o Smartube é capaz de diminuir ou eliminar os resultados falso negativos para pacientes COVID-19, como metodologia complementar para aumentar a eficácia do teste rápido, o qual é mais viável para a realização de estudos epidemiológicos e consequente aplicação em políticas públicas de saúde.
- Avaliar o impacto da COVID-19 sobre os sistemas pulmonar, cardiovascular, nervoso, muscular e imunohematológico de diferentes gravidades.
- Avaliar os efeitos de um programa de reabilitação com exercícios físico sobre o impacto da COVID-19 sobre os sistemas pulmonar, cardiovascular, nervoso, muscular e imunohematológico de diferentes gravidades, pré e após 45 e 90 dias do programa de reabilitação

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O trabalho possui riscos. O local da coleta de sangue poderá apresentar hematoma (ficar roxo) e devido a utilização de uma agulha você sentirá um pouco de dor. Porém, a coleta do sangue será realizada com técnica e materiais estéreis. Todo o tratamento clínico continuará a ser realizado independentemente dos resultados encontrados. Além disso, o treinamento físico também pode ocasionar dores musculares, articulares, tendíneas e ligamentares, tanto no momento do treinamento quanto após o treinamento. Embora raríssimo, você também poderá apresentar crises de

Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207
Bairro: Mooca **CEP:** 03.164-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2790-4658 **E-mail:** cep@anhembibr



Continuação do Parecer: 4.349.759

broncoespasmo (falta de ar) durante o procedimento da coleta do escarro induzido, ou crises de broncoespasmo (falta de ar) durante o treinamento físico, alterações de pressão arterial durante a coleta de sangue e/ou do treinamento físico e embora rara, lesão muscular durante o treinamento físico.

Benefícios:

Ter um acompanhamento detalhado da saúde e ter acesso à um programa de reabilitação profissional.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

É um projeto com condições de realização, claramente definido em termos metodológicos e logísticos, caracterizando exequibilidade na proposta.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Estão adequados e contemplam as exigências da resolução 466/12.

Recomendações:

Sem recomendações.

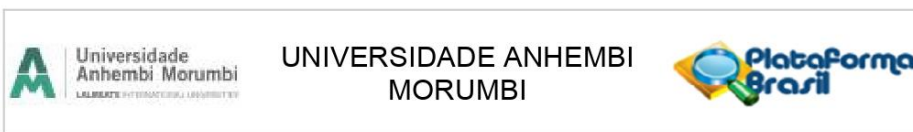
Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

1. Apresentar relatório parcial da pesquisa, semestralmente, a contar do início da mesma.
2. Apresentar relatório final da pesquisa até 30 dias após o término da mesma.
3. O CEP UAM deverá ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo.
4. Quaisquer documentações encaminhadas ao CEP UAM deverão conter junto uma Carta de Encaminhamento, em que conste o objetivo e justificativa do que esteja sendo apresentado.
5. Caso a pesquisa seja suspensa ou encerrada antes do previsto, o CEP UAM deverá ser comunicado, estando os motivos expressos no relatório final a ser apresentado.
6. O TCLE deverá ser obtido em duas vias, uma ficará com o pesquisador e a outra com o sujeito de pesquisa.
7. Em conformidade com a Carta Circular nº. 003/2011CONEP/CNS, faz-se obrigatório a rubrica em todas as páginas do TCLE pelo sujeito de pesquisa ou seu responsável e pelo pesquisador.

Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207
Bairro: Mooca **CEP:** 03.164-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2790-4658 **E-mail:** cep@anhembibr



Continuação do Parecer: 4.349.759

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1629438_E1.pdf	19/10/2020 09:39:52		Aceito
Outros	AMESJCampos.pdf	19/10/2020 09:34:50	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
Outros	HRSJC.pdf	19/10/2020 09:34:35	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
Declaração de concordância	HRLN.pdf	19/10/2020 09:18:32	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
Outros	Lattesrodolfodepaulavieira.pdf	06/07/2020 21:02:42	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de reabilitação COVID19.docx	06/07/2020 21:02:03	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Tclereabilitacaocovid.docx	06/07/2020 21:00:41	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito
Folha de Rosto	Folha de rosto de reabilitação COVID19.pdf	06/07/2020 20:27:38	Rodolfo de Paula Vieira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 20 de Outubro de 2020

Assinado por:
CARLOS ROCHA OLIVEIRA
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Dr. Almeida Lima, 1.134 - 2º andar - sala 207
Bairro: Mooca **CEP:** 03.164-000
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2790-4658 **E-mail:** cep@anhembibr

Anexo III. Artigo Publicado



Systematic Review

Effects of Hydrolyzed Collagen as a Dietary Supplement on Fibroblast Activation: A Systematic Review

Pedro Augusto Querido Inacio ¹, Felipe Augusto Chaluppe ², Gerson Ferreira Aguiar ¹, Carly de Faria Coelho ¹ and Rodolfo P. Vieira ^{1,3,*}

- ¹ Laboratory of Pulmonary and Exercise Immunology (LABPEI), Evangelical University of Goiás (Unievangelica), Avenida Universitária Km 3.5, Anápolis 75083-515, GO, Brazil; pedroquinacio@gmail.com (P.A.Q.I.); gerson1048@gmail.com (G.F.A.); carlyfcoelho@gmail.com (C.d.F.C.)
- ² Peptech Collagen from Brazil, 1500 North Halsted Street—Floor 2, Chicago, IL 60642-2517, USA; fchaluppe@interganics.com
- ³ Brazilian Institute of Teaching and Research in Pulmonary and Exercise Immunology (IBEPIPE), Rua Pedro Ernesto 240, São José dos Campos 12245-520, SP, Brazil
- * Correspondence: rodrelena@yahoo.com.br

Abstract: Background: Our objective was to conduct a systematic review of the effects of hydrolyzed collagen supplementation on the proliferation and activation of fibroblasts. Methods: The search was conducted for journals that published articles in the English language, peer-reviewed, meeting the following criteria: (a) randomized clinical trials, (b) randomized studies in animals or humans, (c) in vitro studies, (d) studies using hydrolyzed collagens or collagen peptides, and (e) studies assessing alterations on fibroblasts as the primary or secondary outcome. We utilized the main journal databases PubMed / Web of Science and ongoing reviews by PROSPERO. For bias risk and methodological quality, we used an adaptation of the Downs and Black checklist. Our review followed the PRISMA checklist, conducted from February 2024 to the first week of March 2024, by two independent researchers (P.A.Q.I. and R.P.V.). Results: Eleven studies were included in this review, where our findings reinforce the notion that hydrolyzed collagens or collagen peptides at concentrations of 50–500 µg/mL are sufficient to stimulate fibroblasts in human and animal tissues without inducing toxicity. Different enzymatic processes may confer distinct biological properties to collagens, allowing for scenarios favoring fibroblast promotion or antioxidant effects. Lastly, collagens with lower molecular weights exhibit greater bioavailability to adjacent tissues. Conclusions: Hydrolyzed collagens or collagen peptides with molecular sizes ranging from <3 to 3000 KDa promote the stimulation of fibroblasts in human tissues.

Keywords: low-molecular-weight collagen peptides; fibroblast; hydrolyzed collagen; collagen supplementation



Citation: Inacio, P.A.Q.; Chaluppe, F.A.; Aguiar, G.F.; Coelho, C.d.F.; Vieira, R.P. Effects of Hydrolyzed Collagen as a Dietary Supplement on Fibroblast Activation: A Systematic Review. *Nutrients* **2024**, *16*, 1543. <https://doi.org/10.3390/nu16111543>

Academic Editor: Shigemura Yasutaka

Received: 26 February 2024
Revised: 7 May 2024
Accepted: 15 May 2024
Published: 21 May 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Collagen is the primary protein composing the extracellular matrix, formed by a chain of specific amino acids. In its primary form, collagen exhibits a triple-helical structure [1]. The triple-helical structure of collagen molecules is constituted by three α chains, characterized by repeating peptide triplets with the sequence glycine-X-Y. While X and Y represent any amino acid, they typically correspond to proline and hydroxyproline, respectively. Adjacent to the triple-helical regions are non-glycine-X-Y segments known as non-collagenous domains or Col domains. These regions often incorporate identifiable peptide modules found in other extracellular matrix molecules [2].

In addition, the collagen family encompasses 28 types of collagens which are distributed in different proportions in all organs and systems in the human body, constituting an essential component of cellular membranes [3]. Although almost all of the collagens

are presented in filamentous or fiber forms, few forms are also presented in soluble structures [3]. In this way, collagens fulfill structural functions and play crucial roles in determining the mechanical characteristics, arrangement, and form of tissues. They engage with cells through various receptor groups, influencing their growth, movement, and specialization. Certain types of collagens exhibit limited distribution within tissues, indicating specialized functions tailored to specific biological processes [3]. The proper functioning of tissues relies on the accurate assembly of molecular aggregates integrated into the matrix. This review underscores the key structural attributes of the collagen types I–XXVIII [2].

Collagens stand as the predominant proteins in mammals, constituting approximately 30% of the total protein mass. The unveiling of collagen II by Miller and Matukas in 1969 marked a pivotal moment, leading to the subsequent identification of 26 additional collagen types. Advances in molecular biology and gene cloning techniques have greatly expedited the pace of discovery in this field [2].

Beyond their physiological and pathophysiological roles, the development of collagen-based proteins and peptides is expanding rapidly [4]. Through a process of heating, the collagen molecule undergoes enzymatic denaturation, partly through the hydrolysis of peptide bonds, resulting in its gelatinous form, commercially known as hydrolyzed collagen or collagen peptides [5–7]. Its production occurs through animal skin, bones, connective tissues (tendons), or the skin and scales of saltwater and freshwater fish [8]. The growing interest of the pharmaceutical and cosmetic industries is due to the evidenced effects, mainly on the regeneration of wrinkled cutaneous tissue and dermal hydration, seemingly resulting from the recovery of degraded collagen fibers [9].

Hydrolyzed collagen, also known as collagen peptides, is a popular dietary supplement widely used for its potential health benefits, including improved skin elasticity, joint health, and bone density. The industrial production of hydrolyzed collagen involves several key techniques to extract and process collagen from animal sources, primarily bovine (cow) or porcine (pig) hides, bones, or fish scales. So, the industrial techniques used in the production of commercial hydrolyzed collagen are briefly described as follows:

The extraction of collagen: The first step involves the extraction of collagen from animal tissues. This is typically performed through acid or alkaline treatment to break down the connective tissue and release the collagen fibers. Various studies detail the optimization of extraction parameters such as temperature, pH, and extraction time to maximize collagen yield [10].

Purification: Once extracted, the collagen undergoes purification processes to remove impurities such as fats, proteins, and minerals. Techniques like filtration, centrifugation, and precipitation are employed for this purpose [10].

Hydrolysis: The purified collagen is then subjected to enzymatic hydrolysis, where enzymes such as proteases break down the collagen molecules into smaller peptides. This process increases the bioavailability and solubility of collagen peptides, making them easier to digest and absorb in the body [11].

Fractionation: Fractionation techniques are sometimes employed to isolate the collagen peptides of specific molecular weights or sizes, as different sizes may exhibit different bioactive properties. Fractionation methods include chromatography and ultrafiltration [12].

Drying and packaging: The hydrolyzed collagen solution is then concentrated and dried to obtain a powder form suitable for use as a dietary supplement. Spray-drying is a commonly used technique for this purpose, as it allows for rapid drying while preserving the nutritional and functional properties of collagen peptides. The dried powder is then packaged in airtight containers to maintain its quality and shelf life [13].

Quality control: Throughout the production process, quality control measures are implemented to ensure the safety, purity, and consistency of the final product. This includes testing for contaminants, such as heavy metals and pathogens, as well as monitoring key parameters like collagen content, amino acid profile, and molecular weight distribution [14].

Regulatory compliance: The industrial production of hydrolyzed collagen must comply with the regulatory standards set by organizations such as the Food and Drug Ad-

ministration (FDA) in the United States or the European Food Safety Authority (EFSA) in Europe. This includes adherence to good manufacturing practices (GMPs) and labeling requirements for dietary supplements [15].

In terms of health implications, collagen supplementation has been implicated in elderly sarcopenic populations, wound healing, and degenerative processes related to tendon and bone structures [1]. Interestingly, Wang et al. (2011), using a low-molecular-weight collagen peptide (800 KDa), tested whether a composite among this collagen peptide and chito-oligosaccharide may have the antibacterial properties and biocompatibility of the composite electrospun with nanofibrous membranes (NFMs) using human skin fibroblasts [1]. New findings also suggest that hydrolyzed collagen possesses properties to reduce inflammatory markers and fibroblast proliferation. This emerging research showing this relationship is justified by the mechanism of action in which collagens are formed by fibroblasts [16], supporting the notion that collagen appears to stimulate fibroblast proliferation. In addition, this study from Brandao-Rangel et al. (2022) showed that collagen peptide at different concentrations 2.5 mg/mL, 5 mg/mL, and 10 mg/mL protected human skin fibroblast (CCD-1072Sk) and human skin keratinocytes (hKT-nh-skp-KT0026) inducing a latent anti-inflammatory response against lipopolysaccharide stimulation (LPS; 10 ng/mL) [16]. Animal studies and cell culture experiments corroborate this rationale [17,18]. In this way, Chotphruethipong et al. (2021) showed that hydrolyzed collagen from the defatted Asian sea bass (*Lates calcarifer*) (Asbs-HC) presenting high hydrophobic amino acids and imino acids did not cause cytotoxicity at any concentration (25–1000 µg/mL). In addition, the highest concentration (1000 µg/mL) induced high MRC-5 fibroblast cell line (human fetal lung) proliferation and migration suggesting a potential for wound healing, beyond a high antioxidant capacity [17]. In another study, Offengenden et al. (2018), using hydrolyzed collagen obtained from seven different enzymatic processes, compared their effects on inflammation, oxidative stress, type I collagen synthesis, and cell proliferation, using cultured human dermal fibroblasts. In conclusion, the authors stated that different enzymatic treatments may generate hydrolyzed collagen possessing distinct chemical and biological profiles [18]. Fibroblasts were first introduced to the scientific community in 1858 by the German pathologist Rudolf Virchow, and subsequently, the properties of this discovery turned towards their role in tissue repair, implicating fibroblasts in the production of new connective tissues [19]. Broadly, fibroblasts are known as mesenchymal cells, exhibiting various functions such as tissue repair agents in various pathological scenarios, target cells, and modulators for immune functions; the secretion of metabolites and signaling factors to neighboring cells, as well as the regulation of metabolism in various organs; and extracellular matrix remodeling [20].

Based on these findings, we investigated how supplementation with hydrolyzed collagen peptides can induce the proliferation and activation of fibroblasts, which are the cells capable of synthesizing collagen in various organs and tissues. The justification for this literature review stems from the lack of a review that explains the studies corroborating the idea of “hydrolyzed collagen inducing fibroblast stimulation”. The objective of this review is to present possible evidence that brings to light fibroblast proliferation through the ingestion or application of hydrolyzed collagen peptides and their reduced forms, to highlight limitations, and to create a more solid database for the mechanisms adjacent to the use of hydrolyzed collagen.

2. Methods

2.1. Inclusion and Exclusion Criteria

Our analyses were limited to journals that published articles in the English language, peer-reviewed, meeting the following criteria: (a) randomized clinical trials, (b) randomized studies in animals or humans, (c) in vitro studies, (d) studies using hydrolyzed collagens or collagen peptides, and (e) studies assessing alterations on fibroblasts as the primary or secondary outcome. Review articles, brief reviews, opinion articles, case reports, or

observational studies, as well as research utilizing forms of non-hydrolyzed collagens, were considered ineligible for the construction of this review.

2.2. Search Strategy

The search for articles, as well as the construction of this review, was conducted in accordance with the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) guidelines [21]. Our primary search was performed in the main databases PubMed/MEDLINE and Web of Science/Clarivate, which publish articles in the English language. We also consulted the ongoing review database (PROSPERO). The search was conducted from February 2024 to the first week of March 2024. The following syntax was used for the search: hydrolyzed collagen peptides AND fibroblast, low molecular weight collagen peptides AND fibroblast. Articles that included any of the following terms in their title or abstract: collagen hydrolyzed, fibroblast, and low-molecular-weight collagen, were included for further analysis. From these selected articles, the reference lists were subsequently consulted to identify possible additional publications [22]. To avoid selection bias, the search was conducted by two researchers who independently analyzed the articles (P.I. and R.P.V.). If any article was deemed divergent for inclusion and exclusion, a third, fourth, and fifth researcher (F.A.C., G.F.A., and C.F.C.) was consulted, with the final decision resting with them.

2.3. Methodological Quality

We assessed the methodological quality of the included studies using the Downs and Black checklist with 27 items [22]. This checklist addresses different aspects of study design, including reporting (items 1–10), external validity (items 11–13), internal validity (items 14–26), and statistical power (item 27). Given the specificity of the included studies, we used the checklist as a reference and listed 10 items to be considered to evaluate the methodological quality of the studies. If the item was present, a value of 1 was assigned, otherwise a value of 0, similar to the Downs and Black checklist. Studies were classified as good quality if they scored 8–10, moderate quality if they scored 6–7, and poor quality if they scored 5 or below. The studies were independently evaluated by the 2 reviewers (P.I. and R.P.V.).

3. Results

From the studies searched in the databases, we obtained a total of 220 articles, of which 184 articles were listed for the initial analysis. However, these were subsequently excluded due to ineligibilities identified by automation tools, resulting in the exclusion of a total of 172 documents, including duplicates ($n = 8$) and articles published in languages other than English ($n = 4$), leaving 36 articles. After summarization, those that did not meet criteria (a); (b); (c); (d), or were not considered relevant for the review construct, in agreement between the two researchers (P.I. and R.P.V.), were excluded ($n = 21$), totaling 15. Three articles were evaluated by the third, fourth, and fifth researcher (F.A.C. and C.F.C.), who made the final decision regarding their inclusion or exclusion in the present review. Two articles proceeded for analysis, and one document was excluded. Subsequently, the articles were read in full, and the references were re-evaluated to retrieve possible documents not found in the initial data searches. During the full-text reading of the articles, three articles were excluded: one as it was a review, and the other two documents did not demonstrate in their results the effects of hydrolyzed collagen on fibroblast proliferation. Eleven articles were included in the final review. Figure 1 presents the flowchart of the literature search. In summary, the studies included for analysis are as follows.

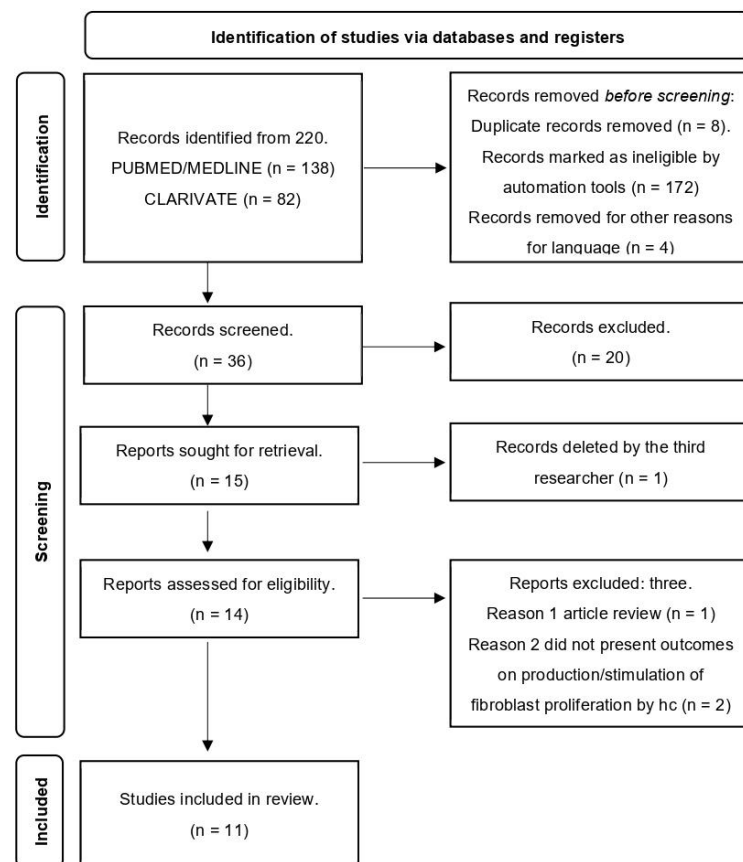


Figure 1. Flowchart of the search process.

3.1. Study Coding

The studies were individually read and coded by the two researchers (P.I. and R.P.V.) using the PICO tool for the following variables: (a) population, (b) intervention, (c) comparison/control, and (d) outcomes. Population refers to the type of hydrolyzed collagen used and, if reported, its molecular weight in kilodalton KDa. Intervention on fibroblasts identifies the types of fibroblastic cells used, whether human or animal. For comparison and control, we listed the controls used as well as the dosages. Lastly, outcomes present the results exclusively regarding fibroblast cell proliferation. Table 1 presents an overview of the studies that met all inclusion criteria.

Table 1. Articles included for review and their outcomes.

Article	Type of Collagen and Molecular Weight (MW) in Kda	Intervention on Fibroblast	Control/Comparasion	Outcomes
Chai et al., 2010 [23]	Collagen peptides from fish.	Human and mouse embryonic skin fibroblast lineage.	Fibroblast without collagen stimulation.	The doses of 0.4–200 µg/mL induced fibroblast proliferation in a dose-dependent manner.
Chotphruethipong et al., 2019 [24]	Sea bass skin hydrolysate and collagen with the application of porcine pancreatic lipase.	Mouse fibroblasts from subcutaneous connective tissue lineage (L929).	Fibroblasts without the addition of hydrolyzed collagen (HC) and solutions with HC concentrations of 50, 100, 200, and 250 µg/mL.	The cellular proliferation of fibroblasts, mainly between concentrations 100 and 250 µg/mL.
Chotphruethipong et al., 2021 [17]	Hydrolyzed collagen from defatted sea bass skin. MW = 406 to 16,120 Da.	MRC-5 fibroblast cell line (human fetal lung).	Fibroblasts with the additions of hydrolyzed collagen at the concentrations of 25, 50, 100, 500, and 1000 µg/mL.	Concentration-dependent fibroblast proliferation with no significant difference between the concentrations of 500 and 1000 µg/mL ($p > 0.05$).
Chotphruethipong et al., 2021 [25]	Hydrolyzed collagen (HC) from degreased sea bass skin and collagen (HC) + EGCG epigallocatechin gallate.	MRC-5 fibroblast cell line (human fetal lung).	Fibroblasts without addition and with the additions of hydrolyzed collagen (HC), and HC + EGCG.	HC promoted cell proliferation more effectively than HC-conjugated EGCG.
Watuquier et al., 2022 [26]	Fish cartilage hydrolysate (FCH). Low MW (under 3000 Da).	Human primary dermal fibroblasts	Human I serum/NAIVE or human serum enriched with circulating metabolites resulting from FCH	FCH stimulates human dermal fibroblast growth
Brandao-Rangel et al., 2022 [16]	Hydrolyzed collagen (types I and III of hydrolyzed collagen) Total MW < 3 kDa orientes fibroblasts (CCD7Sk).	(1) odetoderny medium stimulated), (2) lipopolysaccharide (LPS 10 ng/mL), (3) collagen 2.5 mg/mL, (4) collagen 5 mg/mL, (5) collagen 10 mg/mL, (6) LPS + collagen 2.5 mg/mL, (7) LPS + collagen 5 mg/mL, and (8) LPS + collagen 10 mg/mL. LPS was added for 1 h, with the subsequent addition of collagen.	...	Collagen supplementation (2.5 mg/mL, 5 mg/mL, 10 mg/mL) increased the proliferation of human's fibroblasts. $p < 0.001$.
Offengenden et al., 2018 [18]	Chicken collagen hydrolysate (CCH).	Cultured human dermal fibroblasts (HDF).	A total of 4 dual-enzyme generated hydrolysates.	Only 2 out of the 4 enzyme-hydrolyzed collagen stimulate fibroblast proliferation, $p < 0.01$, $p < 0.001$.

Table 1. Cont.

Article	Type of Collagen and Molecular Weight (MW) in Kda	Intervention on Fibroblast	Control/Comparasion	Outcomes
Wang et al., 2011 [27]	Fish scale collagen peptide (FSCP) MW 800 Da.	Cultured human dermal fibroblasts (HDF).	PVA (polyvinyl alcohol) and E NFM (lectropun nanofibrous membranes) served as the control.	FSCP treatments both showed good in vitro biocompatibility and supported the proliferation of fibroblasts.
Chotphruethipong et al., 2022 [28]	Hydrolyzed collagen from salmon skin and vitamin C (Vit C) Mw 102 Da to 10,175 Da.	Cultured human dermal fibroblasts (HDF).	HC (0, 50, 100, 200, 400, and 800 µg/mL) and Vit C (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg/mL) control (without any treatment).	Hydrolyzed collagen (HC) at various levels on the proliferation of HDF cells, there was no difference in the cell proliferation of HC at the levels of 50 and 100 µg/mL, $p > 0.05$, cytotoxicity, and 800 µg/mL, which showed a slightly decreased proliferation of the cell as compared to the control $p < 0.05$. Between the two protocols (hc) and vit c, there was no significant difference in relation to the increase in fibroblast proliferation $p > 0.05$, and when combined, greater proliferation in relation to the isolated methods $p < 0.05$.
Lin et al., 2020 [29]	Elastin collagen peptide complex juice sink (YAMIL, Zhejiang Kazman Biotechnology) ingredients: water, fish collagen powder (12% odena powder, apple essence, cherry essence, γ-aminobutyric acoderape powder, powder, coderry powder, boderice powder, honey, vitamin C, erythritol, citric acid, fructose syrup, sucrose, flavor).	Human skin fibroblast.	Concentrations of collagen drinks (with/without UVA irradiation): 0.125%, 0.25%, and 0.5%. Control 0%.	In comparison with the control group, 0.125%, 0.25%, and 0.5% of the collagen drinks could increase the mitochondrial activities of fibroblasts by 30.6%, 16.4%, and 36.1%, respectively. Regarding photoaging improvement, the mitochondrial activities of the UVA-treated cells were improved by 100.9%, 110.2%, and 105.4%, respectively, followed by treatment with corresponding 0.125%, 0.25%, and 0.5% of the collagen drinks. The collagen drinks slightly enhanced the cell proliferation capability in comparison with the control group.
Benjakul et al., 2018 [30]	Hydrolysed collagen from seabass (<i>Lates calcarifer</i>) and HC + Vit C. Molecular weight ranges from 1050 to 1330 Da.	L929 mouse fibroblast, subcutaneous connective tissue.	HC powder was dissolved in distilled water and dosed orally at 2000 and 5000 mg/kg body weight. The treated doses were calculated based on the body weights of rats after fasting. The rats in the control group were dosed with distilled water at the equivalent to the treatment group.	HC promoted cell growth L929. The greatest proliferation was evidenced in combined models of HC + Vit c in a 2:1 ratio at the dosages of 150–200 µg/mL.

3.2. Article Retrieval

Throughout the process of reading and summarizing the articles, their references and citations were independently reviewed to find articles that were not reached in our initial searches. However, no articles that had not already been identified during the review process were found. From all references, the researcher (P.I.) listed one document that addressed the outcome of fibroblast proliferation by collagens. Upon reading the document in its entirety, it became evident that the document aimed to evaluate the effects of collagen that did not undergo hydrolysis processes, thus disqualifying it as hydrolyzed collagen or collagen peptides. Therefore, it was not included.

3.3. Characteristics of the Studies

Eleven studies were included in this review [16–18,23–30] for the outcome of the stimulation or proliferation of fibroblasts by the application or ingestion of hydrolyzed collagen supplements or collagen peptides. Three studies used rat fibroblast cell lines as the intervention method, while the remaining articles used human fibroblast cells. The types of collagens used varied among the selected articles, including animal, fish, and chicken origins, with one study utilizing a collagen-enriched beverage [29], and two studies combining hydrolyzed collagen with vitamin C applications [28,30]. When reported, the molecular weight of all hydrolyzed collagens was stated in Daltons, with all studies presenting low molecular weights, with the lowest being reported in the work of Rangel et al., 2022 (see Table 1). The studies used control cells without interventions or with the additions of various concentrations of hydrolyzed collagen (25, 50, 100, 500, and 1000 µg/mL).

3.4. Methodological Quality

The quality of each study was assessed by the two researchers (P.I. and R.P.V.), and in case of any discrepancies regarding quality parameters, a third researcher was consulted to ensure agreement. The scale used was adapted from the Downs and Black checklist, listing 10 points as quality criteria, in which eight studies were considered good quality, and three studies were of moderate quality (see Table 2).

Table 2. Methodological quality criteria.

Article	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	Total Score
Chai et al., 2010 [23]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Chotphruethipong 2019 [24]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Chotphruethipong 2021 [17]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Chotphruethipong et al., 2021 [25]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Wauquier et al., 2022 [26]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Brandao-Rangel et al., 2022 [16]	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	9
Offengenden et al., 2018 [18]	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	7
Wang et al., 2011 [27]	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	7
Chotphruethipong et al., 2022 [28]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8
Lin et al., 2020 [29]	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	7
Benjakul et al., 2018 [30]	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	8

Methodological quality criteria adapted from the checklist:

1. Was the study hypothesis/goal/objective clearly described?
2. Were the main results clearly measured and described in the Introduction or Methods section?
3. Were the characteristics of the cell types used and controls described?

4. Were the interventions of interest clearly described? Treatments and placebos (when relevant) to be compared should be clearly described.
5. Was a list of key confounding factors provided, along with how cellular environments and processes were managed, and described clearly?
6. Were the main conclusions of the study clearly described? Simple outcome data (including denominators and numerators) should be reported for all main findings so that the reader can verify the main analyses and conclusions. (This question does not cover statistical test data, which are considered below.)
7. For non-normally distributed data, was the interquartile range of results reported? For normally distributed data, standard error, standard deviation, or confidence intervals should be reported.
8. Did the authors clearly report the limitations of their findings? If yes, consider 1; if not, consider 0.
9. Were appropriate statistical tests used to assess the main results? The statistical techniques used should be appropriate to the data.
10. Were actual probability values reported (e.g., 0.035 instead of <0.05) for the main results, except where the probability value is less than 0.001?

4. Discussion

The results of this systematic review reinforce the concept of hydrolyzed collagen inducing fibroblast stimulation. This effect appears to be mediated by the ingestion of collagen peptides or hydrolyzed collagens. The studies presented here provide a robust body of evidence demonstrating fibroblast cell proliferation through the use of hydrolyzed collagens without alterations in cellular toxicity. This implies that hydrolyzed collagen may have outcomes beyond those already evidenced.

Hydrolyzed collagen supplementation is widely used for aesthetic purposes, primarily to delay skin aging. Part of its effect is attributed to stimulating extracellular matrix proteins, which are directly regulated by dermal fibroblasts (F.Ds.). As shown in our results, hydrolyzed collagens stimulate the specific growth of F.Ds., especially those with lower molecular weights and high proline/hydroxyproline content.

A determinant factor reported in our review leads us to rationalize that molecular weight is directly related to better solubility. Collagen peptides rich in pro-Hdx exhibit significant bioavailability. Peptides with lower molecular weights have properties to reach deeper dermal layers, thus stimulating better tissue repair. Despite not being the focus of this review, it is important to note that, in addition to increasing fibroblasts, hydrolyzed collagens are gaining traction as potential antioxidant supplements. Some studies included here sought to combine hydrolyzed collagens with other types of supplements known for their positive effects on oxidative scenarios, such as vitamin C.

Among the findings, it was also noted that depending on the enzymatic processes on collagens, different hydrolyzed collagens obtain distinct characteristics. Some seem to prefer antioxidant and inflammatory situations, while others induce fibroblast proliferation in human skin. However, this result is presented by only one study, warranting further investigation to identify if indeed specific types of hydrolyzed collagens are tailored to specific fibroblast applications.

According to our findings, hydrolyzed collagens from different sources and with different molecular weights, yet all considered low-weight, ranging between <3 and 3000 Da, are capable of inducing fibroblasts in human and animal skin tissues.

In addition to the findings presented here, this review also serves an important role in scientific production, encouraging new studies to evaluate the effects of hydrolyzed collagens on fibroblasts in relation to the tested dosages. Most studies indexed here used dosages with different concentrations of collagens in fibroblasts to identify minimum and maximum absorption values and possible toxicity. Summarizing all presented results, the concentrations of 50–500 µg/mL are sufficient for fibroblast proliferation without toxicity implications. The concentrations of 800 µg/mL showed toxicity levels in cultured human

dermal fibroblasts (HDFs). However, this result should be analyzed cautiously since in MRC-5 fibroblast cell line (human fetal lung) tissues, the doses of 1000 µg/mL did not create such a scenario, and among lower doses compared to higher doses, none of these doses induced toxicity. With these reviewed findings, new research directions do not require further investigation into solutions with different concentrations when the goal is fibroblast stimulation.

5. Limitations and Future Directions

This review focused on only one outcome regarding hydrolyzed collagens, while others such as toxicity and inflammatory levels are recommended for readers to explore in the selected articles. Our aim is to facilitate new research regarding the use of collagens and fibroblasts, as until the present moment, no review with such objectives has been evidenced. Our work is not without limitations; for example, the methodological quality of the listed articles underwent an adaptation process. We encourage future, more robust checklists that include in vitro studies to be developed to facilitate methodological processes for cellular study reviews. Furthermore, studies investigating the molecular mechanisms involved in the collagen peptide-induced fibroblast proliferation and activation must be performed; at the moment, only the study from Brandao-Rangel et al. (2022) has brought some initial pathways about this issue, demonstrating the involvement of nitric oxide and TGF-β and the VEGF pathway in such effects [16]. We chose to limit our searches to articles published in English and peer-reviewed, which may omit data from other sources that would be relevant for a better understanding of the presented findings. However, this choice aims to narrow down the findings to studies with minimal bias and good quality. Finally, this review creates a possible research scenario regarding the specific biological properties of each hydrolyzed collagen, and in the future, identify if specific enzymatic processes substantially alter the action of hydrolyzed collagen on fibroblasts.

6. Conclusions

In conclusion, our review highlights the effectiveness of hydrolyzed collagens and collagen peptides in stimulating and proliferating fibroblast cells, but not for any integral form of collagen. New studies aiming to explore this scenario may consider using dosages ranging between the concentrations of 50 and 500 µg/mL of hydrolyzed collagen. Furthermore, investigations regarding the different enzymatic processes during the collagen hydrolysis process should be conducted to identify if these different processes may affect the biological properties of hydrolyzed collagen or collagen peptides, thus changing their effects on fibroblast stimulation.

Author Contributions: P.A.Q.I.: Conceptualization, investigation, formal analysis. F.A.C.: Conceptualization, investigation, formal analysis. G.F.A.: Conceptualization, investigation, formal analysis, writing—review and editing. C.d.F.C.: Conceptualization, investigation, formal analysis, writing—review and editing. R.P.V.: Conceptualization, investigation, formal analysis, writing—original draft, writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Conflicts of Interest: Author Felipe Augusto Chalupe was employed by the company Peptech Collagen from Brazil. The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

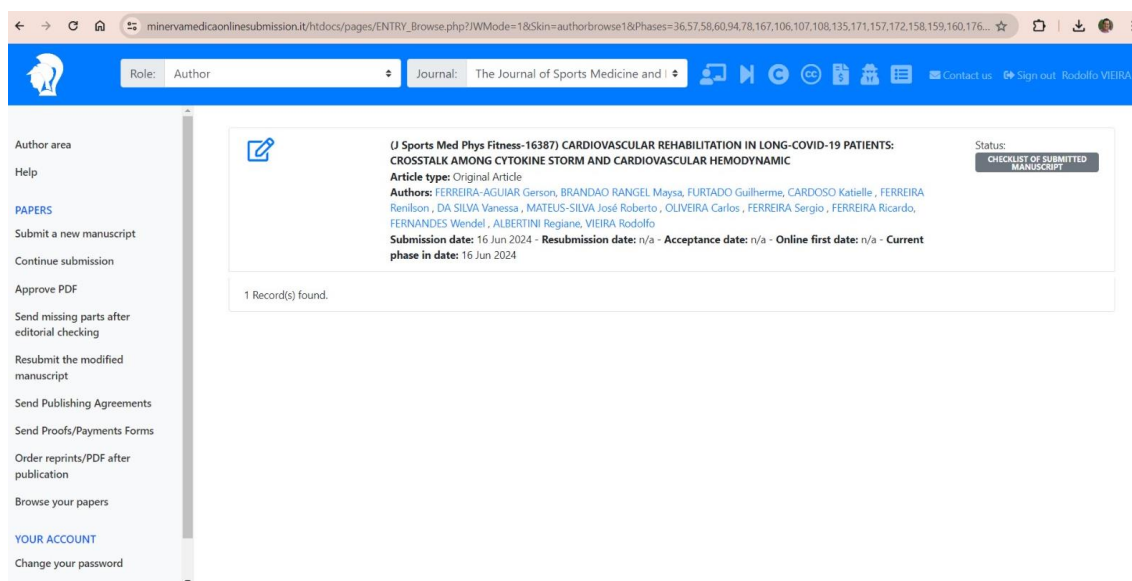
1. Wang, H. A Review of the Effects of Collagen Treatment in Clinical Studies. *Polymers* **2021**, *13*, 3868. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
2. Gordon, M.K.; Hahn, R.A. Collagens. *Cell Tissue Res.* **2010**, *339*, 247–257. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
3. Ricard-Blum, S. The collagen family. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2011**, *3*, a004978. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]

4. Xu, S.; Zhao, Y.; Song, W.; Zhang, C.; Wang, Q.; Li, R.; Shen, Y.; Gong, S.; Li, M.; Sun, L. Improving the Sustainability of Processing By-Products: Extraction and Recent Biological Activities of Collagen Peptides. *Foods* **2023**, *12*, 1965. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
5. Figueres Juher, T.; Basés Pérez, E. Revisión de los efectos beneficiosos de la ingesta de colágeno hidrolizado sobre la salud osteoarticular y el envejecimiento dérmico [An overview of the beneficial effects of hydrolysed collagen intake on joint and bone health and on skin ageing]. *Nutr. Hosp.* **2015**, *32* (Suppl. 1), 62–66. (In Spanish) [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Zague, V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch. Dermatol. Res.* **2008**, *300*, 479–483. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Zhuang, Y.; Hou, H.; Zhao, X.; Zhang, Z.; Li, B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *J. Food Sci.* **2009**, *74*, H183–H188. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Pati, F.; Datta, P.; Adhikari, B.; Dhara, S.; Ghosh, K.; Das Mohapatra, P.K. Collagen scaffolds derived from fresh water fish origin and their biocompatibility. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2012**, *100*, 1068–1079. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Pyun, H.B.; Kim, M.; Park, J.; Sakai, Y.; Numata, N.; Shin, J.Y.; Shin, H.J.; Kim, D.U.; Hwang, J.K. Effects of Collagen Tripeptide Supplement on Photoaging and Epidermal Skin Barrier in UVB-exposed Hairless Mice. *Prev. Nutr. Food Sci.* **2012**, *17*, 245–253. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
10. Bi, C.; Li, X.; Xin, Q.; Han, W.; Shi, C.; Guo, R.; Shi, W.; Qiao, R.; Wang, X.; Zhong, J. Effect of extraction methods on the preparation of electrospon/electrosprayed microstructures of tilapia skin collagen. *J. Biosci. Bioeng.* **2019**, *128*, 234–240. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Vidal, A.R.; Duarte, L.P.; Schmidt, M.M.; Cansian, R.L.; Fernandes, I.A.; de Oliveira Mello, R.; Demiate, I.M.; Dornelles, R.C.P. Extraction and characterization of collagen from sheep slaughter by-products. *Waste Manag.* **2020**, *102*, 838–846. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Nekliudov, A.D.; Berdutina, A.V.; Ivankin, A.N.; Mitaleva, S.I.; Evstaf'eva, E.A. Kollagenovye fraktsii, poluchaemy vodno-solevoi ekstrakts'ei iz syr'ia zhivotnogo proiskhozhdeniia [Collagen fractions, obtained by water-salt extraction from animal fats]. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **2003**, *39*, 483–488. (In Russian) [\[PubMed\]](#)
13. Vargasa-Muñoz, D.P.; Kurozawa, L.E. Influence of combined hydrolyzed collagen and maltodextrin as carrier agents in spray drying of cocona pulp. *Braz. J. Food Technol.* **2020**, *23*, e2019254. [\[CrossRef\]](#)
14. López-Morales, C.A.; Vázquez-Leyva, S.; Vallejo-Castillo, L.; Carballo-Uicab, G.; Muñoz-García, L.; Herbert-Pucheta, J.E.; Zepeda-Vallejo, L.G.; Velasco-Velázquez, M.; Pavón, L.; Pérez-Tapia, S.M.; et al. Determination of Peptide Profile Consistency and Safety of Collagen Hydrolysates as Quality Attributes. *J. Food Sci.* **2019**, *84*, 430–439. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
15. Burdock, G.A.; Carabin, I.G. Generally recognized as safe (GRAS): History and description. *Toxicol. Lett.* **2004**, *150*, 3–18. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Brandao-Rangel, M.A.R.; Oliveira, C.R.; da Silva Olimpico, F.R.; Aimbire, F.; Mateus-Silva, J.R.; Chaluppe, F.A.; Vieira, R.P. Hydrolyzed Collagen Induces an Anti-Inflammatory Response That Induces Proliferation of Skin Fibroblast and Keratinocytes. *Nutrients* **2022**, *14*, 4975. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
17. Chotphruethipong, L.; Sukketsiri, W.; Aluko, R.E.; Sae-Leaw, T.; Benjakul, S. Effect of hydrolyzed collagen from defatted Asian sea bass (*Lates calcarifer*) skin on fibroblast proliferation, migration and antioxidant activities. *J. Food Sci. Technol.* **2021**, *58*, 541–551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
18. Offengenden, M.; Chakrabarti, S.; Wu, J. Chicken collagen hydrolysates differentially mediate anti-inflammatory activity and type I collagen synthesis on human dermal fibroblasts. *Food Sci. Hum. Wellness* **2018**, *7*, 138–147. [\[CrossRef\]](#)
19. Molenaar, J.C. From the library of the Netherlands Journal of Medicine. Rudolf Virchow: Die Cellularpathologie in ihrer Begründung auf physiologische und pathologische Gewebelehre; 1858. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* **2003**, *147*, 2236–2244. [\[PubMed\]](#)
20. Plikus, M.V.; Wang, X.; Sinha, S.; Forte, E.; Thompson, S.M.; Herzog, E.L.; Driskell, R.R.; Rosenthal, N.; Biernaskie, J.; Horsley, V. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. *Cell* **2021**, *184*, 3852–3872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
21. Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D.G.; PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. *PLoS Med.* **2009**, *6*, e1000097. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
22. Downs, S.H.; Black, N. The feasibility of creating a checklist for the assessment of the methodological quality both of randomised and non-randomised studies of health care interventions. *J. Epidemiol. Community Health* **1998**, *52*, 377–384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
23. Chai, H.J.; Li, J.H.; Huang, H.N.; Li, T.L.; Chan, Y.L.; Shiau, C.Y.; Wu, C.J. Effects of sizes and conformations of fish-scale collagen peptides on facial skin qualities and transdermal penetration efficiency. *J. Biomed. Biotechnol.* **2010**, *2010*, 757301. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
24. Chotphruethipong, L.; Aluko, R.E.; Benjakul, S. Hydrolyzed collagen from porcine lipase-defatted seabass skin: Antioxidant, fibroblast cell proliferation, and collagen production activities. *J. Food Biochem.* **2019**, *43*, e12825. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Chotphruethipong, L.; Sukketsiri, W.; Battino, M.; Benjakul, S. Conjugate between hydrolyzed collagen from defatted seabass skin and epigallocatechin gallate (EGCG): Characteristics, antioxidant activity and in vitro cellular bioactivity. *RSC Adv.* **2021**, *11*, 2175–2184. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)
26. Wauquier, F.; Boutin-Wittrant, L.; Bouvret, E.; Le Faouder, J.; Roux, V.; Macian, N.; Pickering, G.; Wittrant, Y. Benefits of Circulating Human Metabolites from Fish Cartilage Hydrolysate on Primary Human Dermal Fibroblasts, an Ex Vivo Clinical Investigation for Skin Health Applications. *Nutrients* **2022**, *14*, 5027. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#) [\[PubMed Central\]](#)

27. Wang, Y.; Zhang, C.L.; Zhang, Q.; Li, P. Composite electrospun nanomembranes of fish scale collagen peptides/chito-oligosaccharides: Antibacterial properties and potential for wound dressing. *Int. J. Nanomed.* **2011**, *6*, 667–676. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
28. Chotphruethipong, L.; Hutamekalin, P.; Nilsuwan, K.; Sukketsiri, W.; Aluko, R.E.; Abdul, N.R.; Benjakul, S. Combined Effects of Defatted Hydrolyzed Collagen from Salmon Skin and Vitamin C on Proliferation and Migration of Human Fibroblast Cell. *Fishes* **2022**, *7*, 265. [[CrossRef](#)]
29. Lin, P.; Hua, N.; Hsu, Y.C.; Kan, K.W.; Chen, J.H.; Lin, Y.H.; Lin, Y.H.; Kuan, C.M. Oral Collagen Drink for Antiaging: Antioxidation, Facilitation of the Increase of Collagen Synthesis, and Improvement of Protein Folding and DNA Repair in Human Skin Fibroblasts. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2020**, *2020*, 8031795. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)] [[PubMed Central](#)]
30. Benjakul, S.; Kamjanapratum, S.; Visessanguan, W. Hydrolysed collagen from Lates calcarifer skin: Its acute toxicity and impact on cell proliferation and collagen production of fibroblasts. *Food Sci. Technol.* **2018**, *53*, 1871–1879. [[CrossRef](#)]

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Anexo IV. Artigo Submetido à Publicação



Cardiovascular Rehabilitation in Long-COVID-19 Patients: Crosstalk Among Cytokine Storm and Cardiovascular Hemodynamic

Gerson Ferreira-Aguiar¹, Maysa Alves Rodrigues Brandao-Rangel², Guilherme Eustáquio Furtado³, Katielle Rodrigues da Silva Cardoso¹, Renilson Moraes-Ferreira², Vanessa Lopes da Silva², José Roberto Mateus-Silva⁴, Carlos Rocha Oliveira⁴, Victor Hugo Souza-Palmeira², Sergio Cesar Ferreira², Ricardo Cesar Alves Ferreira², Wendel Simões Fernandes², Regiane Albertini², Rodolfo P Vieira^{1,2}

1- Evangelical University of Goiás (UniEvangélica), Avenida Universitária Km 3,5, Anápolis – GO, Brazil, 75083-515.

2- Federal University of São Paulo (UNIFESP), Rua Talim 330, São José dos Campos – SP, Brazil, 12247-014.

3- Polytechnic Institute of Coimbra, Applied Research Institute, Rua da Misericórdia, Lagar dos Cortiços-S. Martinho do Bispo, Coimbra, Portugal, 3045-093.

4- Sophia Institute, Rua Comendador Remo Cesaroni 223, São José dos Campos – SP, Brazil, 12243-020.

Corresponding author:

Prof. Dr. Rodolfo P Vieira

Evangelical University of Goiás (UniEvangélica)

Avenida Universitária Km 3,5, Anápolis – GO, Brazil, 75083-515.

rodrelena@yahoo.com.br

+55 12 99141-0615

Abstract

Background: The coronavirus disease 2019 (COVID-19), caused by the SARS-CoV-2 virus, has resulted in a global health crisis, significantly impacting cardiovascular health. COVID-19 is associated with vascular dysfunction, myocardial injury, and a range of cardiovascular complications. This study aimed to evaluate the effects of a cardiopulmonary rehabilitation (CPR) program on cardiovascular hemodynamics and heart rate variability (HRV) in post-COVID-19 patients. **Methods:** Thirty-three post-COVID-19 volunteers participated in a structured CPR program. Clinical and laboratory parameters were assessed pre- and post-intervention, focusing on metabolic characteristics, cardiovascular parameters, hematological and immunological responses, and serum cytokine levels. **Results:** The CPR program significantly reduced body weight ($p < 0.0002$),

BMI ($p<0.0002$), waist circumference ($p<0.0004$), and fat mass ($p<0.0001$), while increasing fat-free mass ($p<0.0002$). Improvements were observed in systolic and diastolic blood pressure ($p<0.0002$), resting heart rate ($p<0.0001$), and resting SpO₂ ($p<0.0001$). Hematological analysis showed increased neutrophils ($p<0.0004$), basophils ($p<0.0089$), monocytes ($p<0.0026$), and the lymphocyte/neutrophil ratio ($p<0.0001$). Cardiovascular hemodynamics improved, with significant increases in stroke volume ($p<0.0429$) and stroke volume index ($p<0.0251$), and early diastolic function ratio ($p<0.0463$). Additionally, the CPR program reduced pro-inflammatory cytokines IL-1 β ($p<0.0001$), IL-2 ($p<0.0022$), and IL-6 ($p<0.0004$), while increasing anti-inflammatory cytokines IL-1RA ($p<0.0001$) and IL-10 ($p<0.0001$), and antiviral cytokines IFN- β ($p<0.0001$) and IFN- γ ($p<0.0003$). Conclusion: Early intervention using a CPR program in post-COVID-19 patients significantly improves cardiovascular hemodynamic response, dampens the pro-inflammatory response, and enhances anti-inflammatory and antiviral responses. These findings underscore the importance of CPR in improving the prognosis and quality of life for post-COVID-19 patients.

Keywords: long-COVID-19, heart function, cardiovascular hemodynamics, cardiopulmonary rehabilitation, heart rate variability.

Introduction

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) has evolved into a global health crisis, with millions of confirmed cases worldwide. While initial focus has been on the acute respiratory manifestations, emerging evidence underscores the substantial impact of COVID-19 on cardiovascular health (1).

COVID-19 poses a significant risk for vascular dysfunction, characterized by endothelial injury, inflammation, and thrombotic events. Endothelial dysfunction, driven by direct viral invasion and systemic inflammation, contributes to impaired vasoregulation, microvascular dysfunction, and a prothrombotic milieu, predisposing individuals to arterial and venous thromboembolic complications (1). Beyond that, myocardial involvement in COVID-19 ranges from mild myocarditis to fulminant myocardial infarction, culminating in cardiomyopathy and heart failure. Direct viral myocardial injury, immune-mediated damage, and cytokine storm syndrome collectively contribute to myocardial inflammation, fibrosis, and impaired contractility, thereby precipitating the onset or exacerbation of heart failure syndromes (1).

The collective data suggests a reduction in overall stroke volume observed during the COVID-19 pandemic. This decline aligns with findings from the Italian study conducted by Morelli et al. and mirrors the trends observed in interventional cardiology practices in Spain (2). The aggregated analyses, when compared with control groups, revealed a notable correlation between post-COVID-19 status and diminished parameters including left ventricular ejection fraction (LV EF), left ventricular end-diastolic volume (LV EDV), left ventricular stroke volume (LV SV),

mitral annular plane systolic excursion (MAPSE), global longitudinal strain, right ventricular ejection fraction (RV EF), right ventricular end-diastolic volume (RV EDV), right ventricular end-systolic volume (RV ESV), right ventricular stroke volume (RV SV), tricuspid annular plane systolic excursion, alongside an increase in left ventricular mass (3).

In this way, the literatures point out the need of cardiopulmonary rehabilitation (CPR) delivery for patients experiencing long-COVID-19 symptoms (4, 5). However, the exact effects of CPR on cardiovascular hemodynamics and its possible correlation with heart rate variability (HRV) remains unexplored and constitute the aim of the present study.

Material and Methods

Recruitment and Selection of Volunteers

Volunteers were recruited through social media and announcements at Emergency Care Units (UPA) and Basic Health Units (UBS) in the municipality of São José dos Campos, SP, Brazil. Individuals of both sexes between 18 and 85 years old who had confirmed COVID-19, verified by RT-PCR or antigen tests, were recruited. These individuals were subsequently stratified into mild, moderate, severe, and critical patients according to the criteria adopted by the World Health Organization (WHO) (6).

Experimental Protocol

A total of 33 post-COVID-19 patients were studied, classified as moderate to severe according to the WHO criteria (6). The individuals were evaluated before the start of the project and after 90 days of rehabilitation. Moderate post-COVID-19 individuals were defined as those who had a positive rapid test, antigen test,

or RT-PCR test and presented the following symptoms: dry cough, runny nose, sore throat, diffuse body aches, persistent fever, without hypoxemia. Severe post-COVID-19 individuals were those who, in addition to one or more of the aforementioned symptoms, presented hypoxemia (oxygen saturation – SpO₂ ≤ 93%) requiring hospitalization with or without ventilatory support (invasive or non-invasive) (6).

Cardiopulmonary Rehabilitation Protocol with Physical Activity

The CPR program consisted of 3 weekly sessions on alternating days with 5 minutes of warm-up, 5 minutes of stretching, 20 minutes of continuous moderate-intensity aerobic exercise, 20 minutes of moderate-intensity resistance exercise, and 10 minutes of stretching for cooling down. Aerobic physical training was performed on a treadmill or stationary bike, according to the volunteer's preference, starting at 60% of maximum heart rate and increasing intensity by 2% each week, for a period of 20 minutes. Resistance physical training was performed at moderate intensity, corresponding to 75% of maximum load, with 4 sets of 10-15 repetitions and 1-minute rest intervals between sets. The following exercises were performed: bench press, lat pull-down, lateral raise, leg extension, leg curl, and calf raise. Stretching exercises included classical exercises for the upper and lower limbs.

Hemodynamic Evaluation by Impedance Cardiography

Impedance cardiography was performed using the Physioflow® device (Bristol, USA), which provides continuous, accurate, reproducible, and sensitive measurements of heart rate (HR), cardiac output (CO), stroke volume (SV), cardiac index (CI), ejection fraction (EF), end-diastolic volume (EDV), thoracic

fluid index (TFI), and peripheral vascular resistance (PVR) (7). Volunteers were instructed to undress (removing shirt/blouse) and lie down in the supine position. The areas where the 6 electrodes were positioned were disinfected with 70% alcohol. After electrode placement, a 1-minute stabilization period was observed. After this stabilization period, signal recording was initiated for a period of 3 minutes (7).

Statistical Analysis

GraphPad Prism 5.0 software was used for statistical analysis and graph construction. The normality of the data was assessed using the Pearson test. Parametric data were evaluated using ONE WAY ANOVA followed by the Newman-Keuls test. Non-parametric data were evaluated using ANOVA ON RANKS followed by the Dunn's test for group comparisons. A p-value of <0.05 was considered statistically significant.

Results

Clinical and Laboratory Characterization of Post-COVID-19 Volunteers

Table 1 shows the clinical and laboratory characteristics of the post-COVID-19 volunteers pre and post CPR program. The results showed that CPR significantly reduced body weight ($p<0.0002$), BMI ($p<0.0002$), waist circumference ($p<0.0004$), and fat mass ($p<0.0001$), while increased the fat free mass ($p<0.0002$), revealing a positive effect on metabolic characteristics of post-COVID-19 patients. The CPR program also improved the systolic and diastolic blood pressure ($p<0.0002$), displaying an improvement of cardiovascular parameters. The CPR program significantly improved the number of blood neutrophils ($p<0.0004$), basophils ($p<0.0089$), monocytes ($p<0.0026$), and the

lymphocyte/neutrophil ($p < 0.0001$), demonstrating a positive effect on hematological and immunological cellular response. The resting heart rate ($p < 0.0001$) and resting SpO₂ ($p < 0.0001$) was improved by CPR, confirming an improvement in the cardiorespiratory response.

Effects of Rehabilitation on the Cardiovascular Hemodynamics of Post-COVID-19 Volunteers

The results shown in Figure 1 reveals that CPR program significantly improved the stroke volume ($p < 0.0429$), and that such improvement was retained even when a correction was calculated and corrected by body surface, which is characterized by the stroke volume index ($p < 0.0251$). In addition, the early diastolic function ratio was increased after the CPR ($p < 0.0463$). On the other hand, cardiac output ($p > 0.05$), cardiac index ($p > 0.05$), systemic vascular resistance ($p > 0.05$), systemic vascular resistance index ($p > 0.05$), left cardiac work index ($p > 0.05$), estimated ejection fraction (%) ($p > 0.05$), end diastolic volume ($p > 0.05$) and the thoracic fluid index ($p > 0.05$) did not present any significant alterations after the CPR program.

Effects of Rehabilitation on the Systemic Immune and Inflammatory Response of Post-COVID-19 Volunteers

The results showed in the Figure 2 demonstrates the serum levels of pro-inflammatory, anti-inflammatory and anti-viral cytokines, which are cytokines involved in the classical cytokine storm in COVID-19. So, the Figure 2 shows that CPR program reduced the levels of pro-inflammatory cytokine IL-1 β (Figure 2A; $p < 0.0001$), IL-2 (Figure 2C; $p < 0.0022$), IL-6 (Figure 2B; $p < 0.0004$), while increased the levels of anti-inflammatory cytokines IL-1RA (Figure 2D; $p < 0.0001$)

and IL-10 (Figure 2E; $p < 0.0001$). Furthermore, the levels of anti-viral cytokines IFN- β (Figure 2F; $p < 0.0001$) and IFN- γ (Figure 2G; $p < 0.0003$) was significantly increased by CPR program, strongly reinforcing the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of CPR program in post-COVID-19 patients.

Discussion

The present study revealed for the first time that cardiopulmonary rehabilitation in post-COVID-19 patients results in improvement of cardiovascular hemodynamic response, which was followed by strong positive immunomodulation effect, characterized by damping the systemic levels pro-inflammatory cytokines, while increased the anti-inflammatory and anti-viral cytokines, conferring protection and improving the prognosis for post-COVID-19 patients.

This study demonstrated for the first time that cardiovascular hemodynamic alterations induced by COVID-19 are persistent and asymptomatic, necessitating intervention. This novel study also shows that a CPR program, consisting of aerobic and strengthening exercises, was able to reestablish a normal cardiovascular hemodynamic response.

A recent study involving 5 million patients found that COVID-19 survivors faced a significantly higher risk—up to 2,000%—of developing cardiovascular issues (heart attack, arrhythmias), pulmonary problems (hypoxemia, dyspnea), metabolic disorders (diabetes, dyslipidemia), and neurological conditions (cognitive impairment, sleep disorders, stroke) within 1 to 6 months post-infection (8). Our study supports these findings by detailing specific cardiovascular hemodynamic changes in moderate and severe post-COVID-19 patients and

emphasizes the importance of early cardiopulmonary rehabilitation. The CPR program, conducted three times a week for 3 months, significantly improved these patients' cardiovascular health.

We observed that resting heart rate significantly reduced after 3 months of CPR program. Increased heart rate in post-COVID-19 patients is typically due to autonomic imbalance (9). Although we did not analyze autonomic balance through heart rate variability, this limitation does not diminish the significance of our findings. Additionally, our study showed reductions in resting systolic and diastolic blood pressure, which are critical since hypertension is a major risk factor for cardiovascular events, renal diseases, and end-organ damage, often underestimated by clinicians (10). In post-COVID-19 patients, hypertension becomes crucial as many were not hypertensive pre-infection and may not monitor their blood pressure afterward. Hypertension can reduce stroke volume (11). Importantly, we observed significant improvements in stroke volume, stroke volume index, and end-diastolic volume, corresponding with decreased blood pressure.

Improvements in stroke volume and stroke volume index, which adjusts stroke volume for body surface area, were notable after 3 months of CPR program. Low stroke volume is linked to higher mortality rates from cardiovascular events over 10 years (11, 12). Improved stroke volume indicates better heart pump function and blood perfusion (12). Despite these improvements, changes were not seen in cardiac output, cardiac index, systemic vascular resistance, systemic vascular resistance index, left ventricular work index, ejection fraction, end-diastolic volume, and thoracic fluid content index.

The rehabilitation program also improved early diastolic function rate, suggesting enhanced ventricular filling capacity (13). So, is important to point out that this is the first study showing significant improvement in early diastolic function after 3 months of CPR program in post-COVID-19 patients.

Post-COVID-19 patients often exhibit cardiovascular autonomic disorders like dysautonomia, caused by neurotropism, cytokine storms, and persistent inflammation (14). This study uniquely showed that CPR program decreased serum levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-2, and IL-6, while increased anti-inflammatory cytokines IL-1RA and IL-10, and antiviral cytokines IFN- β and IFN- γ .

Elevated IL-1 β levels are found in moderate, severe, and critical COVID-19 patients and are associated with heart failure (15). While we cannot establish a direct causal link between reduced IL-1 β levels and improved cardiac hemodynamics, future studies may clarify this. Reduced IL-2 levels post-CPR program are significant since increased IL-2 is associated with cardiac dysfunction and remodeling in COVID-19 (16, 17), as well as severe chronotropic impairment (16, 17).

Elevated IL-6 levels in COVID-19 patients correlate with higher mortality and cardiac dysfunction (18, 19). Reducing IL-6 levels through CPR program underscores the importance of early intervention to prevent cardiovascular conditions. Increasing IL-1RA and IL-10 levels, which are associated with better outcomes in myocarditis (20), further highlights the rehabilitation's benefits observed in the present study.

Additionally, this study demonstrated that CPR program significantly increased antiviral cytokines IFN- β and IFN- γ , which are crucial for combating viral infections and reducing SARS-CoV-2 replication (21, 22). While we did not directly study viral replication inhibition, our findings suggest a potential antiviral benefit from increased IFN- γ and IFN- β levels induced by CPR program.

Therefore, we conclude that early intervention using a CPR program in post-COVID-19 patients improves cardiovascular hemodynamic response, dampens the pro-inflammatory response, and enhances both anti-inflammatory and antiviral responses.

References

- 1- Składanek JA, Leśkiewicz M, Gumieźna K, Baruś P, Piasecki A, Klimczak-Tomaniak D, Sygitowicz G, Kochman J, Grabowski M, Tomaniak M. Long COVID and its cardiovascular consequences: What is known? *Adv Clin Exp Med*. 2023 Jun 30. doi: 10.17219/acem/167482. Epub ahead of print. PMID: 37386857.
- 2- Pasarikovski CR, da Costa L. The Impact of the Covid-19 Pandemic on Stroke Volume. *Can J Neurol Sci*. 2020 Nov;47(6):847-848. doi: 10.1017/cjn.2020.116. Epub 2020 Jun 4. PMID: 32493522; PMCID: PMC7327147.
- 3- Rahmati M, Koyanagi A, Banitalebi E, Yon DK, Lee SW, Il Shin J, Smith L. The effect of SARS-CoV-2 infection on cardiac function in post-COVID-19 survivors: A systematic review and meta-analysis. *J Med Virol*. 2023 Jan;95(1):e28325. doi: 10.1002/jmv.28325. PMID: 36401352.
- 4- Nouredine S, Roux-Claudé P, Eberst G, Westeel V, Barnig C, Claudé F. The role of the cardiopulmonary exercise test and pulmonary rehabilitation in long COVID-19. *Rev Mal Respir*. 2023 Sep;40(7):604-622. French. doi:

10.1016/j.rmr.2023.05.003. Epub 2023 Jun 23. PMID: 37357041; PMCID: PMC10289121.

5- Oliveira MR, Hoffman M, Jones AW, Holland AE, Borghi-Silva A. Effect of Pulmonary Rehabilitation on Exercise Capacity, Dyspnea, Fatigue, and Peripheral Muscle Strength in Patients with Post-COVID-19 Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*. 2024 Feb 3:S0003-9993(24)00049-2. doi: 10.1016/j.apmr.2024.01.007. Epub ahead of print. PMID: 38311096.

6- World Health Organization. "Situation Reports." WHO, 16 May 2023, URL: <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/situation-reports>.

7- Louvaris Z, Spetsioti S, Andrianopoulos V, Chynkiamis N, Habazettl H, Wagner H, Zakynthinos S, Wagner PD, Vogiatzis I. Cardiac output measurement during exercise in COPD: A comparison of dye dilution and impedance cardiography. *Clin Respir J*. 2019 Apr;13(4):222-231. doi: 10.1111/crj.13002. Epub 2019 Feb 28. PMID: 30724023.

8- Al-Aly Z, Xie Y, Bowe B. High-dimensional characterization of post-acute sequelae of COVID-19. *Nature*. 2021 Jun;594(7862):259-264. doi: 10.1038/s41586-021-03553-9. Epub 2021 Apr 22. PMID: 33887749.

9- Ståhlberg M, Reistam U, Fedorowski A, Villacorta H, Horiuchi Y, Bax J, Pitt B, Matskeplishvili S, Lüscher TF, Weichert I, Thani KB, Maisel A. Post-COVID-19 Tachycardia Syndrome: A Distinct Phenotype of Post-Acute COVID-19 Syndrome. *Am J Med*. 2021 Dec;134(12):1451-1456. doi:

10.1016/j.amjmed.2021.07.004. Epub 2021 Aug 11. PMID: 34390682; PMCID: PMC8356730.

10- Delalić Đ, Jug J, Prkačin I. Arterial Hypertension Following COVID-19: A Retrospective Study of Patients in a Central European Tertiary Care Center. *Acta Clin Croat*. 2022 Jun;61(Suppl 1):23-27. doi: 10.20471/acc.2022.61.s1.03. PMID: 36304797; PMCID: PMC9536154.

11- de Simone G, Roman MJ, Koren MJ, Mensah GA, Ganau A, Devereux RB. Stroke volume/pulse pressure ratio and cardiovascular risk in arterial hypertension. *Hypertension*. 1999 Mar;33(3):800-5. doi: 10.1161/01.hyp.33.3.800. PMID: 10082490.

12- Vieira SS, Lemes B, de T C de Carvalho P, N de Lima R, S Bocalini D, A S Junior J, Arsa G, A Casarin C, L Andrade E, J Serra A. Does Stroke Volume Increase During an Incremental Exercise? A Systematic Review. *Open Cardiovasc Med J*. 2016 Apr 27;10:57-63. doi: 10.2174/1874192401610010057. PMID: 27347221; PMCID: PMC4896996.

13- Sharma D, Rohila A, Deora S, Garg MK, Misra S. Cardiac assessment of patients during post COVID-19 recovery phase: a prospective observational study. *Glob Cardiol Sci Pract*. 2022 Dec 30;2022(3):e202218. doi: 10.21542/gcsp.2022.18. PMID: 36660166; PMCID: PMC9840129.

14- Marques KC, Quaresma JAS, Falcão LFM. Cardiovascular autonomic dysfunction in "Long COVID": pathophysiology, heart rate variability, and inflammatory markers. *Front Cardiovasc Med*. 2023 Sep 1;10:1256512. doi: 10.3389/fcvm.2023.1256512. PMID: 37719983; PMCID: PMC10502909.

- 15- Makaremi S, Asgarzadeh A, Kianfar H, Mohammadnia A, Asghariazar V, Safarzadeh E. The role of IL-1 family of cytokines and receptors in pathogenesis of COVID-19. *Inflamm Res*. 2022 Aug;71(7-8):923-947. doi: 10.1007/s00011-022-01596-w. Epub 2022 Jun 25. PMID: 35751653; PMCID: PMC9243884.
- 16- Unudurthi SD, Luthra P, Bose RJC, McCarthy JR, Kontaridis MI. Cardiac inflammation in COVID-19: Lessons from heart failure. *Life Sci*. 2020 Nov 1;260:118482. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118482. Epub 2020 Sep 21. PMID: 32971105; PMCID: PMC7505073.
- 17- Sobotka PA, McMannis J, Fisher RI, Stein DG, Thomas JX Jr. Effects of interleukin 2 on cardiac function in the isolated rat heart. *J Clin Invest*. 1990 Sep;86(3):845-50. doi: 10.1172/JCI114783. PMID: 2394834; PMCID: PMC296801.
- 18- Wang J, Yang X, Li Y, Huang JA, Jiang J, Su N. Specific cytokines in the inflammatory cytokine storm of patients with COVID-19-associated acute respiratory distress syndrome and extrapulmonary multiple-organ dysfunction. *Virol J*. 2021 Jun 4;18(1):117. doi: 10.1186/s12985-021-01588-y. PMID: 34088317; PMCID: PMC8177255.
- 19- Coomes EA, Haghbayan H. Interleukin-6 in Covid-19: A systematic review and meta-analysis. *Rev Med Virol*. 2020 Nov;30(6):1-9. doi: 10.1002/rmv.2141. Epub 2020 Aug 26. PMID: 32845568; PMCID: PMC7460877.
- 20- Thurner L, Kessel C, Fadle N, Regitz E, Seidel F, Kindermann I, Lohse S, Kos I, Tschöpe C, Kheiroddin P, Kiblböck D, Hoffmann MC, Bette B, Carbon G, Cetin O, Preuss KD, Christofyllakis K, Bittenbring JT, Pickardt T, Fischer Y, Thiele H, Baldus S, Stangl K, Steiner S, Gietzen F, Kerber S, Deneke T, Jellinghaus S,

Linke A, Ibrahim K, Grabmaier U, Massberg S, Thilo C, Greulich S, Gawaz M, Mayatepek E, Meyer-Dobkowitz L, Kindermann M, Birk E, Birk M, Lainscak M, Foell D, Lepper PM, Bals R, Krawczyk M, Mevorach D, Hasin T, Keren A, Kabesch M, Abdul-Khaliq H, Smola S, Bewarder M, Thurner B, Böhm M, Pfeifer J, Klingel K. IL-1RA Antibodies in Myocarditis after SARS-CoV-2 Vaccination. *N Engl J Med*. 2022 Oct 20;387(16):1524-1527. doi: 10.1056/NEJMc2205667. Epub 2022 Sep 21. PMID: 36130012; PMCID: PMC9513854.

21- Mansoor S, Butt AR, Bibi A, Mushtaq S, Ullah I, Alshahrani F, Khan A, Mansoor A. Expression of IFN-Gamma is significantly reduced during severity of COVID-19 infection in hospitalized patients. *PLoS One*. 2023 Sep 27;18(9):e0291332. doi: 10.1371/journal.pone.0291332. PMID: 37756264; PMCID: PMC10530045.

22- Sainz B Jr, Mossel EC, Peters CJ, Garry RF. Interferon-beta and nterferon-gamma synergistically inhibit the replication of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV). *Virology*. 2004 Nov 10;329(1):11-7. doi: 10.1016/j.virol.2004.08.011. PMID: 15476870; PMCID: PMC7111895.

Figure Legends

Figure 1 – Figure 1 shows the stroke volume in milliliter (mL), stroke volume index in milliliter per square meters (mL/m²), early diastolic function ratio in percentage (%).

Figure 2 – Figure 2 shows the stroke volume in milliliter (mL), stroke volume index in milliliter per square meters (mL/m²), early diastolic function ratio in percentage (%).