



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA**

**AMANDA STEPHANE CRUZ DOS PASSOS**

**Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de  
lipídios em adipócitos**

**Versão corrigida**

**Ribeirão Preto-SP**

**2024**

**AMANDA STEPHANE CRUZ DOS PASSOS**

**Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de  
lipídios em adipócitos**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade  
de São Paulo para obtenção do título de  
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Osório Silveira  
Leiria

**Ribeirão Preto**

**2024**

**“Versão corrigida. A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)”**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

## **FICHA CATALOGRÁFICA**

Preparada pela Biblioteca Central do campus administrativo de Ribeirão Preto/ USP

PASSOS, AMANDA STEPHANE CRUZ DOS

Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de lipídios em adipócitos. Ribeirão Preto, 2024.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Luiz Osório Silveira Leiria.

1. SARS-CoV-2. 2. Adipócitos. 3. Tecido adiposo. 4. Lipólise.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

PASSOS, Amanda Stephane Cruz dos. **Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de lipídios em adipócitos.** Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências. Área de concentração: Farmacologia.

Aprovado em: 16/01/2024

### BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr.: Luiz Osório Silveira Leiria

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: Luis Lamberti Pinto da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: Jansen de Araujo

Instituição: Instituto de Ciências Biomédias-USP

Assinatura: \_\_\_\_\_

Àqueles que não pouparam esforços para me apoiar em todas as minhas escolhas e estão sempre ao meu lado, fisicamente ou no coração, meus amados pais Adão e Neurene e minhas irmãs Fernanda e Anna Beatriz.

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha sincera gratidão a todas as pessoas e instituições que tornaram possível a realização desta dissertação de mestrado. Este trabalho representa não apenas meu esforço pessoal, mas também o resultado do apoio e colaboração de muitos.

Sou grata a Deus, por ter me dado forças para continuar trabalhando mesmo distante da minha família e durante um período tão difícil de uma pandemia.

Desde quando saí de casa para estudar em outra cidade penso em inúmeras formas de retribuir tudo que os meus pais, Adão e Neurene, fazem por mim, mas creio que é impossível chegar a esse patamar. Portanto, espero que meus esforços e conquistas consigam trazer felicidade a vocês. Obrigada por todo amor e dedicação que me foram dados para chegar até aqui.

Minhas irmãs, Fernanda e Anna Beatriz e meu irmão do peito Fernando, também fizeram parte da minha base forte de apoio e sempre se fizeram presentes, física ou virtualmente, durante esse percurso, obrigada pelo apoio.

Outra pessoa fundamental para esta etapa concluída foi o meu estimado orientador, Luiz Osório, obrigada por sua orientação sábia, paciência infinita e comprometimento incansável com meu crescimento acadêmico. Suas valiosas sugestões, insights e orientações moldaram este trabalho de forma fundamental. Agradeço por sua dedicação e por ser um exemplo inspirador de excelência acadêmica.

Agradeço imensamente aos amigos Tiago, Marcus, Hariff, Tarik, Levy, Natália, Vinícius, Raissa, Gabriel, Davi, Bruna, Giovanni, Patrícia, Layana, Fernanda, Nayara, Letícia, Gisele, Virgulino, Leevan e Jefferson por preencherem minha vida de alegria em Ribeirão Preto.

Aos membros do Laboratório de Pesquisa em Doenças Metabólicas (LPDM), Tiago, João, Ester, Fernanda, Paulo, Nayara, Victor, Orlando, Mateus e Gabrielly meu muito obrigada pela parceria e ensinamentos durante essa jornada.

Ao corpo técnico que compunha os laboratórios LPDM e LID e faziam um trabalho essencial de manter a ordem no ambiente de trabalho, Katinha, Diva, Marcela, Serginho, Ieda, Orlando e Mateus meu muito obrigada. Agradeço também a Gislaine, secretária do programa de Farmacologia que sempre esteve presente e a disposição para nos atender da melhor forma.

Aos meus colaboradores, Giovanni Gomes, Ester Barreto, Tiago Tomazini, Flávio Protasio, Isadora Paiva, Samara Damasceno, Alexandre Fabro, Tatiana Saccon, Marcelo Mori, Daniel Martins, Mariana Boroni Mariana Osako, Ana Beatriz do Anjos, que participaram ativamente deste projeto e forneceram insights valiosos que enriqueceram a pesquisa. Sua expertise e colaboração foram fundamentais para o sucesso deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), gostaria de expressar minha profunda gratidão pelo suporte financeiro concedido a este projeto de pesquisa. Seu compromisso com o avanço da educação e da pesquisa é inestimável e contribui significativamente para o desenvolvimento científico do país.

Por fim, dedico um agradecimento especial à minha família e amigos, que sempre estiveram ao meu lado com amor, incentivo e compreensão durante esta jornada. Seu apoio emocional foi meu alicerce e minha motivação.

Cada um de vocês desempenhou um papel fundamental no sucesso deste trabalho, e sou profundamente grata por todas as formas de apoio que recebi ao longo deste caminho. Este é um marco importante, mas também é um testemunho do poder da colaboração e do compromisso com a busca do conhecimento.

Com gratidão,

Amanda Passos.

"Nada na vida deve ser temido, apenas compreendido. Agora é hora de entender mais, para que possamos temer menos."

(Marie Curie)

## RESUMO

PASSOS, A. S. C. **Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de lipídios em adipócitos.** 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A compreensão completa da doença COVID-19 é crucial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de prevenção, diagnóstico e tratamento. Dada a complexidade e a variabilidade da patogênese da COVID-19, é fundamental investigar como o vírus SARS-CoV-2 interage com diferentes tecidos do corpo humano. Nesse sentido, a pesquisa sobre a infecção por SARS-CoV-2 no tecido adiposo humano emerge como uma área altamente promissora e relevante. Ao explorar essa interação única, podemos obter insights valiosos que não apenas ampliam nossa compreensão da doença, mas também podem abrir caminho para abordagens terapêuticas inovadoras e personalizadas. Neste trabalho, avaliamos o papel do tecido adiposo na infecção por SARS-CoV-2 e como o vírus interage com os adipócitos, incluindo os mecanismos intracelulares utilizados para infectar e se replicar, bem como o impacto da infecção na função lipolítica celular. Para entender os mecanismos intracelulares utilizados pelo vírus para infectar e se replicar em adipócitos, realizamos análises em amostras de tecido adiposo torácico post-mortem de pacientes falecidos por COVID-19. Observamos marcações imunológicas para proteína viral e quantificamos o RNA viral por RT-qPCR. Além disso, infectamos adipócitos humanos maduros em cultura e avaliamos a infecção nessas células. Descobrimos que os adipócitos viscerais são mais suscetíveis à infecção em comparação com os subcutâneos, devido à maior expressão da proteína de entrada viral, a Enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2). O vírus utiliza a maquinaria intracelular, reduzindo a expressão de enzimas envolvidas na lipólise e diminuindo a produção de produtos desse processo, como o glicerol, para sustentar sua replicação e promover uma infecção produtiva. Notavelmente, quando simulamos a ativação lipolítica usando uma droga beta-adrenérgica, observamos um aumento da quantidade de vírus infecciosos no meio extracelular. Esses resultados destacam que as células adiposas viscerais são mais permissivas à infecção por SARS-CoV-2 e revelam a capacidade do vírus de interferir nas proteínas essenciais da lipólise intracelular. Compreender a interação entre o vírus e o tecido adiposo pode fornecer implicações significativas no diagnóstico, tratamento e prevenção da doença.

Palavras-chave: SARS-CoV-2. Adipócitos. Tecido adiposo. Lipólise.

## ABSTRACT

PASSOS, A. S. C. **Impact of SARS-CoV-2 infection on lipid metabolism in adipocytes**. 2023. Dissertação (Mestrado em Ciências)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

A complete understanding of COVID-19 disease is crucial for developing effective prevention, diagnosis, and treatment strategies. Given the complexity and variability of COVID-19 pathogenesis, it is essential to investigate how the SARS-CoV-2 virus interacts with different tissues of the human body. In this sense, research on SARS-CoV-2 infection in human adipose tissue emerges as a highly promising and relevant area. By exploring this unique interaction, we can gain valuable insights that not only expand our understanding of the disease but may also pave the way for innovative and personalized therapeutic approaches. In this work, we evaluate the role of adipose tissue in SARS-CoV-2 infection and how the virus interacts with adipocytes, including the intracellular mechanisms used to infect and replicate, as well as the impact of infection on cellular lipolytic function. To understand the intracellular mechanisms used by the virus to infect and replicate in adipocytes, we performed analyses on post-mortem thoracic adipose tissue samples from patients who died from COVID-19. We observed immunological staining for viral protein and quantified viral RNA by RT-qPCR. Furthermore, we infected mature human adipocytes in culture and assessed infection in these cells. We found that visceral adipocytes are more susceptible to infection compared to subcutaneous adipocytes due to higher expression of the viral entry protein, Angiotensin Converting Enzyme 2 (ACE2). The virus uses the intracellular machinery, reducing the expression of enzymes involved in lipolysis and reducing the production of products from this process, such as glycerol, to sustain its replication and promote a productive infection. Notably, when we simulated lipolytic activation using a beta-adrenergic drug, we observed an increase in the amount of infectious virus in the extracellular environment. These results highlight that visceral adipose cells are more permissive to SARS-CoV-2 infection and reveal the virus's ability to interfere with essential proteins of intracellular lipolysis. Understanding the interaction between the virus and adipose tissue could provide significant implications for the diagnosis, treatment, and prevention of the disease.

Keywords: SARS-CoV-2. Adipocytes. Adipose tissue. Lipolysis



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Desenho experimental-----	21
<b>Figura 2</b> - Tecido adiposo subcutâneo-----	32
<b>Figura 3</b> - Infecção em adipócitosbranco/bege imortalizados-----	33
<b>Figura 4</b> - Vírus decorrente da infecção em adipócito mantém capacidade infectiva -----	34
<b>Figura 5</b> - Imunofluorescência de adipócitos humanos (hADSCs) infectados -----	35
<b>Figura 6</b> - Quantificação de RNA e PFU viral em adipócitos humanos (hADSCs) -----	36
<b>Figura 7</b> – Proteínas de entrada viral em Vis AD e Sub AD-----	37
<b>Figura 8</b> - A infecção pelo SARS-CoV-2 resulta em diferentes respostas relacionadas ao metabolismo de lipídios intracelular-----	39

# Sumário

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b>	<b>19</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b>	<b>20</b>
	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
<b>4</b>	<b>MÉTODOS</b>	<b>21</b>
4.1	Desenho experimental	21
	Pré-adipócitos humanos imortalizados (A41)	21
	Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano	22
	Diferenciação de adipócitos primários	23
	Vírus e Linhagens Celulares	23
	Infecção	24
	Ensaio de formação de placa (PFU)	24
	Extração de RNA	24
	Análise de Carga Viral e Expressão Gênica	25
	Imunofluorescência	26
	Western blotting	26
	Ensaio de lipólise e quantificação de glicerol	27
	Análise estatística	29
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>31</b>
5.1	O SARS-CoV-2 infecta o tecido adiposo?	31
5.1.1	Infecção em tecido adiposo de humanos	31
5.2	O SARS-CoV infecta o adipócito?	32

5.2.1 Infecção de Adipócitos humanos imortalizados e diferenciados .....	32
5.2.2 Adipócitos primários de origem visceral (Vis AD) e subcutânea (Sub AD). .....	34
<b>5.3 Quais as particularidades da infecção quando na presença de uma variante do SARS-CoV-2 e quando decorrentes de diferentes origens anatômicas dos adipócitos? .....</b>	<b>35</b>
5.3.1 Linhagem viral original do SARS-CoV-2 [B1] e variante [P1] .....	35
5.3.2 Proteínas mediadoras da entrada viral .....	36
<b>5.4 Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de lipídios em adipócitos.....</b>	<b>38</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A pandemia de COVID-19 impulsionou investigações científicas sobre os mecanismos patológicos e consequências da infecção pelo vírus SARS-CoV-2. Embora os pulmões sejam amplamente afetados, outros órgãos e tecidos também podem ser alvos do vírus, incluindo o tecido adiposo (ZICKLER et al.,2022). Desregulações nesse tecido estão associadas a doenças cardiovasculares, diabetes e obesidade. Estes, são fatores de risco para a gravidade da COVID-19 (STEFAN; BIRKENFELD; SCHULZE, 2021). Investigar a relação entre o SARS-CoV-2 e os adipócitos, principais células do tecido adiposo, proporciona uma nova perspectiva sobre os mecanismos de entrada e replicação do vírus e contribui para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas eficazes. Este trabalho aborda a relevância e implicações dessa investigação em adipócitos humanos.

O vírus que deu origem a chamada nova pneumonia causada por coronavírus foi relatado pela primeira vez na cidade de Wuhan em dezembro de 2019. Este foi então identificado e nomeado como um novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), causador da doença COVID-19 (GRALINSKI et al.,2020). Com a disseminação do vírus em escala global e o aumento das contaminações a Organização Mundial da Saúde (OMS) anunciou a pandemia em março de 2020. Com o número de contaminações ainda crescente, a OMS passou a relatar novos recordes mundiais de casos da COVID-19 registrados a cada mês ainda no ano de 2022, dois anos após o início da pandemia.

Embora o COVID-19 tenha manifestações clínicas variadas, os pacientes podem apresentar sintomas de leves a severos. Vários fatores de risco aumentam a probabilidade de desenvolver a forma grave da doença, mas comorbidades como doenças cardiovasculares, danos nos rins, disfunção hepática, doença de Parkinson, câncer, diabetes e obesidade são os mais comuns (CHILAMAKURI et al., 2021).

### **A obesidade enquanto fator de risco para a COVID-19 severa**

A obesidade é um dos principais fatores de risco associados à COVID-19. Isso ocorre em parte devido ao aumento do Índice de Massa Corporal (IMC), que está diretamente relacionado ao acúmulo de tecido adiposo. Nesse sentido, o IMC, por si só já foi associado ao aumento da gravidade dos sintomas (GAO et al., 2021). Um estudo destacou uma forte correlação entre o aumento do IMC e o maior risco de

desenvolver COVID-19 grave, resultando em hospitalização e/ou morte, além do aumento linear das admissões em UTIs (GAO et al., 2021). Além disso, o tecido adiposo visceral tem recebido grande atenção devido a sua associação com piores desfechos clínicos em pacientes com COVID-19 (YANG et al., 2020; WATANABE et al., 2020).

O tecido adiposo, antes considerado apenas um reservatório de energia, mas que nos últimos anos está sendo alvo de estudos que revelam funções de um órgão endócrino altamente ativo. Além de seu papel na regulação metabólica e no armazenamento de energia, o tecido adiposo secreta hormônios e citocinas que desempenham funções essenciais na homeostase do organismo (RICHARD et al., 2020; MORIGNY et al., 2021). Sua capacidade de modular a resposta imunológica e seu envolvimento em processos inflamatórios tornam-no um alvo intrigante para a investigação da infecção por SARS-CoV-2 (AGHILI et al., 2021).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, uma vez que dependem das células hospedeiras para se reproduzirem. Eles não possuem metabolismo próprio e podem infectar uma ampla variedade de células, utilizando o maquinário celular para perpetuar a infecção (GORWOOD et al., 2019). O metabolismo dos ácidos graxos (AGs) é tão importante para os vírus quanto para as células eucarióticas. No entanto, como o vírus não possui as vias enzimáticas para a síntese de AG, eles sequestram a maquinaria das células hospedeiras e manipulam o metabolismo lipídico da célula hospedeira para facilitar sua montagem e replicação, sem considerar as consequências para o hospedeiro. Uma das estratégias do vírus é reprogramar o metabolismo de AG do hospedeiro para fornecer as moléculas de AG e glicerol necessárias para a síntese das membranas de replicação do vírion (HEATON; RANDALL, 2011).

### **Infecção viral e o metabolismo de lipídios**

Essencialmente, todo tipo de célula pode armazenar triglicerídios (TGs) em algum grau na forma de organelas intracelulares denominadas gotículas lipídicas (GLs). Mas a maioria dos TGs é depositada nos adipócitos do tecido adiposo (WALTHER; CHUNG; FARESE JR, 2017). Embora os TGs representem uma forma eficiente e inerte de AGs para armazenamento e transporte, eles são incapazes de atravessar as membranas celulares. Consequentemente, o transporte de TG para

dentro ou para fora das células requer sua quebra hidrolítica, isto é, a hidrólise de TGs em ácidos graxos livres (AGs) e glicerol (GLs).

A hidrólise de TGs é catalisada por enzimas específicas denominadas lipases, estas são atuantes em um processo chamado lipólise (GRABNER; XIE; SCHWEIGER, 2021). A lipólise pode ocorrer de forma extracelular no trato gastrointestinal e no sistema vascular onde degrada os TGs para fornecer AGs e glicerol aos tecidos parenquimatosos subjacentes. Já no ambiente intracelular, a lipólise viabiliza a liberação de AGs a partir de TGs associados a GLs no citoplasma (Lipólise neutra) ou de TGs associados a lipoproteínas em lisossomos (lipólise ácida) (YANG; MOTTILLO, 2020; GRABNER; XIE; SCHWEIGER, 2021).

A regulação da lipólise é um processo complexo que pode acontecer durante a privação alimentar, resultando na liberação de ácidos graxos do tecido adiposo e uma mudança no metabolismo de glicose para AGs nos tecidos consumidores de energia, este processo é chamado de “lipólise induzida”. Em contraste, no estado alimentado, ocorre uma diminuição da taxa de “lipólise basal”, ocorre uma diminuição na utilização de AGs e um aumento na utilização de glicose pelos tecidos com alta demanda energética. A capacidade de alternar entre diferentes substratos energéticos é chamada de “flexibilidade metabólica” e é regulada por diversos fatores, como hormônios, citocinas e neurotransmissores, incluindo fatores ativadores, como catecolaminas, e inibidores, como a insulina (YANG e MOTTILLO, 2020; GRABNER et al., 2021).

Esses fatores desempenham um papel crítico na regulação da transição entre os estados de lipólise basal e induzida, afetando as principais enzimas lipolíticas, como a lipase de triglicerídeo de tecido adiposo (ATGL) e a lipase hormônio-sensível (HSL). Essa regulação ocorre em múltiplos níveis, incluindo a modulação da transcrição genética, alterações pós-traducionais nas proteínas e, para a ATGL, regulação por coativadores e inibidores enzimáticos. A via clássica de ativação envolve catecolaminas, como a epinefrina, que estimulam as enzimas por meio de estímulo hormonal. Outros ativadores incluem glicocorticoides, hormônio tireoideano, eicosanoides, peptídeos natriuréticos atriais, hormônio do crescimento, interleucinas, fator de necrose tumoral  $\alpha$  e leptina. Em contraste, a insulina atua como um inibidor clássico da ATGL e HSL (MORIGNY et al., 2021; GRABNER et al., 2021).

Na ativação da lipólise nos adipócitos, a via principal envolve a ligação de catecolaminas aos receptores  $\beta$ -adrenérgicos acoplados à proteína G. Isso leva à

dissociação da subunidade  $\alpha$  da proteína G, estimulando a adenilato ciclase (AC) e a síntese de AMPc. O AMPc ativa a proteína quinase A (PKA), que fosforila HSL e perilipina-1, alterando a localização e ativando a HSL. A fosforilação da perilipina-1 (proteína presente na gotícula lipídica) também desencadeia a interação do CGI-58 com ATGL, ativando sua atividade enzimática. A lipase monoglicerídica (MGL) atua na hidrólise de monoglicerídeos (MG) para gerar ácidos graxos (AGs) e glicerol. Os AGs liberados neste processo têm uma variedade de destinos, incluindo oxidação para energia na forma de ATP, reesterificação de volta em TAGs e também funcionam como moléculas sinalizadoras (RICHARD et al., 2020; MORIGNY et al., 2021; GRABNER et al., 2021).

Diversos vírus inibem a lipólise nos adipócitos, prejudicando a quebra de lipídios e a liberação de ácidos graxos. Por exemplo, os vírus do gênero *Flavivirus* o qual inclui os vírus da dengue (DENV) que reprogramam o metabolismo lipídico para formar compartimentos de replicação, fornecendo uma estrutura para a síntese de RNA viral (SAMSA et al., 2009; PERRINO; ANDINO, 2019). Já a infecção crônica pelo vírus da hepatite C (HCV) reduz a lipólise no tecido adiposo, possivelmente por meio da ativação de vias inflamatórias e da interferência direta nas vias de sinalização da lipólise (CAMUS et al., 2014).

O SARS-CoV-2 é um vírus de RNA capaz de causar diversos danos metabólicos em diferentes níveis de gravidade, o que pode resultar em modificações de parâmetros clínicos observados na clínica, como por exemplo, o perfil lipídico sérico dos pacientes acometidos pela doença Covid-19 (GIACOBBE et al., 2020; THOMAS et al., 2020; BRUZZONE et al., 2020). Investigar como o vírus causa tais perturbações metabólicas pode fornecer ferramentas para reduzir o impacto da doença nos indivíduos acometidos por ela.

Outros estudos contribuem para a compreensão de como o SARS-CoV-2 utiliza o metabolismo lipídico do hospedeiro em seu próprio benefício, além de influenciar na resposta inflamatória. Dias (2020) evidencia que a infecção pelo SARS-CoV-2 em células Calu-3 induz a ativação de isoformas pertencentes à família de fatores de transcrição SREBP (Sterol Regulatory Element-Binding Proteins), indicando que a infecção promove a reprogramação das células em direção a um fenótipo lipogênico. Isso resulta no aumento das vias de síntese de triglicerídeos e colesterol, que se mostraram cruciais para o ciclo viral do SARS-CoV-2. Considerando o papel essencial das enzimas lipolíticas na homeostase energética sistêmica e específica do tecido e

que p SARS-CoV-2 está atrelado a alterações no metabolismo lipídico celular, neste trabalho exploramos a interação do SARS-CoV-2 com as principais enzimas envolvidas na lipólise intracelular neutra, sendo elas a ATGL e a HSL (ZIMMERMANN et al., 2004; CASARI et al., 2021).

### **Os adipócitos enquanto reservatório viral para o SARS-CoV-2**

A ideia de que o tecido adiposo pode desempenhar um papel como um local de armazenamento e replicação do vírus, além de servir como um local de aumento na produção de citocinas, surgiu como uma potencial explicação para a marcante ligação entre a obesidade e a gravidade da COVID-19.

Ryan, Caplice e Noel (2020) abordam a conexão entre a obesidade e a gravidade da COVID-19, destacando que a obesidade se tornou um novo fator de risco importante. A pesquisa sugere que o tecido adiposo em pessoas obesas pode agir como um local onde o vírus se replica e onde citocinas inflamatórias são produzidas em excesso, contribuindo para resultados mais graves na doença. A hipótese é sustentada pela presença de dados epidemiológicos que mostram que a obesidade está associada a um maior risco de complicações graves da COVID-19 e também devido a presença receptores virais nas células adiposas que sugerem a possibilidade de disseminação viral.

Os autores Zhu, Wilding e Hu (2023) discutem a ideia de que os adipócitos servem como reservatórios para o vírus SARS-CoV-2, destacando a forte evidência da interação viral com o metabolismo lipídico celular. Sua hipótese investiga a relação entre obesidade e a gravidade da COVID-19, analisando como o vírus interage com células de gordura em indivíduos obesos e aumenta a suscetibilidade à infecção. Os resultados apontam que, em pessoas com obesidade, as células adiposas oferecem um ambiente favorável para a entrada, replicação e montagem do vírus, tornando-se um reservatório ideal para o SARS-CoV-2.

A correlação de genes do hospedeiro relacionados com a homeostase de lipídios interligados à replicação viral do SARS-CoV-2 foi demonstrado (DANILOSK et al., 2021). Outros estudos mostraram que adipócitos primários humanos podem ser infectados por SARS-CoV-2 e que o número de cópias de RNA viral aumenta ao longo do tempo de infecção. Foi observada também a presença de RNA viral em

autópsia de tecidos adiposos de pacientes acometidos pelo vírus (REITERER et al., 2021; MARTÍNEZ-COLÓN et al., 2021).

A obesidade, e em particular a gordura visceral, está diretamente relacionada ao aumento do risco de ser hospitalizado e enfrentar complicações graves quando associado à COVID-19. Os pesquisadores descobriram que o tecido adiposo visceral, quando geneticamente previsto como maior, resultou em um risco significativamente maior, com odds ratio variando de 1,13 a 1,58 para esses desfechos. Portanto, essas descobertas sugerem que a gordura visceral é um fator de risco importante para a COVID-19 e pode ser uma ferramenta útil para avaliar o risco em pacientes e na população em geral, além de destacar a importância de medidas para reduzir a gordura visceral, como exercícios e controle de calorias, como uma estratégia para reduzir o risco de infecção e complicações graves da doença (CHEN et al., 2022; FAVRE et al., 2021).

As diferenças sexuais na composição corporal dos indivíduos são estudadas no contexto de associações com doenças cardiometabólicas. Um estudo examinou como a composição corporal difere entre homens e mulheres com sobrepeso/obesidade e como isso afeta os riscos de problemas de saúde. Foi observado que mulheres tinham mais gordura corporal, enquanto homens tinham mais gordura visceral. Apesar de terem níveis de IMC e idade similares, os homens apresentaram um perfil de risco cardiometabólico mais prejudicial. Nesse estudo, concluíram que a avaliação da composição corporal detalhada, além do IMC, é importante para compreender os riscos metabólicos ligados às diferenças na distribuição de gordura entre os sexos (SCHORR et al., 2018). Estas evidências fortalecem a importância de se estudar as diferenças sexuais de composição corporal no contexto da doença COVID-19 (BASTY et al., 2023).

Os últimos estudos produzidos reforçam a ideia de que investigar a infecção por SARS-CoV-2 nos adipócitos pode ter implicações clínicas e terapêuticas significativas.

A presença do vírus nesse tecido pode desencadear disfunções metabólicas e inflamatórias, aumentando o risco de complicações graves em indivíduos infectados.

Diante disso, aventamos a hipótese segundo a qual o SARS-CoV-2 infecta adipócitos humanos e utiliza a maquinaria celular para construir compartimentos de replicação resultando na interferência na homeostase de lipídios. Também

investigamos nesse trabalho como ocorre o padrão de infecção viral nos adipócitos advindos de tecidos adiposos subcutâneo e visceral.

## 2 JUSTIFICATIVA

A infecção viral e seu impacto nos tecidos adiposos têm despertado interesse crescente devido aos papéis essenciais desempenhados pelos lipídios intracelulares durante a infecção viral (NARDACCI et al., 2021). O tecido adiposo, além de sua função metabólica e de armazenamento de energia, desempenha um papel importante na regulação hormonal, na homeostase e na resposta imunológica do organismo. A compreensão da infecção por SARS-CoV-2 no tecido adiposo, especialmente nas células predominantes desse tecido, os adipócitos, tem implicações clínicas e terapêuticas significativas (ZICKLER et al., 2022). Além disso, a identificação de alvos terapêuticos específicos no tecido adiposo pode abrir caminho para intervenções direcionadas e personalizadas, contribuindo para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes contra a COVID-19. Ademais, a pesquisa sobre a infecção por SARS-CoV-2 nos adipócitos não se limita apenas ao contexto clínico, mas também pode fornecer insights valiosos para a saúde pública, auxiliando na criação de estratégias preventivas e de intervenção mais efetivas, contribuindo para o avanço geral no combate à pandemia.

### **3 OBJETIVO GERAL**

Investigar mecanismos de replicação viral e perturbação da homeostase de lipídios provocada por SARS-CoV-2 nos adipócitos humano.

#### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Verificar a infecção de tecido adiposo de pacientes com COVID-19 de amostras *post-mortem*.

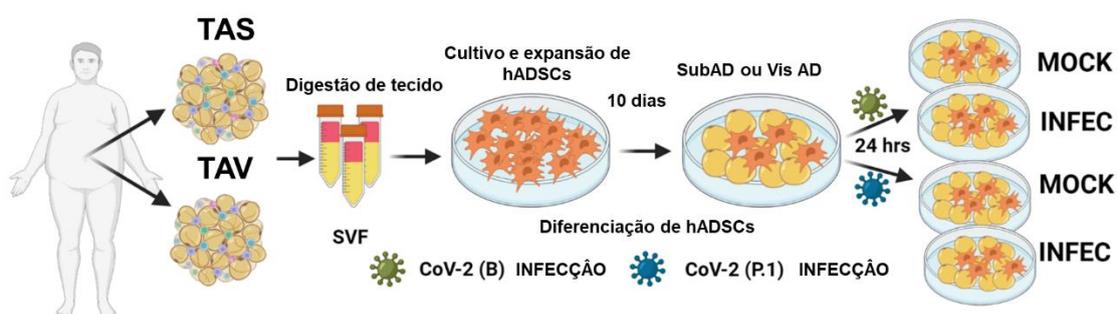
- Padronizar e analisar a infecção de adipócitos de linhagem humanos diferenciados *in vitro*.

- Analisar a presença e replicação de SARS-CoV-2 em adipócitos primários humanos diferenciados *in vitro*.

- Elucidar a relação entre a infecção por SARS-CoV-2 e a desordem de vias intracelulares relacionadas com a homeostase de lipídios.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Desenho experimental



**Figura 1. Desenho experimental.** Células vasculares estromais derivadas do tecido adiposo (hADSCs). Foram obtidas do tecido adiposo subcutâneo abdominal (TAS) e tecido adiposo visceral omental (TAV), foram diferenciadas em adipócitos maduros (Sub AD e Vis AD, respectivamente) e infectadas (INFEC) ou não (MOCK) com o SARS-CoV-2 cepa selvagem [CoV-2 (B)] ou a variante P.1 [CoV-2 (P.1)]. Criado com Biorender.com. Figura publicada pelo próprio autor em SACCON, T. D. et al, 2022.

### Pré-adipócitos humanos imortalizados (A41)

Células de linhagem de pré-adipócitos humanos imortalizados (A41), foram descongeladas em meio DMEM HIGH suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina e cultivadas a 37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. As células foram expandidas (ou seja, divididas 1-3 vezes) e depois semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 40.000 células/cm<sup>2</sup> para diferenciação de adipócitos segundo o protocolo descrito por Shamsi, 2017. Quando as células atingiram 100% de confluência (dia 0), o meio foi substituído por DMEM HIGH com 2% de FBS, 0,1mM de penicilina/estreptomicina, 0,1 µM de dexametasona, 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0,5 µM de insulina, 2 nM de triiodotironina (T3), 30 µM de indometacina, 33 µM de biotina e 17 µM de pantotenato. As células foram cultivadas

por 12 dias e o meio foi trocado a cada 2-3 dias até que as células estivessem totalmente diferenciadas. No dia 12 as células foram então cultivadas por mais 2 dias com DMEM HIGH suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina e submetidas aos procedimentos experimentais seguintes.

### **Isolamento e cultura de células-tronco mesenquimais de tecido adiposo humano**

Isolamos células-tronco mesenquimais (hADSCs) derivadas do tecido adiposo subcutâneo abdominal e tecido adiposo omental visceral de três indivíduos submetidos à cirurgia abdominal (ou seja, cirurgia bariátrica oucolecistectomia) no Hospital das Clínicas da Universidade de Campinas, Campinas, SP, Brasil. Essas células foram isoladas antes da pandemia de COVID-19. Portanto, os doadores não foram infectados com SARS-CoV-2. Os sujeitos receberam informações escritas e orais antes de dar consentimento informado por escrito para coleta da biópsia e uso dos tecidos. Todo o material utilizado no procedimento foi estéril. As biópsias foram coletadas durante a cirurgia e transportadas para o laboratório em tubos falcon selados e estéreis para início do procedimento de isolamento da fração estroma-vascular em 30 minutos. O tecido foi adicionado a uma placa de Petri, dissecado para remover o tecido conjuntivo/fibrótico e depois pesado.

O tecido adiposo foi cortado em pedaços pequenos e então digerido com 25-30 ml detampão de lise [1 mg/ml de colagenase tipo 2 (Worthington) em solução salina balanceada de Hanks (HBSS) contendo 2% de soro de albumina bovina (BSA) - essencialmente livre de ácidos graxos (Sigma-Aldrich, A6003), filtrado através de 0,22 µm] a 37°C por 30-50 min com leve agitação ou até ficar homogêneo. O homogenato foi então filtrado através de um filtro de 250 µm e coletado em um tubo falcon estéril. Após um período de repouso (aproximadamente 5 min), o infra nadante contendo a fração estroma-vascular foi coletado com pipeta Pasteur e centrifugado por 5 minutos a 200 x g e 4°C.

O sobrenadante foi descartado e o sedimento celular foi lavado com HBSS. O procedimento de centrifugação e lavagem foi repetido duas vezes e o pellet foi lavado uma vez com tampão de lise de glóbulos vermelhos. O sedimento foi então re-suspenso em meio BM-1 (ZenBio) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de penicilina/estreptomicina (penicilina 10.000 unidades/ml, estreptomicina 10 mg/ml). As células foram cultivadas a 37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub> até semi-

confluência (80-90%). Eles foram então tripsinizados e congelados em meio de congelamento [10% dimetilsulfóxido (DMSO), 50% FBS e 40% BM-1] e armazenados em um biorepositório de nitrogênio líquido para posterior análise (por exemplo, diferenciação de adipócitos seguida de exposição com agentes, quantificação de lipídios, determinação de viabilidade celular, análise de expressão gênica, proteômica, imunodeteção de proteínas, quantificação de produtos de secreção celular e análise metabólica).

### **Diferenciação de adipócitos primários**

As hADSCs foram descongeladas em meio BM-1 suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 17 ng/ml de FGF-Basic (bFGF) e 15 ng/ml de proteína morfogenética óssea 4 (BMP4) e cultivadas a 37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. As células foram expandidas (ou seja, divididas 1-3 vezes) e depois semeadas em placas de 24 poços a uma densidade de 40.000 células/cm<sup>2</sup> para diferenciação de adipócitos. Quando as células atingiram 100% de confluência (dia 0), o meio foi substituído por BM-1 suplementado com 3% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1 µM de dexametasona, 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 20 nM de insulina, 5 nM de triiodotironina (T3) e 10 ng/ml de BMP4. As células foram cultivadas por 7 dias e o meio foi trocado a cada 2-3 dias. No dia 7, o meio foi substituído por BM-1 suplementado com 3% de FBS, 1% de penicilina/estreptomicina, 0,1 µM de dexametasona, 20 nM de insulina, 5 nM de T3 e 10 ng/ml de BMP4 até que as células estivessem totalmente diferenciadas no dia 10. As células foram então cultivadas por mais 3 dias com BM-1 suplementado com 3% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina e submetidas aos procedimentos experimentais seguintes.

### **Vírus e Linhagens Celulares**

A linhagem viral original SARS-CoV-2 [CoV-2(B 1)] foi isolada do segundo caso confirmado de COVID-19 no Brasil (SARS.CoV2/SP02.2020, número de acesso GenBank MT126808) (CODO et al., 2020). Os estoques virais foram propagados em células Vero CCL-81 (ATCC) cultivadas em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina a 37°C com 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>. O título viral foi determinado pelo ensaio de placa.

## **Infecção**

As células foram incubadas com a linhagem CoV-2(Original-B1) (MOI = 1) por 1 h em temperatura ambiente sob agitação suave (20 RPM) em um agitador orbital. Após a adsorção viral, o meio foi retirado e as células foram incubadas com um novo meio de cultura em condições de cultura padrão (37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>) pelo período 24 horas e 48 horas. Os experimentos foram realizados em um laboratório de nível 3 de biossegurança (BSL3).

## **Ensaio de formação de placa (PFU)**

O ensaio de placa padrão foi realizado usando células Vero. As células foram semeadas em placas de 24 poços (4 × 10<sup>4</sup> células por poço) e incubadas com sobrenadantes de células A41 e hADSCs, diluídos em série de até 65 vezes o seu volume, foram incubados por 1 h à temperatura ambiente sob condições de cultura padrão. O meio de cultura foi então substituído por 1 ml de um meio de sobreposição contendo DMEM, 2,5 % de carboximetilcelulose (CMC) para A41, 5% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina. Quatro dias depois, as células foram fixadas com formaldeído a 8% em PBS por 24 h à temperatura ambiente e coradas com solução de azul de metileno a 1% p/v. As células foram então lavadas com água para revelar as placas. Os resultados são expressos de forma qualitativa para visualização de unidades formadoras de placa. foi retirado e as células foram incubadas com um novo meio de cultura em condições de cultura padrão (37°C e 5% de atmosfera de CO<sub>2</sub>) pelo período 24 horas e 48 horas.

## **Extração de RNA**

Células: O RNA foi extraído de A41 e hADSCs diferenciadas e células Vero placaadas em placas de 24 poços. Os poços foram lavados com PBS e as células foram imediatamente colhidas com 300 µl de Trizol ou incubadas por 3 min com 100 µl de solução de tripsina-EDTA (0,25%, Thermo Fisher Scientific) a 37 °C. A tripsina foi neutralizada com 500 µl de meio BM-1 suplementado com 10% de FBS e as células foram centrifugadas a 250 x g por 5 min. O sobrenadante foi removido, o sedimento foi ressuspensão em 500 µl de PBS e centrifugado novamente a 250 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e 300 µL de trizol foram adicionados

ao sedimento. O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific).

Meio para ensaio de lipólise: 24 h após a infecção, as células diferenciadas foram privadas de soro por 2 h e incubadas por 30 min com tampão Krebs-Ringer-HEPES (tampão KRH: NaCl 120 mM; KCl 4,7 mM; CaCl<sub>2</sub> 2,2 mM; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mM; MgSO<sub>4</sub> 1,2 mM; 5,4 mM de glicose; 10 mM de HEPES pH 7,4) suplementado com 4% de BSA sem ácido graxo (A7030, Sigma-Aldrich) contendo 10 µM de isoproterenol ou veículo. O sobrenadante foi recolhido e diluído em Trizol (1:10). O RNA total foi extraído de acordo com as instruções do fabricante.

Biópsias humanas: Amostras de biópsia de tecido adiposo subcutâneo *post-mortem* da região torácica de indivíduos infectados, que morreram de Covid-19 grave, e não infectados, que morreram de outras causas. A coleta de material foi consubstanciada sob o número do parecer: 4.795.333, proveniente do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP.

### **Análise de Carga Viral e Expressão Gênica**

O RNA do SARS-CoV-2 foi quantificado usando RT-qPCR com conjuntos de primer-probe para genes N1 ou E, de acordo com os protocolos dos Centros de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA (Corman et al., 2020). Os ensaios de qPCR em tempo real foram conduzidos em um termociclador Step-OnePlus (Applied Biosystems). Um µg de RNA foi usado para amplificação do genoma com primers/sondas específicos de 20 µM e 5 µM qPCRBIO Probe 1-Step Go (PCR Biosystems) com os seguintes parâmetros: 3 min a 95°C, 45 ciclos a 95°C por 15s e 60°C por 30s.

As cargas de genoma de SARS-CoV-2 foram determinadas usando uma curva padrão preparada com um plasmídeo contendo um amplicon de 944bp do gene N, inserido em um vetor de clonagem TA (PTZ57R/T) usando o CloneJet Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific). No caso de hADSCs, quantificamos o gene SARS-CoV-2 E. 500 ng de RNA foram convertidos em cDNA por reação de transcrição reversa usando hexâmeros aleatórios de acordo com as instruções do fabricante (Kit de transcrição reversa de cDNA de high capacity, Applied Biosystems). A amplificação foi feita em uma reação contendo: 10 ng de cDNA, 10 µM de primers, 5 µM de sonda e qPCRBIO Probe Mix (PCR Biosystems). A condição

de ciclagem foi: 95°C por 2 min (1 ciclo), 95°C por 5s e 63°C por 30s (40 ciclos) no QuantStudio 3 (Applied Biosystem).

## **Imunofluorescência**

Células: As células foram fixadas com paraformaldeído a 4% e bloqueadas com BSA a 1% (Sigma-Aldrich) em PBS à temperatura ambiente por 3 vezes. As amostras foram incubadas durante a noite a 4 °C com os anticorpos primários: anticorpo monoclonal de coelho anti-SARS-CoV-2 (Invitrogen, clone T01KHuRb, 1:500) ou anticorpo monoclonal de camundongo- RNA dupla fita J2 (dsRNA, SCICON, clone J2-1909 ; 1:1.000). As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS-T (PBS com 22,52 mg/mL de Glicina; 0,01% Tween 20; 1% BSA) e incubadas à temperatura ambiente por 1 h com os anticorpos secundários: alpaca anti-mouse IgG AlexaFluor 488 (Jackson ImmunoResearch; 1:1000) ou IgG anti-coelho de alpaca AlexaFluor 594 (Jackson ImmunoResearch; 1:1000). As lâminas foram lavadas novamente 3 vezes com PBS-T e montadas com Meio de Montagem Antifade VECTASHIELD com DAPI (Vector). As imagens foram adquiridas pelo Axio Observer combinado com o microscópio LSM780 (Carl Zeiss) com ampliação de 63x e analisadas usando Fiji pela Image J.

## **Western blotting**

Células: As hADSCs foram lavadas com PBS e lisadas em tampão RIPA (Cell Signaling Technology) contendo um coquetel de inibidores de protease e fosfatase (Thermo Fisher Scientific). Os lisados celulares foram sonicados e centrifugados a 14.000 x g por 20 min a 4°C. A concentração de proteína foi determinada nos sobrenadantes usando o kit Pierce BCA (Thermo Fisher Scientific). Os lisados foram então desnaturados em tampão Laemmli (0,5 M Tris, 30% glicerol, 10% SDS, 0,6 M DTT, 0,012% azul de bromofenol) e aquecidos a 95°C durante 5 min. As proteínas (20 µg) foram carregadas no gel e resolvidas por eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida a 8% (SDS-PAGE). As proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose (Bio-Rad) e as membranas foram bloqueadas por 1 h à temperatura ambiente em solução salina tamponada com Tris (137 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,6) contendo 0,1% de Tween-20 (TBS-T) e 5% de leite com baixo teor de gordura, seguido de incubação com o anticorpo primário durante a noite a 4°C. Os

anticorpos primários utilizados foram produzidos em coelhos: HSL (Tecnologia de Sinalização Celular, 1:1000), P-HSL (S565) (Tecnologia de Sinalização Celular, 1:1000), ATGL (Tecnologia de Sinalização Celular, 1:1000) e  $\alpha$ -tubulina (Tecnologia de Sinalização Celular, 1:5000). Os anticorpos ligados a proteínas foram detectados com um anticorpo anti-coelho secundário ligado a HRP (Cell Signaling Technology, 1:2000) e visualizados por quimioluminescência usando Clarity Western ECL Substrate (Bio- Rad). Para quantificar a densidade da banda, as regiões de interesse de tamanho idêntico foram desenhadas em cada pista e a densidade de pixels foi medida usando o software ImageJ.

### **Ensaio de lipólise e quantificação de glicerol**

Após 24h pós-infecção, hADSCs diferenciados foram privados de soro por 2 h. As células foram então incubadas por 30 min com um tampão KRH suplementado com 4% de BSA, livre de ácidos graxos (Sigma Aldrich, A7030). O meio foi coletado, armazenado em gelo por 10 min e colocado em banho seco a 60°C por 20 min. O glicerol foi quantificado no meio usando o Kit de Ensaio de Lipólise 3T3-L1 de acordo com as instruções do fabricante (Zenbio). Os resultados foram normalizados pela quantidade de proteína disponível em cada poço conforme quantificado pelo kit BCA (Thermo Fisher Scientific).

### **Preparação de amostras, cromatografia líquida-espectrometria de massa e processamento de dados para proteômica**

O proteoma de células diferenciadas derivadas do tecido adiposo foi analisado por cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) 24 hpi com SARS-CoV-2. Duplicatas ou triplicatas biológicas para cada condição foi processada e analisada em triplicata. As células foram lisadas quimicamente com tampão de lise (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, NaCl 150 mM, Triton-X-100 a 1%, protease e fosfatase inibidores) e ultrassonicação (três ciclos de 20s cada com 90% de frequência). O extrato proteico foi quantificado pelo kit Pierce BCA de acordo com as instruções do fabricante (Thermo Fisher Scientific). 20  $\mu$ g do extrato protéico foram transferidos para uma centrífuga Microcon-10 Filtro, com corte de 10 kDa, para digestão de proteínas FASP (DISTLER et al., 2016). Os preparados de proteínas foram reduzidos (10mMDTT), alquilados (50mMIAA) e digeridos durante a noite por

tripsina a 37 ° C em bicarbonato de amônio 50 mM (ÂmBico), pH 8,0. No dia seguinte, os peptídeos foram recuperados do filtro em AmBic 50 mM, e a atividade da tripsina foi extinta por adição de ácido fórmico (FA) até uma concentração final de 1% (v/v). Depois disso os peptídeos foram concentrados em SpeedVac e armazenados a -80 °C até usar. Os péptidos digeridos foram ressuspensos em 0,1% de FA. Análise LC-MS/MS foi realizado em um sistema ACQUITY M-Class (Waters Corporation) acoplado on-line a um espectrômetro Synapt G2-Simass (Waters Corporation). Um micrograma de peptídeos foi carregado em um recipiente de captura coluna (Symmetry C18 5 µm, 180 µm× 20mm, Waters Corporation) e posteriormente separados na coluna analítica (HSS T3 C18 1,8 µm, 75 µm × 150 mm; Waters Corporation).

Para eluição gradiente, 0,1% de FA foi usado como eluente A e acetonitrila-FA (99,9% de ACN:0,1% de FA) como eluente B. O gradiente de fase reversa foi realizado ao longo de 120 min, com um gradiente linear de 3-60% de acetonitrila ao longo de 60 minutos a 300 nL/min. No Synapt G2-Si, os espectros peptídicos foram adquiridos por mobilidade iônica aprimorada aquisição independente de dados (HDMS<sub>e</sub>). Espectrometria de massa a análise foi realizada em “Modo Resolução”, alternando entre baixa Energias de colisão (4 eV) e altas (25–60 eV), usando um tempo de varredura de 1,0 s por função acima de 50–2.000 m/z. A velocidade da onda para mobilidade iônica a separação foi de 1000 m/s e a velocidade da onda de transferência foi de 175 m/s. O padrão [Glu1] -Fibrinopeptídeo B (Waters Corporation) foi usado como composto de massa de bloqueio de referência. Os dados brutos de cada experimento foram processado em Progenesis Q1 para proteômica (Waters Corporation).

Espectros de massa em tandem foram pesquisados contra o Uniprot *Homo sapiens* foi revisado o banco de dados do proteoma (20.376 entradas, liberado 2022-03), usando parâmetros de tolerância de 20 ppm para íons precursores e 10 ppm para íons de produto. Para identificação de peptídeos, carbamidometilação de cisteínas foi definida como uma modificação fixa, a oxidação de metioninas como uma modificação variável, duas clivagens perdidas foram permitidas, e uma taxa de descoberta falsa (FDR) foi limitada a 1%. A identificação de proteína foi realizada usando no mínimo um fragmento de íon combinados por peptídeo, um mínimo de três íons de fragmento por proteína, e um mínimo de dois peptídeos por proteína.

A análise quantitativa label-free foi realizada usando a intensidade de abundância relativa normalizada por todos os peptídeos identificados. A análise de expressão foi realizada considerando as réplicas técnicas para cada condição experimental, seguindo a hipótese de que cada grupo é independente. Para análise de proteínas com ANOVA (p) foram corrigidas para múltiplos testes e otimizado por abordagem FDR (q)  $\leq 0,05$  entre os grupos para considerar diferencialmente expresso.

### **Ontologias de proteínas e análise de redes**

Proteínas expressas diferencialmente ( $p < 0,05$ ) foram submetidas a sistemas análise de biologia em software R (v. 4.0.3) e Cytoscape (SHANNON et al., 2003). As análises foram enriquecidos usando o pacote ClusterProfiler R (YU et al., 2012) e a Enciclopédia de Kyoto de Genes e Genomas (KEGG) (KANEHISA ;GOTO, 2000). Para a análise da rede, usou Reactome (WU; FENG; STEIN, 2010.) para detecção de módulo e análise de via de enriquecimento. Para análise de sobreposição e clusters de ontologias enriquecidos, usamos Metascape (ZHOU et al., 2019).

### **Análise estatística**

Os resultados são apresentados como média  $\pm$  SEM. Análises estatísticas foram realizadas usando Graph Prism 8.0 ou as plataformas usadas para proteômica processamento de dados conforme descrito acima. Para a análise de tecido pós-morte, cada ponto de dados representa uma amostra de um indivíduo. Usamos um teste t de Student bicaudal para comparações de dois grupos ou unidirecional ANOVA para três comparações de grupo. Usamos a correlação de Pearson análise para testar a correlação entre duas variáveis.

As comparações foram feitas considerando o efeito da infecção em cada doador (considerando a variabilidade entre diferentes pools de células do mesmo doador) e entre doadores diferentes (considerando variabilidade interindividual). Dependendo do número de variáveis, aplicamos ANOVA de uma, duas ou três vias em combinação com múltiplos testes de comparação (Tukey ou Sidak) conforme indicado nas legendas das figuras para determinar o efeito da infecção, tempo, origem da célula e/ou linhagem viral e a interação entre essas variáveis. Nós usamos o Teste de Shapiro-Wilk para examinar se as variáveis foram distribuídas normalmente. Foi

utilizado um intervalo de confiança de 95% e a hipótese alternativa foi aceita quando  $P < 0,05$ . Nós descrevemos como diferenças estatisticamente significantes os gráficos usando letras, asteriscos e valores de P são exibidos na legenda da figura e no arquivo de dados de origem.

## 5 RESULTADOS

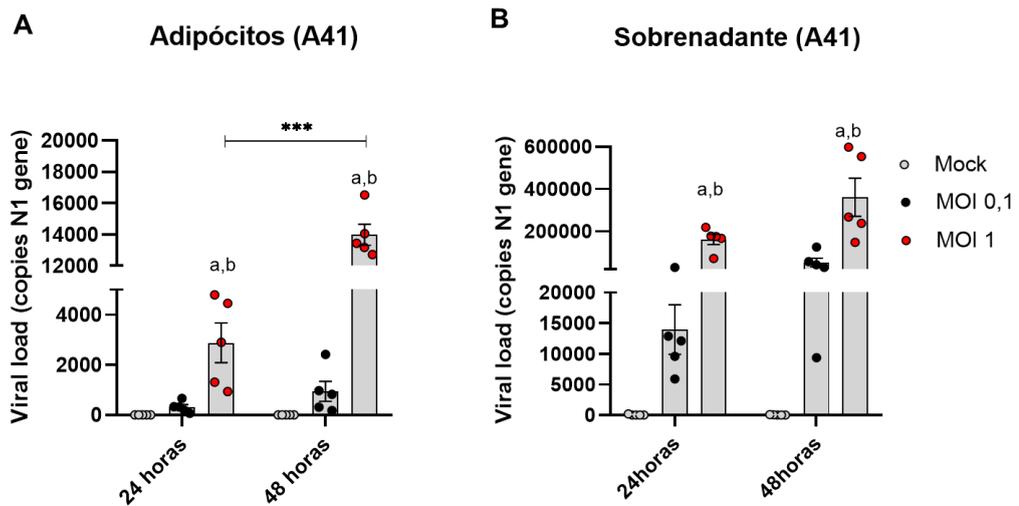
### 5.1 O SARS-CoV-2 infecta o tecido adiposo?

#### 5.1.1 Infecção em tecido adiposo de humanos

A hipótese de que o tecido adiposo pode servir como reservatório para armazenamento e replicação do vírus, bem como local de amplificação de citocinas, surgiu como uma possível explicação para a forte associação entre obesidade e gravidade do COVID-19 (RYAN; CAPLICE, 2020).

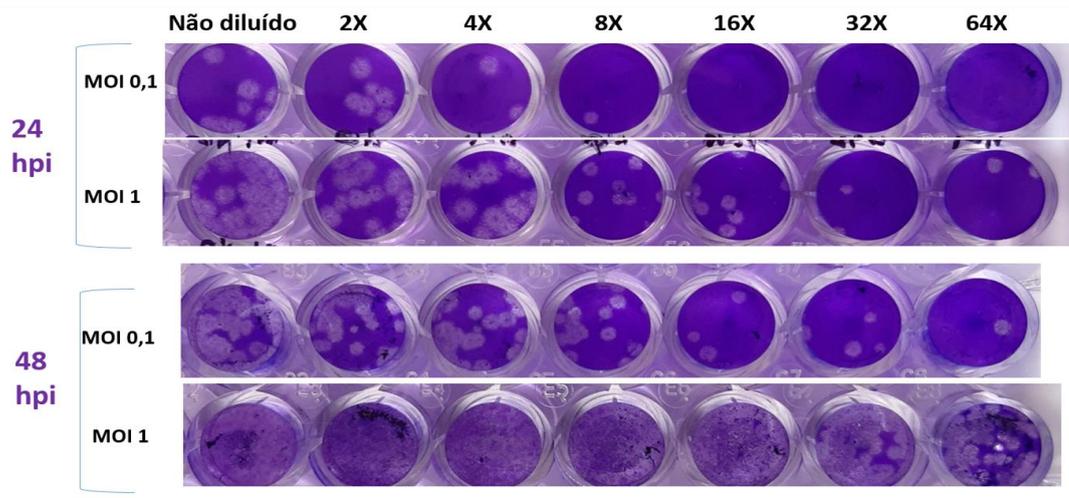
Para confirmar se durante a infecção o vírus está presente no tecido adiposo, avaliamos amostras de autópsias de tecido adiposo subcutâneo *post-mortem* obtidas da região torácica de indivíduos que morreram em decorrência da COVID-19. Entre 9 amostras de tecido adiposo, o RNA viral foi detectado em 8 (Figura 2). Os resultados obtidos reforçam a evidência de que o tecido adiposo é um local propício para a infecção extrapulmonar pelo SARS-CoV-2.





**Figura 3. Infecção em adipócitos branco/bege imortalizados.** (A) Células indiferenciadas (A41) foram diferenciadas em adipócitos, expostas ao SARS-CoV-2 (MOI = 1 e MOI=0,1 durante 1h) (INFEC) ou vírus inativado (MOCK) e colhidas 24 e 48 horas pós infecção (hpi). (B) Sobrenadante de A41 após infecção. Imagem representativa do ensaio de unidades formadoras de placa. Foram utilizados sobrenadantes de A41 infectadas com SARS-CoV-2 não diluído e em diferentes diluições.,  $P < 0.05$  vs. respectivo ao MOCK; b:  $P < 0.05$  vs. MOI 0,1. \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Em concordância com o aumento na quantidade de cópias de RNA viral, é possível constatar também a persistência do vírus no sobrenadante das células após a ocorrência da infecção. A fim de avaliar esta hipótese, procedemos à realização do ensaio de formação de placas, empregando o sobrenadante resultante da infecção (24 e 48 horas após a infecção) e constatamos um aumento na área de lise na monocamada celular após 48 horas de infecção. Esse resultado sugere a presença contínua de vírus ainda capaz de causar infecção, conforme ilustrado na Figura 4.

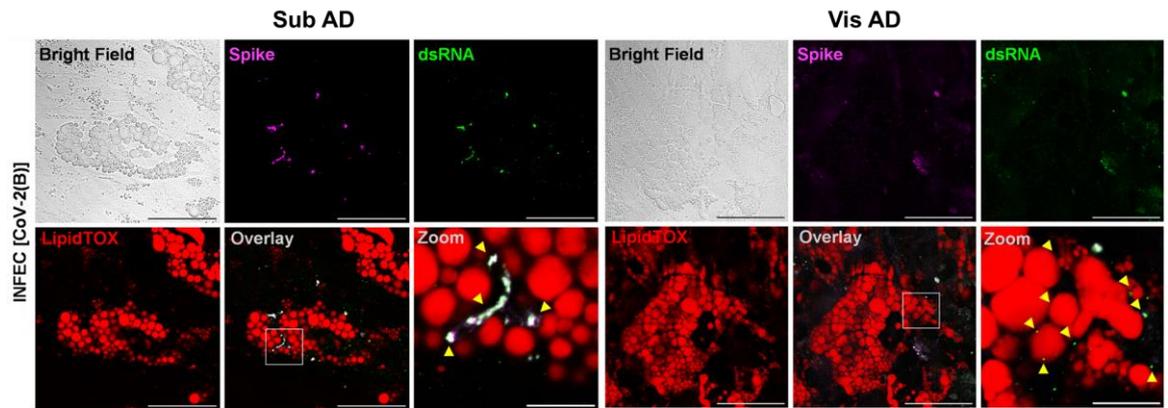


**Figura 4. Vírus decorrente da infecção em adipócito mantém capacidade infectiva.** Imagem representativa do ensaio de unidades formadoras de placa (PFU). Foi utilizado sobrenadantes, não diluído e em diferentes diluições, de A41 infectadas com SARS-CoV-2.

#### 5.2.2 Adipócitos primários de origem visceral (Vis AD) e subcutânea (Sub AD).

O microambiente do tecido adiposo é dinâmico e envolve a interação do vírus com vários outros tipos celulares. Então, para fazer um estudo controlado visando investigar a interação do vírus especificamente com o adipócito, utilizamos células-tronco mesenquimais (hADSCs) que foram isoladas de duas diferentes regiões anatômicas de tecido adiposo, subcutâneo e visceral, de indivíduos submetidos a cirurgia abdominal (colecistectomia ou cirurgia bariátrica). Estas células foram diferenciadas em adipócitos maduros, sendo então denominadas Vis AD e Sub AD, e logo após seu amadurecimento foram infectadas com o vírus.

Na figura 5 podemos observar a presença de gotículas lipídicas como sinal de maturação dos adipócitos após a diferenciação. Realizamos marcações para RNA de dupla fita (dsRNA), o que indica que há replicação viral celular, além de marcações para a proteína viral Spike.



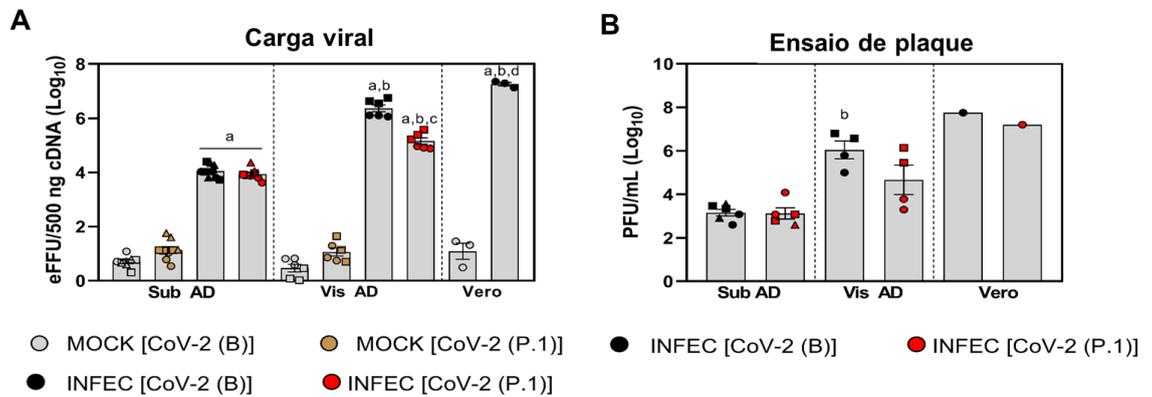
**Figura 5. Imunofluorescência de adipócitos humanos (hADSCs) infectados.** Imunomarcagem para proteína viral spike em lilás, dupla fita de RNA em verde e lipídios neutros corados em vermelho por LipidTOX. Figuras de publicada pelo próprio autor em SACCON, T. D. et al, 2022.

### 5.3 Quais as particularidades da infecção quando na presença de uma variante do SARS-CoV-2 e quando decorrentes de diferentes origens anatômicas dos adipócitos?

#### 5.3.1 Linhagem viral original do SARS-CoV-2 [B1] e variante [P1]

Ao longo da pandemia de COVID-19 a linhagem viral selvagem do SARS-CoV-2 [CoV-2(B 1)], obteve algumas mutações que resultaram na aparição de novas variantes do vírus, dentre elas, a variante gama P1 [CoV-2(P.1)]. Esta variante apareceu pela primeira vez em Manaus, no Brasil, e foi responsável pela maioria dos casos de infecções e óbitos pelo COVID-19 no país durante 2021 (FARIA et al., 2021). A variante [CoV-2 (P.1)] é caracterizada como parte das variantes de preocupação (VOCs) pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (FARIA et al., 2021; HARVEY et al., 2021) . Esta variante também foi alvo deste estudo e se mostrou menos infectiva apenas nas células de origem visceral quando comparada a [CoV-2 (B.1)] como mostra a figura 6A-B. Este dado mostra que a origem anatômica dos adipócitos influencia na susceptibilidade à infecção, e isso mais uma vez é evidenciado uma vez que a carga viral de 24 hpi foi 240 vezes maior em adipócitos Vis AD do que em Sub AD (Figura 6A). Realizamos ensaios de formação de placas usando o meio

condicionado das células 24 hpi e descobrimos que os adipócitos Vis AD produziram ~770 vezes mais partículas infecciosas do que os adipócitos Sub AD (Figura 6B).



**Figura 6. Quantificação de RNA e PFU viral em adipócitos humanos (hADSCs).** (A) Carga viral determinada por RT-qPCR-eFFU, equivalente a unidades formadoras de foco. ANOVA de três vias foi realizada para determinar os efeitos da infecção ( $P < 0,0001$ ), linhagem viral ( $P > 0,05$ ), origem anatômica ( $P < 0,0001$ ) e interações entre origem anatômica x infecção ( $P < 0,0001$ ), origem anatômica x linhagem viral ( $P < 0,01$ ), infecção x linhagem viral ( $P < 0,0001$ ), e infecção, origem anatômica e linhagem viral ( $P < 0,0001$ ). Diferenças significativas são retratadas em letras: a,  $P < 0,0001$  vs. respectivo MOCK; b,  $P < 0,0001$  vs. respectivo Sub AD; c,  $P < 0,0001$  vs. respectivo CoV-2(B); d,  $P < 0,0001$  vs. respectivos Vis AD.

(B) Unidades formadoras de placas (PFU) no sobrenadante. ANOVA de duas vias foi realizada para determinar os efeitos de origem anatômica ( $P < 0,0001$ ), linhagem viral ( $P > 0,05$ ) e a interação entre origem anatômica e linhagem viral ( $P > 0,05$ ). Diferenças significativas entre os grupos foram determinadas pelo teste de comparação múltipla de Tukey e representadas como: b,  $P < 0,01$  vs. Sub AD. A quantificação absoluta do genoma viral foi determinada por uma curva padrão feita pela titulação do genoma do SARS-CoV-2 quantificado como equivalente a unidades formadoras de foco (eFFU) e normalizado pelo RNA total. Figuras de A e B publicadas pelo próprio autor em SACCON, T. D. et al, 2022.

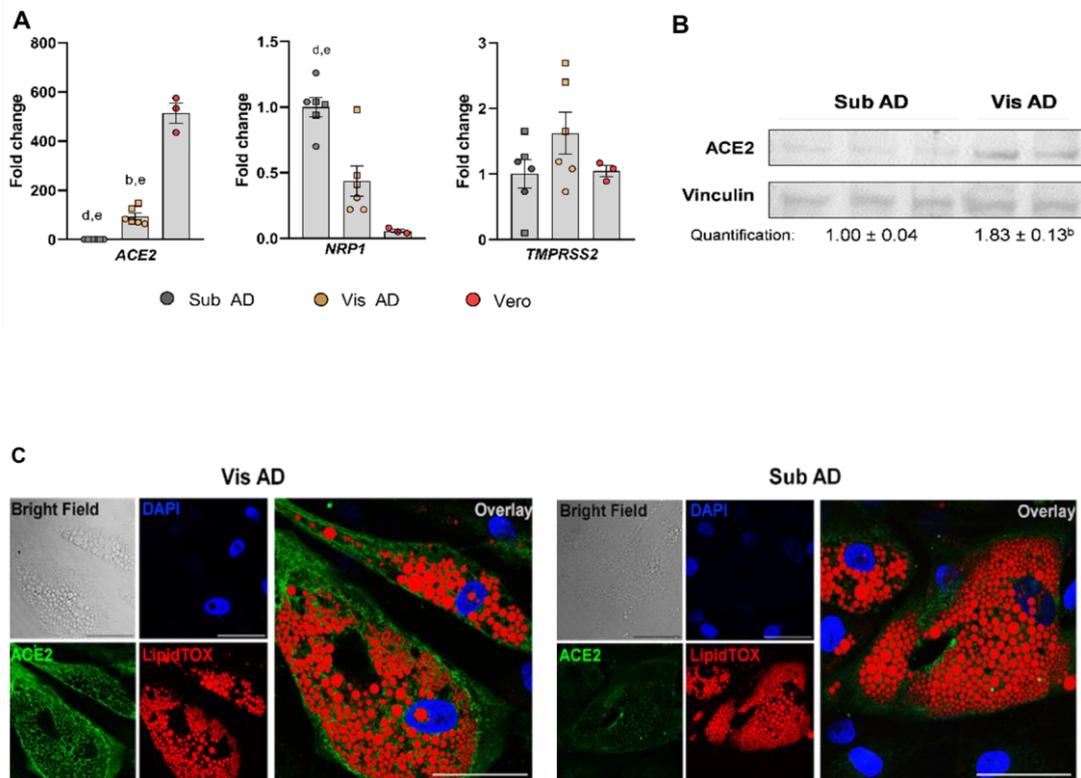
### 5.3.2 Proteínas mediadoras da entrada viral

Para entender o que determina a permissividade dos adipócitos à infecção por SARS-CoV-2, investigamos proteínas do hospedeiro conhecidas por mediar a entrada do vírus. Para isso, avaliamos a expressão de genes que codificam receptores de proteína viral do SARS-CoV-2.

De acordo com esses resultados, observou-se maior expressão de *NRP1* (gene que codifica para proteína neuropilina-1), em adipócitos subcutâneos quando comparados aos adipócitos viscerais (Figura 7A). Apesar de apresentar maior carga viral neste último. Então, para investigar a importância da proteína neuropilina-1 na

infecção, realizamos ensaios de neutralização da proteína antes de infectar as células e, a neutralização não resultou na redução/ impedimento da infecção. Isto demonstra que a maior expressão de NRP1 não explica a diferença de sensibilidade a infecção em células de diferentes origens.

Não houve diferenças nos níveis de *TMPRSS2* entre os tipos de adipócitos (Figura 7A). Em contraste, os adipócitos Vis AD expressam 72 vezes mais *ACE2* do que Sub-AD (Figura 7A), indicando que a diferença no potencial de adipócitos a serem infectados por SARS-CoV-2 é determinada, pelo menos em parte, pela expressão de *ACE2*. Corroborando com estes resultados, observamos a diferença de expressão da proteína ACE-2 ao quantificar por Western Blot (Figura 6B) e por imunofluorescência (Figura 7C). Em conjunto, os resultados apresentados demonstram que a maior expressão da proteína ACE-2 em adipócitos de origem visceral explica a alta sensibilidade à infecção quando comparados aos adipócitos de origem subcutânea.



**Figura 7. Proteínas de entrada viral em Vis AD e Sub AD.** (A) A expressão relativa dos genes relacionados à entrada SARS-CoV-2 determinada por RT-qPCR. ANOVA unidirecional foi aplicada a fim de detectar o efeito de origem anatômica na expressão *ACE2* ( $P < 0.0001$ ), *NRP1* ( $P < 0.0001$ ) e *TMPRSS2* ( $P > 0,05$ ). O teste de comparação múltipla de Tukey foi aplicado para detectar diferenças entre os grupos. Diferenças significativas são retratadas nas letras: b,  $P < 0.01$  vs. Sub AD; d,  $P < 0.01$  vs. Vis AD; e,  $P < 0.0001$  vs. Vero. Os dados representam a média  $\pm$  SEM dos experimentos realizados utilizando 2-3 grupos independentes de células de 2-3 doadores. Diferentes doadores são distinguidos

por círculos, quadrados e triângulos. (B) Western Blotting comparando os níveis basais de ACE2 em células Sub AD não infectado (n = 3 doadores) e Vis AD (n = 2 doadores). Teste t de Student bicaudal: b,  $P < 0,01$ . MW, peso molecular. (C) Imunofluorescência representativa de células Vis AD e Sub AD infectadas com CoV-2(B) (MOI = 0,1 por 1 h e colhidas 3 dias após infecção) evidenciando a expressão de ACE2. DAPI, azul. ACE2, verde. LipidTOX, vermelho. Barra de escala = 50  $\mu$ m. Representativo de oito a dez imagens adquiridas de duas a cinco pools independentes de células de dois a três doadores. Figuras de A-C publicadas pelo próprio autor em SACCON, T. D. et al, 2022.

#### **5.4 Impacto da infecção por SARS-CoV-2 sobre o metabolismo de lipídios em adipócitos**

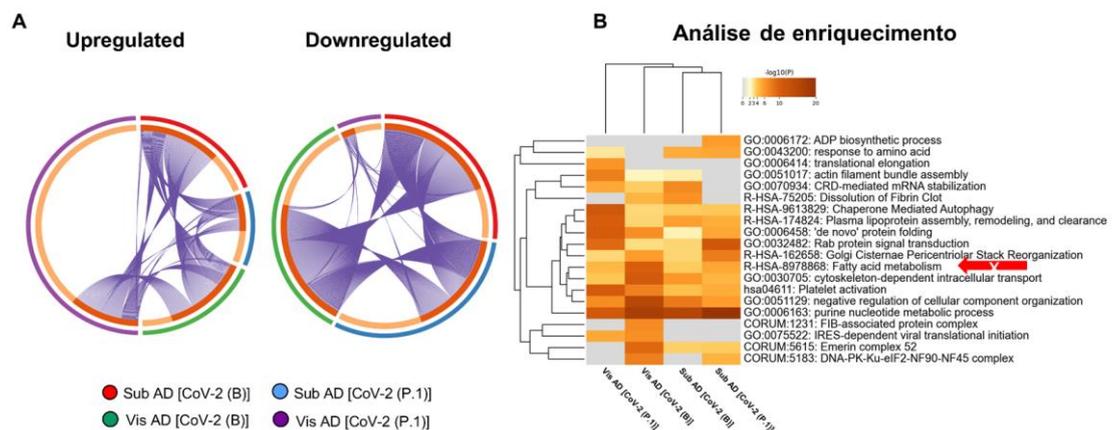
Após a confirmação da capacidade infectiva do SARS-CoV-2 em linhagem de adipócitos, adipócitos primários e tecido adiposo, o próximo passo consistiu em analisar as proteínas envolvidas na entrada do vírus, bem como as particularidades das células com origem anatômica distintas. Além disso, foi iniciada uma investigação das potenciais desordens metabólicas intracelulares desencadeadas pelo vírus nos adipócitos.

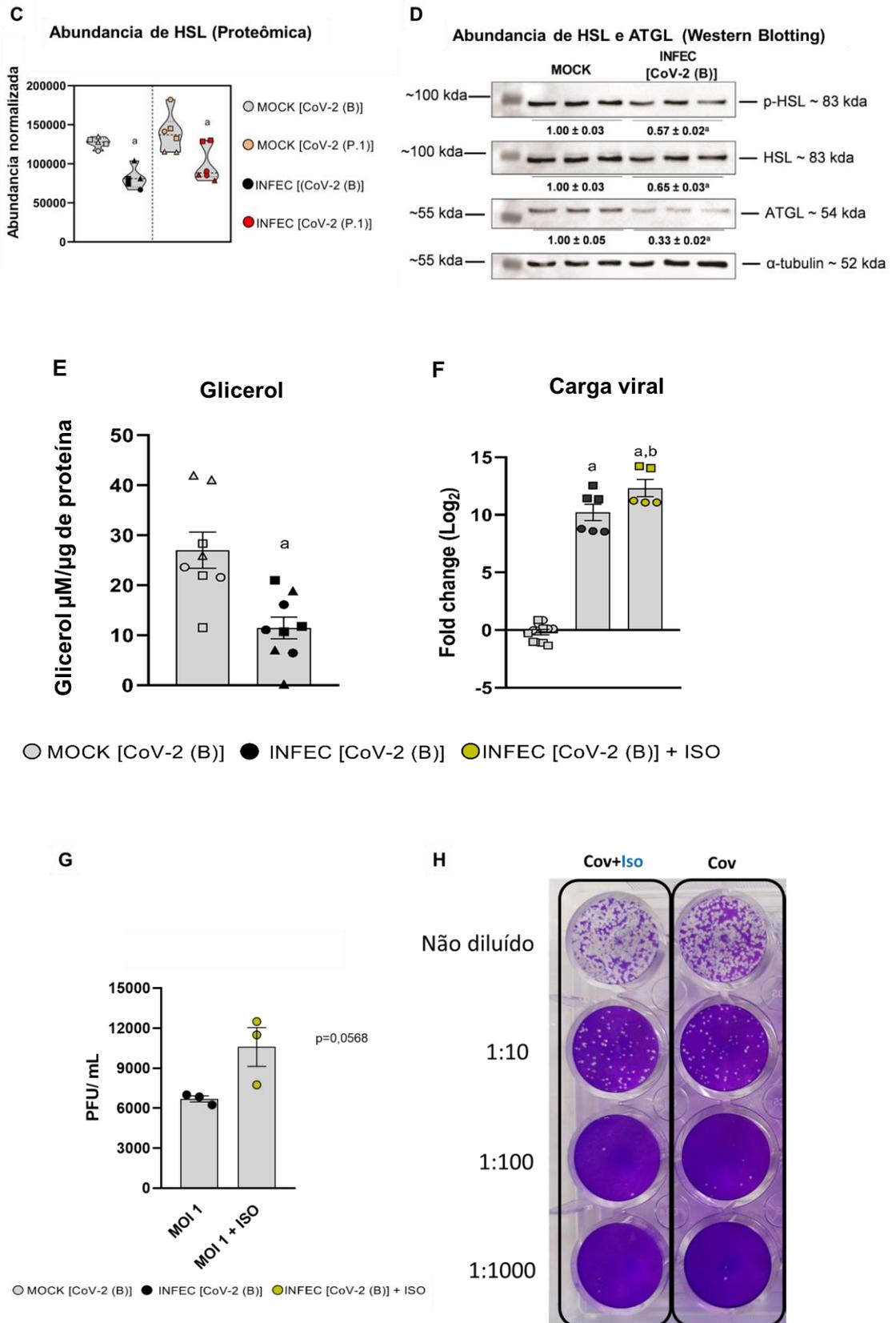
Realizamos análises de proteômica e Western blotting para avaliar as alterações moleculares provocadas pelo vírus nos adipócitos subcutâneos e viscerais. A infecção de adipócitos Vis AD e Sub AD com a linhagem CoV-2(B) resultou em alterações pronunciadas no proteoma. O grau de sobreposição entre as respostas de adipócitos Vis AD e Sub AD foi diferente entre eles quando expostos a mesma condição de infecção (Figura 8A), sugerindo que o SARS-CoV-2 aciona diferentes caminhos em adipócitos de diferentes depósitos de gordura. A análise de enriquecimento funcional para mapeamento de ontologia gênica revelou que a infecção de adipócitos Sub AD por CoV-2(B) ou CoV-2(P.1) resultou em respostas semelhantes às de Vis AD infectadas com CoV-2(B) ou CoV-2(P.1) (Figura 8B).

Os adipócitos sub-AD infectados apresentaram alterações nas proteínas envolvidas em múltiplas vias biológicas que, entre outros processos, foram fortemente enriquecidas para termos de “metabolismo energético” (Figuras 8B). Entre as proteínas expressas diferencialmente incluídas neste termo, a redução da expressão da lipase sensível ao hormônio (HSL ou *LIPE*) em adipócitos sub-AD infectados (Figura 8C) chamou nossa atenção devido ao papel fundamental que essa enzima desempenha na lipólise (BOLSONI-LOPES E ALONSO-VALE, 2015).

A redução da expressão de HSL total, bem como de sua forma fosforilada e ativa, foi confirmada pela quantificação em adipócitos sub-AD infectados (Figura 7D). Outra enzima crítica na lipólise, a Lipase de Triacilglicerol de Adipócitos (ATGL), também foi regulada pelo SARS-CoV-2 (Figura 7D). Consistente com a inibição da lipólise, a produção de glicerol foi diminuída em adipócitos sub-AD infectados com SARS-CoV-2 (Figura 8E). Estudo anterior demonstrou que o SARS-CoV-2 induz a formação de gotículas lipídicas em monócitos, o que, por sua vez, contribui para a replicação viral (DIAS et al., 2020). Além disso, a inibição da lipólise reduz o título viral no sobrenadante de adipócitos humanos infectados (ZICKLER et al., 2022).

Esses resultados sugerem que a inibição da lipólise em adipócitos subcutâneos infectados é uma resposta adaptativa aguda ao SARS-CoV-2. Para saber se essa resposta à infecção estava correlacionada com o mecanismo de evasão do vírus de dentro da célula para o meio externo, estimulamos agudamente a lipólise de adipócito sub-AD utilizando um agonista beta-adrenérgico (isoproterenol) durante 30 minutos e avaliamos a carga viral no sobrenadante. Notavelmente, descobrimos que o isoproterenol aumentou o número de cópias do RNA viral de SARS-CoV-2 no meio de adipócitos infectados em 4 vezes (Figura 8F). Além disso, os vírus mantiveram seu potencial infeccioso mesmo após o estímulo com isoproterenol (Figura 8G).





**Figura 8. A infecção pelo SARS-CoV-2 resulta em diferentes respostas relacionadas ao metabolismo de lipídios intracelular.** (A) Enredo de circos mostrando sobreposição entre proteínas expressas diferencialmente determinadas pela proteômica quantitativa. Por fora, os arcos representam as diferentes condições de infecção identificadas pelo código de cores. As comparações foram

infectadas/simuladas. No interior, os arcos representam as proteínas expressas diferencialmente. A laranja escura representa as proteínas que são expressas diferencialmente em múltiplas condições (ligadas por linhas roxas) e a laranja clara representa proteínas que são expressas diferencialmente em apenas uma condição.

(B) Aglomerados de ontologia enriquecidos entre proteínas expressas diferencialmente determinadas pela proteômica quantitativa. Os termos estatisticamente enriquecidos foram hierarquicamente agrupados e os termos mais bem classificados dentro de cada cluster (de acordo com o valor p) foram exibidos em um dendrograma. Os valores P são representados por cores. As análises em A e B foram realizadas utilizando-se metascape. (C) Parcela de violino representando a abundância de HSL conforme determinado pela proteômica quantitativa. Diferenças significativas foram determinadas por ANOVA e retratadas em letras: a,  $P < 0.01$  vs. MOCK CoV-2(B) ou  $P < 0.05$  vs. MOCK CoV-2(P.1). (D) Western Blotting de HSL fosfoilado (Ser565), HSL total e ATGL.  $\alpha$ -tubulina foi usado como controle de carga. A quantificação (normalizada por  $\alpha$ -tubulina) é apresentada abaixo das manchas. Diferenças significativas foram determinadas pelo teste t-student e retratadas em letras: a,  $P < 0.01$  vs. MOCK. (E) Glicerol liberado no meio durante 30 min normalizado pelo teor de proteína no lisado celular. Diferenças significativas foram determinadas pelo teste t-student e retratadas em letras: a,  $p < 0.0001$  vs. <MOCK. (F) Quantificação do genoma SARS-CoV-2 no sobrenadante de células tratadas ou não com isoproterenol ( $10 \mu\text{M}$ ) por 30 minutos. A ANOVA unidirecional com o teste de comparação múltipla de Tukey foi aplicada para identificar diferenças entre os grupos. Essas diferenças são retratadas nas letras: a,  $P < 0.0001$  vs. MOCK e b,  $P < 0,05$  vs. INFEC CoV-2(B). (G) Ensaio de formação de placa (PFU) feito a partir do sobrenadante de adipócitos infectados com CoV -2 (B). Diferença significativa foi determinada pelo teste t-student e retratada com valor de  $p = 0,0568$ . (H) Imagem representativa do ensaio de formação de placas. Figuras de A-G publicadas pelo próprio autor em SACCON, T. D. et al, 2022.

## 6 DISCUSSÃO

A discussão sobre o momento ideal para a intervenção com glicocorticoides e a duração da terapia são pontos cruciais na escolha da terapia medicamentosa mais apropriada para os pacientes com COVID-19. De acordo com as diretrizes terapêuticas da OMS (SIEMIENIUK et al, 2020; Therapeutics and COVID-19: living guideline WHO, 2023), o uso de glicocorticoides é recomendado somente em pacientes com COVID-19 grave e sob ventilação mecânica, sendo desaconselhado em casos não graves da doença.

Nossos resultados indicam que o SARS-CoV-2 provoca inibição da lipólise intracelular durante a fase aguda da infecção. Além disso, observamos um aumento dos níveis do vírus no meio extracelular após um estímulo lipolítico de apenas 30 minutos, o que enfatiza a importância de uma seleção cuidadosa de terapias eficazes para pacientes com COVID-19, considerando que alguns medicamentos podem atuar como ativadores da lipólise. Um exemplo disso são os glicocorticoides, que são conhecidos por sua ação pró-lipolítica e já são utilizados no tratamento da COVID-19.

Confirmamos a persistência do vírus no sobrenadante das células após a infecção por meio do ensaio de formação de placas, indicando a presença contínua de partículas virais infectivas. Esse fenômeno pode ter implicações significativas para a disseminação da infecção e a progressão da doença.

Além disso, em nosso trabalho descobrimos a importância da influência da origem anatômica dos adipócitos, uma vez que as células de origem visceral demonstraram maior suscetibilidade à infecção viral quando comparada aos adipócitos de origem subcutânea. Demonstramos a interação entre diferentes variantes do SARS-CoV-2 e os adipócitos, destacando a variante gama P1 como menos infectiva em células adiposas viscerais em comparação com a linhagem viral selvagem. Estes fatos são implicações importantes para a compreensão da patogênese da COVID-19.

No conjunto, esses achados oferecem uma visão detalhada da interação entre o SARS-CoV-2 e o tecido adiposo humano, enfatizando a importância de considerar

esse tecido como um local potencial de replicação viral e como um contribuinte significativo para a patogênese da COVID-19. Essas descobertas não apenas ampliam nossa compreensão da doença, mas também podem fornecer insights valiosos para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas e preventivas direcionadas.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nas evidências apresentadas neste estudo, pode-se concluir que os adipócitos viscerais apresentam maior suscetibilidade à infecção viral em comparação aos adipócitos subcutâneos, devido à expressão elevada de proteínas facilitadoras da entrada viral, como a ACE2. Isso fortalece a associação entre o tecido adiposo visceral e a gravidade da COVID-19. Além disso, demonstramos que os adipócitos desempenham um papel crucial na replicação e disseminação do SARS-CoV-2, estando intimamente relacionados à desregulação do metabolismo de lipídios intracelulares. No entanto, apesar de nossos resultados estarem em concordância com a maioria dos estudos disponíveis na literatura, mais investigações são necessárias para elucidar os mecanismos específicos de replicação viral nos adipócitos. Essas descobertas têm implicações significativas para a compreensão da patogênese da COVID-19 e podem fornecer insights importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas direcionadas aos adipócitos e ao tecido adiposo como um todo. Portanto, é crucial continuar a pesquisa nesse campo, a fim de aprofundar nosso conhecimento e avançar no combate eficaz contra essa doença.

## REFERÊNCIAS

AGHILI, Seyed Morsal Mosallami et al. Obesity in COVID-19 era, implications for mechanisms, comorbidities, and prognosis: a review and meta-analysis. **International Journal of Obesity**, v. 45, n. 5, p. 998-1016, 2021.

BASTY, Nicolas et al. Abdominal imaging associates body composition with COVID-19 severity. **PloS one**, v. 18, n. 4, p. e0283506, 2023.

BOLSONI-LOPES, Andressa; ALONSO-VALE, Maria Isabel C. Lipolysis and lipases in white adipose tissue—An update. **Archives of endocrinology and metabolism**, v. 59, p. 335-342, 2015.

BRUZZONE, Chiara et al. SARS-CoV-2 infection dysregulates the metabolomic and lipidomic profiles of serum. **Iscience**, v. 23, n. 10, p. 101645, 2020.

CAMUS, Gregory et al. The hepatitis C virus core protein inhibits adipose triglyceride lipase (ATGL)-mediated lipid mobilization and enhances the ATGL interaction with comparative gene identification 58 (CGI-58) and lipid droplets. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 52, p. 35770-35780, 2014.

CASARI, Ilaria et al. Dissecting lipid metabolism alterations in SARS-CoV-2. **Progress in lipid research**, v. 82, p. 101092, 2021.

CHEN, Lu et al. Visceral adipose tissue and risk of COVID-19 susceptibility, hospitalization, and severity: A Mendelian randomization study. **Frontiers in Public Health**, v. 10, p. 1023935, 2022.

CHILAMAKURI, R.; AGARWAL, S. COVID-19: Characteristics and therapeutics. *Cells*. 2021; 10: 206. 2021.GAO, Min et al. Associations between body-mass index and COVID-19 severity in 6· 9 million people in England: a prospective, community-based, cohort study. **The lancetDiabetes & endocrinology**, v. 9, n. 6, p. 350-359, 2021.

CODO, Ana Campos et al. Elevated glucose levels favor SARS-CoV-2 infection and monocyte response through a HIF-1 $\alpha$ /glycolysis-dependent axis. **Cell metabolism**, v. 32, n. 3, p. 437-446. e5, 2020.

CORMAN, V.M., Landt, O., Kaiser, M., Molenkamp, R., Meijer, A., Chu, D.K., Bleicker, T., Brunink, S., Schneider, J., Schmidt, M.L., et al. (2020). Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill* 25.

DANILOSKI, Zharko et al. Identification of required host factors for SARS-CoV-2 infection in human cells. **Cell**, v. 184, n. 1, p. 92-105. e16, 2021.

DIAS, Suelen Silva Gomes et al. Lipid droplets fuel SARS-CoV-2 replication and production of inflammatory mediators. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 12, p. e1009127, 2020.

DISTLER, Ute et al. Label-free quantification in ion mobility–enhanced data-independent acquisition proteomics. **Nature protocols**, v. 11, n. 4, p. 795-812, 2016.

FARIA, Nuno R. et al. Genomics and epidemiology of the P. 1 SARS-CoV-2 lineage in Manaus, Brazil. **Science**, v. 372, n. 6544, p. 815-821, 2021.

FAVRE, Guillaume et al. Visceral fat is associated to the severity of COVID-19. **Metabolism**, v. 115, p. 154440, 2021.

GAO, Qianqian et al. Global prevalence of sarcopenic obesity in older adults: A systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 7, p. 4633-4641, 2021.

GIACOBBE, Daniele Roberto et al. Bloodstream infections in critically ill patients with COVID-19. **European journal of clinical investigation**, v. 50, n. 10, p. e13319, 2020.

GORWOOD, Jennifer et al. Impact of HIV/simian immunodeficiency virus infection and viral proteins on adipose tissue fibrosis and adipogenesis. **Aids**, v. 33, n. 6, p. 953-964, 2019.

GRALINSKI, Lisa E.; MENACHERY, Vineet D. Return of the Coronavirus: 2019- nCoV. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 135, 2020

GRABNER, Gernot F. et al. Lipolysis: cellular mechanisms for lipid mobilization from fat stores. **Nature metabolism**, v. 3, n. 11, p. 1445-1465, 2021.

HALES, Craig; FRYAR, Cheryl D. QuickStats: Prevalence of obesity and severe obesity among persons aged 2–19 years—National Health and Nutrition Examination Survey, 1999–2000 through 2017–2018. 2020.

HARVEY, William T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409-424, 2021.

HEATON, Nicholas S.; RANDALL, Glenn. Multifaceted roles for lipids in viral infection. **Trends in microbiology**, v. 19, n. 7, p. 368-375, 2011.

KANEHISA, Minoru; GOTO, Susumu. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 1, p. 27-30, 2000.

LAUFMAN, Orly; PERRINO, John; ANDINO, Raul. Viral generated inter-organelle contacts redirect lipid flux for genome replication. **Cell**, v. 178, n. 2, p. 275-289. e16, 2019.

MARTÍNEZ-COLÓN, Giovanni J. et al. SARS-CoV-2 infects human adipose tissue and elicits an inflammatory response consistent with severe COVID-19. **bioRxiv**, 2021.

MORIGNY, Pauline et al. Lipid and glucose metabolism in white adipocytes: pathways, dysfunction and therapeutics. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 5, p. 276-295, 2021.

NARDACCI, Roberta et al. Evidences for lipid involvement in SARS-CoV-2 cytopathogenesis. **Cell death & disease**, v. 12, n. 3, p. 1-12, 2021.

REITERER, Moritz et al. Hyperglycemia in acute COVID-19 is characterized by insulin resistance and adipose tissue infectivity by SARS-CoV-2. **Cell metabolism**, v. 33, n. 11, p. 2174-2188. e5, 2021.

RYAN, Paul MacDaragh; CAPLICE, Noel M. Is adipose tissue a reservoir for viral spread, immune activation, and cytokine amplification in coronavirus disease 2019?. **Obesity**, v. 28, n. 7, p. 1191-1194, 2020.

RICHARD, Allison J. et al. Adipose tissue: physiology to metabolic dysfunction. **Endotext [Internet]**, 2020.

SACCON, T. D. et al. SARS-CoV-2 infects adipose tissue in a fat depot-and viral lineage-dependent manner. **Nat Commun**, 2022; 13 (1): 5722.

SAMSA, Marcelo M. et al. Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000632, 2009.

SCHORR, Melanie et al. Sex differences in body composition and association with cardiometabolic risk. **Biology of sex differences**, v. 9, p. 1-10, 2018

SHAMSI, Farnaz; Tseng, Yu-Hua. Protocols for generation of immortalized human brown and white preadipocyte cell lines. In: **Thermogenic Fat**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 77-85.

SHANNON, Paul et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. **Genome research**, v. 13, n. 11, p. 2498-2504, 2003.

SIEMIENIUK et al, 2020; Therapeutics and COVID-19: living guideline WHO, 2023

STEFAN, Norbert; BIRKENFELD, Andreas L.; SCHULZE, Matthias B. Global pandemics interconnected—obesity, impaired metabolic health and COVID-19. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 17, n. 3, p. 135-149, 2021.

THOMAS, Tiffany et al. COVID-19 infection alters kynurenine and fatty acid metabolism, correlating with IL-6 levels and renal status. **JCI insight**, v. 5, n. 14, 2020.

WALTHER, Tobias C.; CHUNG, Jeeyun; FARESE JR, Robert V. Lipid droplet biogenesis. **Annual review of cell and developmental biology**, v. 33, p. 491-510, 2017.

WATANABE, Mikiko et al. Visceral fat shows the strongest association with the need of intensive care in patients with COVID-19. **Metabolism**, v. 111, p. 154319, 2020.

WU, Guanming; FENG, Xin; STEIN, Lincoln. A human functional protein interaction network and its application to cancer data analysis. **Genome biology**, v. 11, p. 1-23, 2010.

YANG, Yang et al. Visceral adiposity and high intramuscular fat deposition independently predict critical illness in patients with SARS-CoV-2. **Obesity**, v. 28, n. 11, p. 2040-2048, 2020.

YU, Guangchuang et al. clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. **Omics: a journal of integrative biology**, v. 16, n. 5, p. 284-287, 2012.

ZICKLER, Martin et al. Replication of SARS-CoV-2 in adipose tissue determines organ and systemic lipid metabolism in hamsters and humans. **Cell metabolism**, v. 34, n. 1, p. 1-2, 2022.

ZIMMERMANN, Robert et al. Fat mobilization in adipose tissue is promoted by adipose triglyceride lipase. **Science**, v. 306, n. 5700, p. 1383-1386, 2004.

ZHOU, Yingyao et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1523, 2019.

ZHU, JingJing; WILDING, John PH; HU, Ji. Adipocytes in obesity: A perfect reservoir for SARS-CoV-2?. **Medical Hypotheses**, v. 171, p. 111020, 2023.

## ANEXO A- PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

### COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 3.504.447

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEColecistectomia_040619naomarcado.pdf	04/06/2019 11:54:24	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEColecistectomia_040619marcado.pdf	04/06/2019 11:53:46	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEColecistectomia_040619marcado.doc	04/06/2019 11:53:31	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Outros	ConvenioNatura_Assinado.pdf	04/06/2019 11:46:30	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Outros	ConvenioAstrazeneca_FINAL_Assinado.pdf	04/06/2019 11:44:27	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Outros	PLANODETRABALHONATURA.pdf	11/02/2019 11:39:35	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	RegulamentoBiorrepositorio.pdf	11/02/2019 11:39:11	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Pesquisadores	DeclaracaoEVERTON.pdf	14/12/2018 16:59:42	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Folha de Rosto	Folharosto.pdf	14/12/2018 16:56:12	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	AcordoBiorrepositorio.pdf	25/05/2018 15:38:52	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração do Patrocinador	CartadeCompromissoAZ.pdf	25/05/2018 15:34:38	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração do Patrocinador	CartadeCompromissoNatura.pdf	25/05/2018 15:32:04	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito
Declaração de Pesquisadores	HistoricoEscolarDoutorado.pdf	02/10/2017 14:55:12	Carolina Mie Kawagosi Onodera	Aceito

**Situação do Parecer:**  
Aprovado

Endereço: SRTVN 701, Via W 5 Norte, lote D - Edifício PO 700, 3º andar  
 Bairro: Asa Norte CEP: 70.719-040  
 UF: DF Município: BRASILIA  
 Telefone: (61)3315-5877 E-mail: conep@saude.gov.br

