



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO



BRUNA GUEDES DE SOUSA

ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PROTEÍNA NS3 DO VÍRUS DA
DENGUE

Rio de Janeiro

2023

BRUNA GUEDES DE SOUSA

ALTERAÇÕES METABÓLICAS INDUZIDAS PELA PROTEÍNA NS3 DO VÍRUS DA
DENGUE

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Microbiologia).

Orientador (a): Andrea Thompson Da Poian

Coorientador (a): Julianna Dias Zeidler

Rio de Janeiro

2023

CIP - Catalogação na Publicação

S725a Sousa, Bruna Guedes de
 Alterações metabólicas induzidas pela proteína NS3
do vírus da dengue / Bruna Guedes de Sousa. -- Rio
de Janeiro, 2023.
 152 f.

 Orientadora: Andrea Thompson Da Poian.
 Coorientadora: Julianna Dias Zeidler.
 Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio
de Janeiro, Instituto de Microbiologia Paulo de
Góes, Programa de Pós-Graduação em Ciências
(Microbiologia), 2023.

 1. Dengue. 2. Metabolismo. 3. NS3. 4. Mitocôndria
. I. Da Poian, Andrea Thompson, orient. II.
Zeidler, Julianna Dias , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos
pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Dedico esse trabalho à minha mãe, Andrea Guedes (in memoriam), por impulsionar meus sonhos e pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo apoio durante o período do doutorado. Em especial à minha mãe, Andrea Guedes, cuja dedicação, incentivo e amor me trouxeram até aqui. E à minha avó, Dalva Maria Guedes, que é minha segunda mãe. Tive sorte de ser criada por duas mulheres incríveis, fortes, que me ensinaram a importância do estudo e impulsionaram meus sonhos.

Ao meu noivo, Guilherme Felix, por compreender todos os momentos em que precisei focar no doutorado, por todas as vezes que saiu tarde do laboratório para que eu pudesse usar algum equipamento e principalmente, por todo amor e companheirismo.

Aos meus amigos, Andrey Lourenço, Marcus Vinícius Aquino, Leonan Azevedo, John Douglas Teixeira, Anne Leite e Larissa Fernandes, que formam a família que escolhi. Obrigada pelas conversas, abraços e suporte nos momentos difíceis.

À minha orientadora, Prof^a. Andrea Da Poian, e minha coorientadora, Prof^a. Julianna Zeidler, pelo incentivo, pelas trocas científicas e aprendizado. Poder trabalhar com pesquisadoras que você admira é um privilégio.

A todos do Laboratório de Bioquímica de Vírus, pelas conversas, colaborações e apoio que se estende para além das portas do laboratório. Em especial à Dra. Lorena Siqueira, Dra. Thaís Cristtina Neves, Dra. Nathane Mebus e à Me. Geórgia Saraiva, que contribuíram diretamente com a realização deste trabalho.

Aos nossos colaboradores, Prof^a. Russolina Zingali e Prof^a. Marjolly Brígido que conduziram a análise por proteômica; Prof. Antonio Galina e Me. Clara Fernandes que realizaram os ensaios de potencial de membrana.

Gostaria de agradecer também às agências de fomento, CAPES, FAPERJ e CNPq que possibilitaram a realização deste estudo.

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

Marie Curie

PRESS RELEASE

A dengue é uma das principais doenças transmitidas por mosquitos a seres humanos, que apesar de antiga, é pouco compreendida. Ela é causada pelo vírus da dengue (DENV). Todos os anos, milhões de casos da doença são registrados mundialmente. A infecção pelo DENV é na maioria das vezes assintomática, mas a doença pode evoluir para casos graves e levar à morte. Em 2022, mais de 1000 mortes foram registradas no nosso país. Infelizmente, até presente momento, a doença não possui tratamento específico e nem uma vacina amplamente distribuída. O agravamento da dengue envolve a resposta imune e metabólica do indivíduo. Durante a infecção, algumas alterações no metabolismo celular ocorrem, sendo o fígado um órgão muito afetado. Em nosso trabalho, nós analisamos alterações no metabolismo causadas pelo DENV em mitocôndrias do fígado. O metabolismo é um conjunto de reações químicas que fornece energia para o funcionamento do organismo e as mitocôndrias são organelas celulares centrais nesse processo. Buscamos entender como o DENV pode modificar o metabolismo e observamos que algumas proteínas celulares têm seus níveis reduzidos durante a infecção. Parte dessas proteínas compõem o sistema de transporte de elétrons da mitocôndria. Esse sistema é responsável pelo consumo do oxigênio durante a respiração celular, processo no qual os nutrientes (substratos energéticos) que consumimos fornecem a energia necessária para o funcionamento das células, e conseqüentemente, do organismo. Vimos que uma das proteínas virais, a proteína não estrutural 3, NS3, promove a diminuição da utilização de alguns substratos energéticos fornecidos para as mitocôndrias, levando à uma redução do consumo de oxigênio por essas organelas. Esse efeito foi variável de acordo com o substrato que é fornecido para a mitocôndria. Além disso, vimos que quando fornecemos citocromo c, que também faz parte do sistema de transporte de elétrons, para as mitocôndrias, o efeito observado é revertido, o que indica que NS3 pode atuar sobre essa molécula e assim diminuir o consumo de oxigênio das mitocôndrias. Esses achados são importantes para entender como o DENV causa mudanças no metabolismo celular, indicando que NS3 pode causar uma parte delas. Entender as alterações que ocorrem durante a infecção pode contribuir para o desenvolvimento de terapias anti-DENV.



RESUMO

Sousa, Bruna Guedes. Estudo do papel da proteína NS3 do vírus da dengue no metabolismo de células humanas. Alterações metabólicas induzidas pela proteína NS3 do vírus da dengue. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Ciências-Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

A dengue é responsável por um número significativo de casos e mortes todos os anos mundialmente e atualmente não possui tratamento específico. Estudos indicam uma relação entre o metabolismo da célula hospedeira e a replicação do vírus da dengue (DENV), incluindo nossa observação prévia de que a infecção pelo DENV afeta a bioenergética mitocondrial. Foi demonstrado que a proteína não estrutural 3 (NS3) do DENV possui um peptídeo sinal de importação para a mitocôndria. Os mecanismos pelos quais o DENV modula o metabolismo celular são pouco conhecidos e faltam evidências do papel de NS3 nesse contexto. Para investigar isso, realizamos uma varredura por proteômica com mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas pelo DENV. De todos os peptídeos virais identificados na fração mitocondrial, 44,4% pertenciam à NS3, sugerindo que NS3 está localizada na mitocôndria durante a infecção. Em seguida, investigamos possíveis papéis de NS3 no metabolismo mitocondrial. Usando um protocolo de respirometria multi-substrato, observamos a diminuição da respiração acoplada e da razão de controle respiratório (RCR) em mitocôndrias incubadas com o domínio protease de NS3 (NS3pro). Ao avaliar a utilização de cada substrato individualmente, NS3pro diminuiu o RCR associado à malato/piruvato (40,6%), palmitoil-carnitina (53,2%) e succinato (56,2%). No entanto, o domínio de protease cataliticamente inativo, NS3proS135A, não prejudica a taxa respiratória associada a malato/piruvato e de palmitoil-carnitina, mas prejudica a induzida por succinato, indicando efeitos diferenciais dependentes e independentes da atividade protease de NS3pro dependendo do substrato. O comprometimento da taxa respiratória associada ao succinato, mas não a piruvato/malato ou palmitoil-carnitina, também foi observado com mitocôndrias incubadas com NS3 inteira (contendo todos os domínios) e células transfectadas com NS3. NS3pro não compromete a integridade da membrana interna mitocondrial, uma vez que não houve diferença na capacidade de formação de potencial da membrana mitocondrial entre o controle e as mitocôndrias incubadas com NS3. Além disso, nem a função dos complexos mitocondriais II e IV foi diretamente afetada pela incubação com NS3pro, indicando que outros componentes do sistema transportador de elétrons são afetados por NS3pro. A suplementação com citocromo c restaurou o consumo de oxigênio para níveis do controle na presença de succinato, mas não com outros substratos. De modo geral, mostramos que NS3 afeta o metabolismo mitocondrial de forma substrato-específica, afetando a taxa respiratória associada succinato de maneira dependente do citocromo c e independente de sua atividade protease. Esses achados elucidam novas potenciais funções de NS3 na reprogramação metabólica que ocorre durante a infecção pelo DENV.

Palavras-chave: dengue, metabolismo, NS3, mitocôndria, citocromo c, bioenergética.

ABSTRACT

Sousa, Bruna Guedes. Estudo do papel da proteína NS3 do vírus da dengue no metabolismo de células humanas. Alterações metabólicas induzidas pela proteína NS3 do vírus da dengue. Rio de Janeiro, 2023. Tese (Doutorado em Ciências-Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2023.

Dengue disease is responsible for a significant number of cases and deaths every year worldwide and currently has no specific treatment. Studies indicate a relationship between host cell metabolism and dengue virus (DENV) replication, including our previous observation that DENV infection affects mitochondrial bioenergetics. It has been shown that DENV nonstructural protein 3 (NS3) possesses a N-terminal mitochondrial import signal. However, the mechanisms by which DENV modulates cellular metabolism are poorly known, and evidence for the role of NS3 in this context is lacking. To investigate that, we performed proteomics screening on the mitochondria isolated from DENV-infected Huh7 cells. From all viral peptides identified in the mitochondrial fraction, 44.4% belonged to NS3, suggesting that NS3 is localized in mitochondria during infection. Next, we investigated possible roles of NS3 in mitochondrial metabolism. Using a multi-substrate respirometry protocol, we observed decreased coupled respiration and respiratory control ratio (RCR) in mitochondria incubated with the NS3 protease domain (NS3pro). When assessing the utilization of each substrate individually, NS3pro decreased the RCR associated with malate/pyruvate (40,6%), palmitoylcarnitine (53,2%), and succinate (56.2%). However, the catalytically inactive protease domain, NS3proS135A, does not impair the respiratory rates associated with malate/pyruvate and palmitoylcarnitine, but it impairs succinate-induced, indicating differential protease-dependent and independent effects of NS3pro depending on the substrate. The respiratory rate impairment associated with succinate, but not with pyruvate/malate or palmitoylcarnitine, was also observed with mitochondria incubated with full-length NS3 and NS3-transfected cells. NS3pro does not disrupt mitochondria membrane integrity since there was no difference in mitochondrial membrane potential between control and NS3-incubated mitochondria. Also, neither mitochondrial complex II nor IV function was directly affected by NS3pro incubation, indicating that other components of the electron transport system are affected by NS3pro. Cytochrome c supplementation restored oxygen consumption to control levels in the presence of succinate but not with other substrates. Altogether, we show that NS3 impairs mitochondrial metabolism differently, affecting succinate-induced respiration in a cytochrome c-dependent and protease-independent manner. These findings uncover new potential functions for NS3 in metabolic reprogramming during DENV infection.

Key words: dengue, metabolism, NS3, mitochondria, cytochrome c, bioenergetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ocorrência global da dengue.....	18
Figura 2. Estrutura do DENV.....	20
Figura 3. Representação do genoma do DENV.....	20
Figura 4. Ilustração do ciclo replicativo do DENV.....	22
Figura 5. Estrutura da NS3 do DENV.....	23
Figura 6. Sítios de clivagem da protease NS2B-NS3.....	24
Figura 7. Localização de NS3 em células infectadas pelo DENV.....	26
Figura 8. Estrutura mitocondrial.....	29
Figura 9. Esquema ilustrativo da fosforilação oxidativa.....	31
Figura 10. Esquema ilustrativo do ciclo de Krebs.....	32
Figura 11. Exemplo de supercomplexo.....	33
Figura 12. Esquema ilustrativo do sistema de transdução com vetor lentiviral induzível.....	39
Figura 13. SDS-PAGE das proteínas recombinantes purificadas.....	44
Figura 14. <i>Screening</i> por proteômica de mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas.....	52
Figura 15. Funções das proteínas celulares alteradas pela infecção.....	52
Figura 16. Expressão de NS3 em células A549 submetidas à transdução com vetor γ -retroviral.....	54
Figura 17. Expressão de NS3 em células A549 utilizando transdução com vetor lentiviral Tet-On.....	56
Figura 18. Esquema dos constructos utilizados para expressão do domínio protease de NS3(NS3pro).....	58
Figura 19. Resultados representativos de ensaios de respirometria de alta resolução utilizando um protocolo multi-substrato.....	59
Figura 20. NS3pro afeta a respiração mitocondrial.....	61
Figura 21. NS3pro não compromete o potencial de membrana mitocondrial.....	62
Figura 22. NS3pro não compromete a integridade dos complexos do ETS.....	63
Figura 23. Esquema ilustrativo do sistema transportador de elétrons com os substratos e inibidores utilizados nos ensaios de respirometria de alta resolução.....	65

Figura 24. NS3 afeta os complexos respiratórios de diferentes maneiras.....	66
Figura 25. NS3pro não afeta consideravelmente o funcionamento do complexo IV.....	67
Figura 26. NS3pro estimula a atividade da succinato desidrogenase (SDH).....	68
Figura 27. NS3pro interfere no transporte de elétrons através do citocromo c quando succinato é usado como substrato.....	69
Figura 28. NS3pro não degrada citocromo c.....	70
Figura 29. NS3prohel reduz a respiração mitocondrial associada à oxidação de succinato.....	71
Figura 30. Expressão de NS3 em células HEK293T transfectadas.....	73
Figura 31. A oxidação de succinato diminui em células HEK293T que expressam NS3.....	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Plasmídeos utilizados nas transfecções.....	37
Tabela 2 - Peptídeos de proteínas do DENV identificados por análise proteômica em mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas.....	51
Tabela 3 - Proteínas moduladas negativamente (redução de pelo menos duas vezes em relação ao mock) em mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas com DENV.....	53

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

∅ - vazio

$\Delta\psi$ - potencial de membrana

ACC - acetil-CoA carboxilase

Acetil-CoA - acetil coenzima a

AMPK - proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK, do inglês *5' adenosine-monophosphate activated kinase*)

Apaf-1 - fator 1 ativador da peptidase apoptótica (do inglês *apoptotic peptidase activating factor 1*)

ATGL - lipase de triacilglicerol do adipócito (do inglês *adipose triglyceride lipase*)

BAX - proteína X associada à Bcl-2 (do inglês *Bcl-2 associated X-protein*)

C - capsídeo

CPT - carnitina palmitoiltransferase

DCPIP - 2,6-diclorofenolindofenol

DDM - n-dodecil β -D-maltosídeo

DENV- vírus da dengue

DOX - doxiciclina

DRP1 - proteína 1 relacionada à dinamina (do inglês *dynammin-related protein 1*)

E - envelope

ETF - flavoproteína de transferência de elétrons (do inglês *electron transfer flavoprotein*)

ETF:QO - flavoproteína de transferência de elétrons:ubiquinona oxidoreductase (do inglês *electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase*)

ETS - sistema transportador de elétrons (do inglês *electron transport system*)

FAS - ácido graxo sintase (do inglês *fatty acid synthase*)

GLs- gotículas lipídicas

HCV - vírus da hepatite C

HIV-1 - vírus da imunodeficiência humana 1

- IKK ϵ , - isoforma epsilon da proteína quinase de IKB (do inglês *I κ B kinase ϵ*)
- IRF3 - fator regulador de interferon 3 (do inglês *interferon regulatory factor 3*)
- JEV - vírus da encefalite japonesa
- LB - Luria-Bertani
- LDL - lipoproteína de baixa densidade (do inglês *low-density lipoprotein*)
- MAMs - membranas associadas às mitocôndrias (do inglês *mitochondria-associated membranes*)
- MICOS - local de contato mitocondrial e sistema organizador de cristas (do inglês *mitochondrial contact site and cristae organizing system*)
- MITA - mediador humano da ativação IRF3 (do inglês *human mediator of IRF3 activation*)
- MFN - mitofusina
- MTT - brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio
- NRBP - proteína de ligação ao receptor nuclear (do inglês *nuclear receptor binding protein*)
- NS - proteína não estrutural (do inglês *nonstructural protein*)
- NTPase - trifosfatase de nucleosídeo (do inglês *nucleoside-triphosphatase*)
- OCR - taxa de consumo de oxigênio (do inglês *oxygen consumption rate*)
- OPA1 - proteína da atrofia óptica tipo 1 (do inglês *optic atrophy type 1 protein*)
- PARP - poli (ADP-ribose) polimerase (do inglês *poly (ADP-ribose) polymerase*)
- prM - precursora de membrana
- Rab - proteína relacionada à Ras no cérebro (do inglês *Ras-related proteins in brain*)
- RCR - taxa de controle respiratório (do inglês *respiratory control rate*)
- RE - retículo endoplasmático
- RTPase - 5'-trifosfatase de RNA (do inglês *RNA 5'-triphosphatase*)
- SBF - soro fetal bovino
- SC - supercomplexos
- SDH - succinato desidrogenase (do inglês *succinate dehydrogenase*)
- TFP - proteína trifuncional mitocondrial (do inglês *trifunctional protein*)
- UTRs - região não traduzida (do inglês *untranslated regions*)

VDAC1 - do inglês *anti-voltage dependent anion channel 1*

VSV - vírus da estomatite vesicular

WNV - vírus do Oeste do Nilo

ZIKV - vírus do Zika

SUMÁRIO

PRESS RELEASE.....	07
RESUMO.....	08
ABSTRACT.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	13
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Dengue.....	18
1.2. Vírus da Dengue.....	19
1.2.1. Estrutura Viral.....	19
1.2.2. Mecanismo de replicação viral.....	21
1.2.3. NS3.....	23
1.2.4. DENV e metabolismo.....	26
1.2.5. DENV e mitocôndrias.....	28
1.3. Mitocôndrias.....	28
1.3.1. Estrutura mitocondrial.....	28
1.3.2. Bioenergética mitocondrial.....	30
2. JUSTIFICATIVA.....	34
3. OBJETIVOS.....	35
3.1. Objetivo Geral.....	35
3.2. Objetivos Específicos.....	35
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1. Estabelecimento dos modelos de estudo in vitro.....	36
4.1.1 Infecção.....	36
4.1.2. Plasmídeos.....	36
4.1.3. Expressão de NS3 através de transdução com vetor lentiviral induzível.....	37
4.1.4. Expressão de NS3 através de transfecção.....	39
4.2. Avaliação da expressão de NS3 por imunofluorescência.....	39
4.3. Detecção de NS3 por western blotting.....	40

4.4. Determinação da viabilidade celular por ensaio de MTT.....	41
4.5. Proteômica de mitocôndrias isoladas.....	41
4.6. Expressão e purificação de NS3 recombinante.....	43
4.7. Isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongos.....	44
4.8. Ensaio de respirometria de alta resolução.....	45
4.8.1. Ensaio com mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo.....	45
4.8.2. Ensaio com células intactas ou permeabilizadas.....	46
4.9. Medidas de potencial de membrana mitocondrial.....	47
4.10. Análise dos complexos mitocondriais por eletroforese em gel “Nativo Azul” (BN-PAGE).....	48
4.11. Atividade da succinato desidrogenase (SDH).....	48
4.12. Análise eletroforética e coloração com nitrato de prata.....	48
4.13. Análises estatísticas.....	49
5. RESULTADOS.....	50
5.1. Perfil proteômico de mitocôndrias de linhagem de células hepáticas humanas infectadas pelo DENV.....	51
5.2. Estabelecimento de um modelo celular de expressão heteróloga da proteína NS3.....	53
5.3. O domínio protease de NS3 afeta a respiração mitocondrial em mitocôndrias isoladas.....	57
5.4. NS3pro inibe a utilização de piruvato/malato, succinato e palmitoil-carnitina de maneiras distintas.....	63
5.5. NS3pro afeta o consumo de oxigênio associado ao succinato prejudicando a função do citocromo c.....	67
5.6. NS3prohel prejudica o consumo de oxigênio induzido por succinato, mas não por malato/piruvato ou palmitato, em mitocôndrias isoladas.....	71
5.7. A transfecção de NS3prohel prejudica o consumo de oxigênio associado ao succinato nas mitocôndrias de células permeabilizadas.....	72
6. DISCUSSÃO.....	76
6.1. Proteínas virais associadas à mitocôndria.....	76
6.2. Alterações do metabolismo mitocondrial induzidas por NS3.....	77
6.3. Efeitos da NS3 na oxidação de diferentes substratos na mitocôndria.....	79
7. CONCLUSÕES.....	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
ANEXOS.....	91

1. INTRODUÇÃO

1.1. Dengue

A dengue é uma arbovirose de alta incidência em humanos e representa um grande problema de saúde pública. Estima-se que metade da população mundial corre o risco de contrair a doença (World Health Organization, 2022). A dengue é causada pelo vírus da dengue, da família *Flaviviridae*, transmitido principalmente por fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* (Guzman *et al.*, 2016). Além do *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. polynesiensis* e espécies do complexo *A. scutellaris* também podem transmitir o DENV (World Health Organization, 2009), o que contribui para uma grande distribuição geográfica da doença. Atualmente 129 países são afetados na África, Américas, Mediterrâneo Oriental, Sudeste Asiático e Pacífico Ocidental (**Figura 1**), e estima-se que ocorram de 100 a 400 milhões de infecções anuais pelo DENV (World Health Organization, 2022).

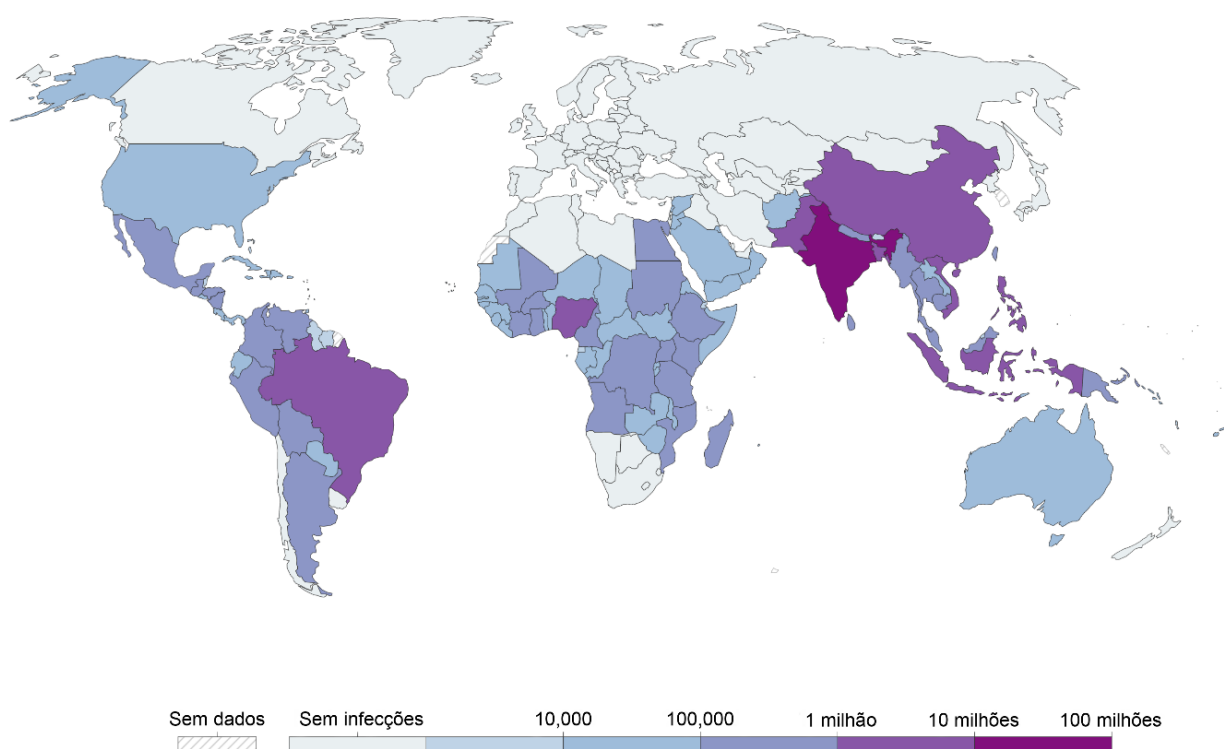


Figura 1. Ocorrência global da dengue. O mapa ilustra a distribuição global da dengue, assim como, o número de infecções em 2019. A dengue é endêmica em regiões da África, das Américas, do Mediterrâneo Oriental, do Sudeste Asiático e do Pacífico Ocidental (Adaptado de Our World In Data. Disponível em: <https://ourworldindata.org/grapher/dengue-incidence?time=latest>. Data de acesso: 14/01/2023).

O Brasil possui o maior percentual de casos de dengue do continente americano (Institute for Health Metrics and Evaluation, 2021). No ano de 2022, foram registrados cerca de 1,4 milhão casos prováveis e 978 óbitos em decorrência da doença no país (Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde, 2022).

Além do impacto na saúde da população, a dengue também afeta a economia do país. Estima-se que 3 bilhões de dólares sejam gastos anualmente nas Américas com a doença, sendo o Brasil responsável por 46,6% dos gastos (Laserna *et al.*, 2018).

Os sintomas clínicos mais comuns da dengue incluem manifestações leves, mas debilitantes, como febre, dores musculares e articulares, dor de cabeça e erupção cutânea (Guzman *et al.*, 2016; Khanam *et al.*, 2022). Alguns indivíduos desenvolvem formas mais graves da doença, como a febre hemorrágica da dengue e a síndrome do choque da dengue, marcadas pelo aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de plasma, hemorragia em mucosas e queda na contagem de plaquetas, que podem culminar em morte (Guzman *et al.*, 2016; Khanam *et al.*, 2022).

Existem quatro sorotipos do DENV (DENV 1-4) geneticamente relacionados e antigenicamente distintos, que evoluíram de um ancestral comum (Wang *et al.*, 2000). As formas graves de dengue são mais frequentes em infecções secundárias causadas por um sorotipo do DENV diferente do da infecção anterior (Murphy e Whitehead, 2011; Khanam *et al.*, 2022). Devido a existência desses sorotipos distintos e ao aumento do risco de progressão para doença grave associada a infecções secundárias, o desenvolvimento de vacinas é desafiador. Até o presente momento nenhuma vacina para uso generalizado está disponível e não há tratamentos antivirais específicos contra o DENV (Silva e Fernandez-Sesma, 2023). Portanto, é crucial continuar a pesquisa para descobrir alvos terapêuticos que possam atenuar o impacto da dengue.

1.2. Vírus da Dengue

1.2.1. Estrutura viral

O DENV consiste em uma partícula de cerca de 50 nm de diâmetro. Em sua superfície são encontrados homodímeros da proteína de envelope e proteínas de membrana ancorados em uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira. Na parte interna da partícula encontra-se

o nucleocapsídeo composto de RNA genômico associado a homodímeros da proteína capsídeo (Perera e Kuhn, 2008; Cruz-Oliveira *et al.*, 2015) (**Figura 2**).

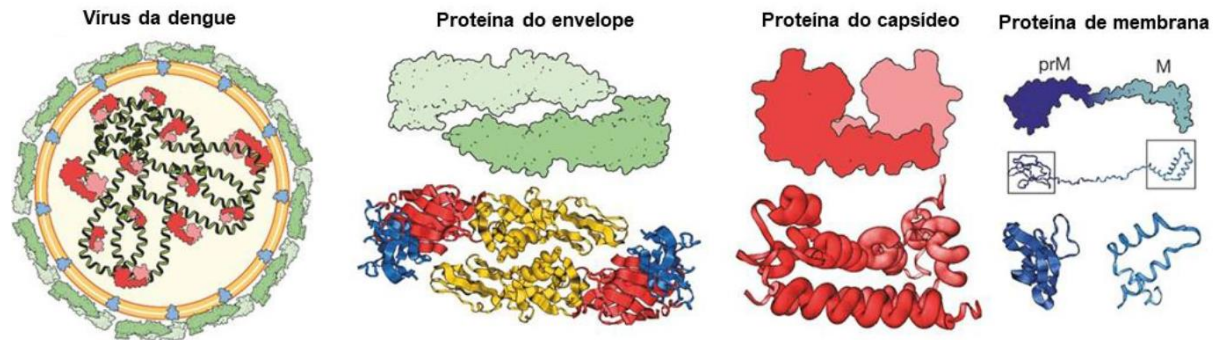


Figura 2. Estrutura do DENV. Representação esquemática da estrutura do DENV composta de um envelope lipídico (em laranja) em cuja superfície estão ancorados homodímeros da proteína de envelope (em verde) e proteínas de membrana (M, em azul), envolvendo o nucleocapsídeo formado pelo RNA genômico associado à homodímeros da proteína capsídeo (em vermelho) (Adaptado de Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

O genoma viral possui aproximadamente 11 kb e consiste em uma fita simples de RNA de senso positivo capeado na extremidade 5' (Lindenbach, Thiel e Rice, 2007; Tay e Vasudevan, 2018). Nas suas extremidades 5' e 3' são encontradas regiões não codificantes (UTRs, do inglês *untranslated regions*), que contêm sequências conservadas que servem como elementos de direcionamento para sua amplificação, tradução e encapsidação (Meng *et al.*, 2015). O RNA viral é traduzido dando origem a uma poliproteína que é posteriormente clivada originando as três proteínas estruturais do vírus já mencionadas, a proteína do capsídeo (C), a proteína de envelope (E), a proteína precursora de membrana (PrM), e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Perera e Kuhn, 2008) (**Figura 3**).

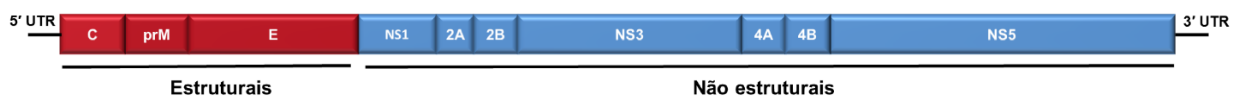


Figura 3. Representação do genoma do DENV. O RNA genômico viral serve também como RNA mensageiro, e codifica três proteínas estruturais, a proteína do capsídeo (C), a proteína precursora de membrana (prM) e a proteína de envelope (E), que compõem a estrutura viral, e sete proteínas não estruturais, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que estão envolvidas na replicação viral.

1.2.2. Mecanismo de replicação viral

A replicação viral tem início com a adesão do DENV a receptores presentes na superfície da célula hospedeira, seguida da sua internalização por endocitose. Na vesícula endocítica, a proteína E passa por mudanças conformacionais devido ao baixo pH, o que permite a fusão da membrana endossomal com a membrana viral culminando na liberação do nucleocapsídeo para o citoplasma. O nucleocapsídeo dissocia-se liberando o RNA viral, que pode ser então traduzido no retículo endoplasmático (RE) originando a poliproteína viral. Como mencionado anteriormente, a poliproteína viral é clivada originando dez proteínas. As proteínas não estruturais e proteínas do hospedeiro agrupam-se em vesículas derivadas da membrana do RE formando os chamados complexos replicativos, onde a transcrição pode ser iniciada (Screaton *et al.*, 2015; Madhry *et al.*, 2021). O RNA fita simples senso positivo é transcrito em um RNA complementar de senso negativo, que fica pareado com a fita de senso positivo formando um RNA intermediário dupla fita. A fita de senso negativo serve então como molde para a síntese de várias moléculas de RNA de senso positivo (Klema, Padmanabhan e Choi, 2015). As fitas de RNA viral recém-sintetizadas são empacotadas por cópias da proteína C, originando o nucleocapsídeo, que brota para o lúmen do RE formando partículas virais imaturas. Posteriormente, essas partículas virais imaturas migram pela rede trans-Golgi onde passam por mudanças conformacionais tornando-se maduras e são liberadas para o meio extracelular por exocitose (Screaton *et al.*, 2015; Madhry *et al.*, 2021) (**Figura 4**).

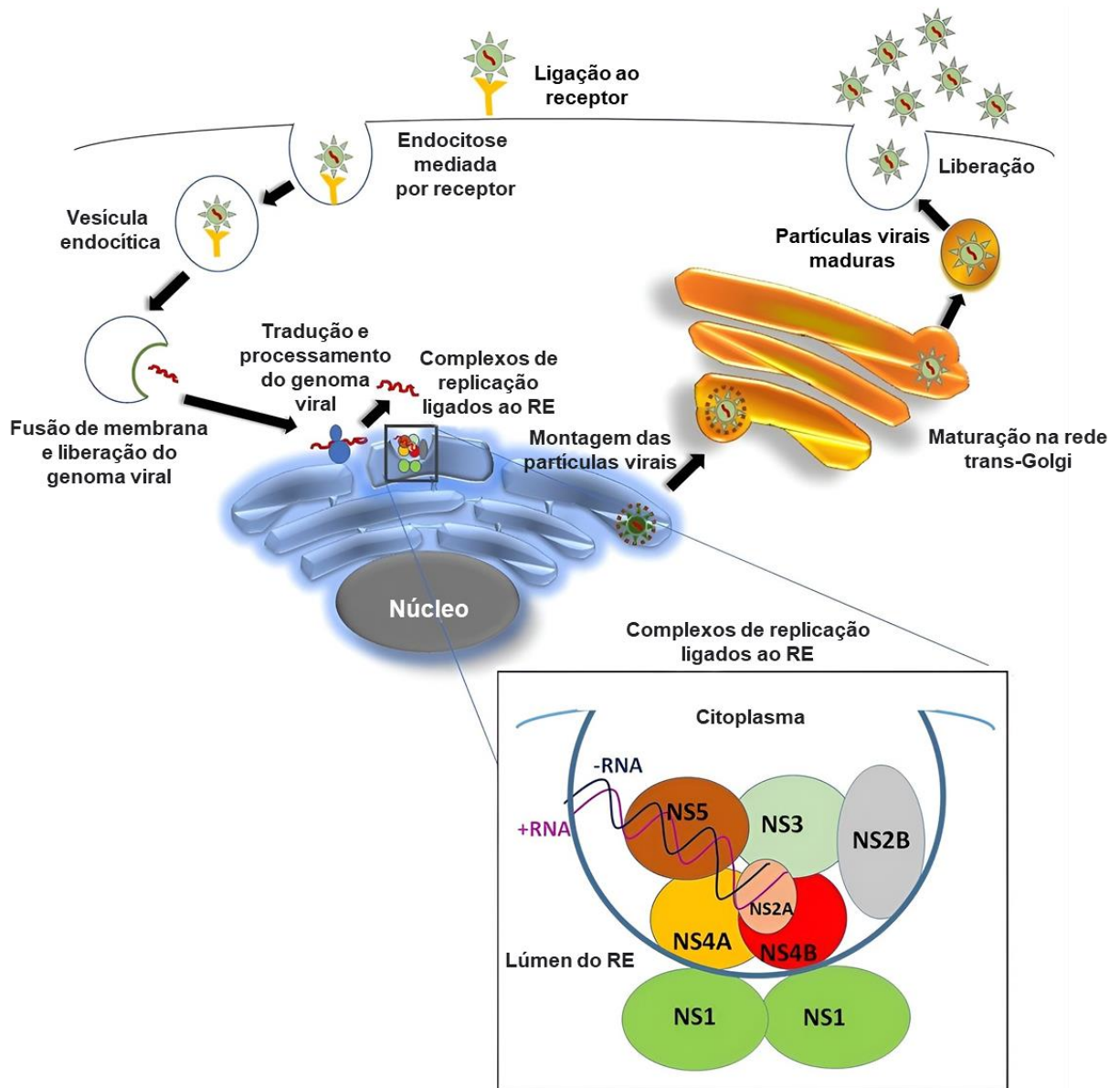


Figura 4. Ilustração do ciclo replicativo do DENV. O DENV é reconhecido por receptores na superfície da célula hospedeira e é internalizado por endocitose. A acidificação da vesícula endocítica permite a fusão entre a membrana endossomal e a membrana viral, culminando na liberação do genoma viral. O RNA viral é então traduzido no RE rugoso originando uma poliproteína, que posteriormente é clivada pela protease viral e por proteases da célula hospedeira. As proteínas não estruturais do DENV em conjunto com proteínas do hospedeiro se agrupam em vesículas associadas ao RE formando os complexos de replicação viral, onde a transcrição pode ser iniciada. As fitas de RNA viral recém-sintetizadas são empacotadas com cópias da proteína C formando o nucleocapsídeo, que brota para o lúmen do RE formando as partículas virais imaturas, cuja maturação ocorre na rede trans-Golgi. Por fim, as partículas virais maduras são liberadas para o meio extracelular por exocitose. (Adaptado de Madhry *et al.*, 2021).

1.2.3. NS3

A proteína multifuncional NS3 é altamente conservada entre os flavivírus (Papageorgiou *et al.*, 2016), sendo a segunda maior proteína viral, com aproximadamente 70 kDa (Lindenbach, Thiel e Rice, 2007). NS3 é necessária para o processamento da poliproteína viral e para posterior replicação do genoma do DENV, pois possui um domínio protease na sua região N-terminal (resíduos 1-180) e um domínio RNA-helicase, trifosfatase de nucleosídeo (NTPase, do inglês *nucleoside-triphosphatase*) e 5'-trifosfatase de RNA (RTPase, do inglês *RNA 5'-triphosphatase*) na região C-terminal (resíduos 181-618) (Meng *et al.*, 2015) (**Figura 5**).

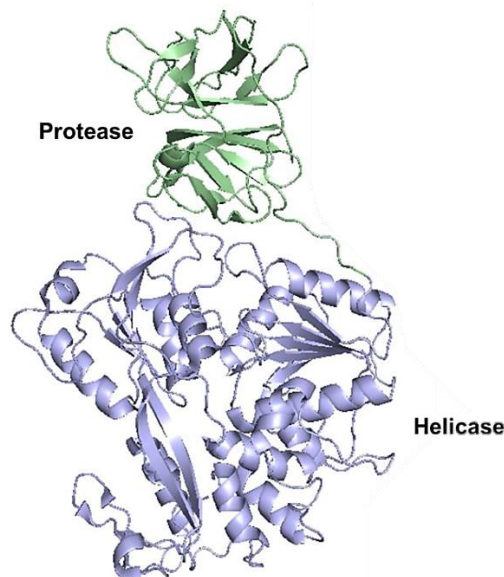


Figura 5. Estrutura da NS3 do DENV. Estrutura da proteína NS3, preparada a partir de dados do PDB ID: 2VBC. O domínio de protease (resíduos 1-180, verde) encontra-se na extremidade N-terminal na molécula. O domínio helicase corresponde a dois terços da molécula (resíduos 180-618, lilás) e encontra-se na extremidade C-terminal.

O domínio protease NS3 (NS3pro) apresenta atividade do tipo serina protease, com motivos estruturais semelhante aos encontrados nas enzimas do tipo tripsina. Ela possui uma tríade catalítica composta pelos resíduos histidina na posição 51 (His51), aspartato na posição 75 (Asp75) e serina na posição 135 (Ser135) (Valle e Falgout, 1998). A atividade protease de NS3 depende da sua associação com NS2B para clivagem da poliproteína viral, a qual se dá em sítios após um par de aminoácidos básicos (Lys-Arg, Arg-Arg, Arg-Lys, com exceção de Gln-Arg) (Yusof *et al.*, 2000). NS2B possui domínios transmembrana, permitindo que NS3 se

associe com a membrana do RE, posicionando-a nas proximidades das poliproteínas a serem clivadas (Luo, Vasudevan, e Lescar, 2015). Além disso, acredita-se que NS3 possa assumir uma conformação alongada dado que ela é estruturalmente dinâmica, o que poderia explicar como a protease NS2B-NS3 pode atuar em diferentes regiões da poliproteína viral (Perera e Kuhn, 2008). As clivagens proteolíticas catalisadas por NS2B-NS3 ocorrem nas junções NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A e NS4B/NS5 (Falgout *et al.*, 1991; Arias, Preugschat e Strauss, 1993; Lin *et al.*, 1993; Lobigs, 1993; Teo and Wright, 1997) (**Figura 6**).

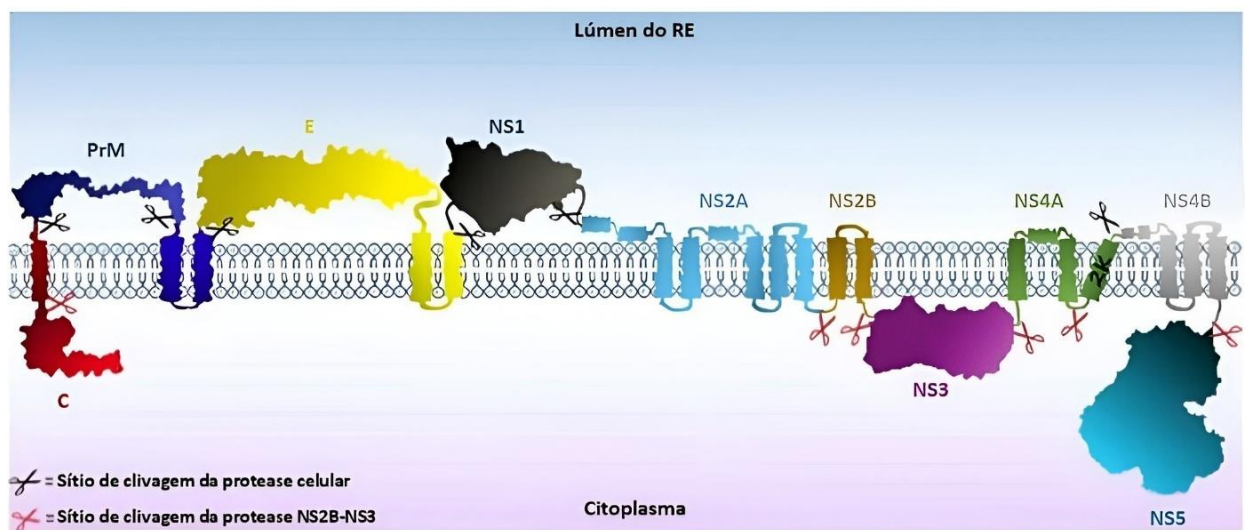


Figura 6. Sítios de clivagem da protease NS2B-NS3. Representação da topologia da poliproteína do DENV na membrana do retículo endoplasmático, com os sítios de clivagem por proteases do hospedeiro (tesouras pretas), e pela protease viral (tesouras vermelhas). RE: retículo endoplasmático (Adaptado de Zeidler *et al.*, 2017).

A atividade helicase de NS3 desenrola o dsRNA intermediário da replicação do genoma viral, por um mecanismo dependente da hidrólise de nucleotídeo trifosfato (NTP), desempenhada por sua atividade NTPase (Davidson *et al.*, 2018). A atividade helicase é aumentada pela interação com NS4B (Kundharapu e Chowdary, 2022). É interessante destacar que o domínio helicase também interage com a polimerase viral, NS5, sendo essa interação essencial para replicação do RNA viral (Tay *et al.*, 2015). Já a atividade RTPase está relacionada ao capeamento da extremidade 5' do RNA viral. Ela é necessária para desfosforilar o terminal 5' antes da adição do cap (Lindenbach, Thiel e Rice, 2007). O capeamento do RNA viral é importante para que a tradução seja eficiente, pois confere proteção ao mRNA contra a degradação por 5'exoribonucleases celulares (Decroly *et al.*, 2011).

Além das atividades clássicas, NS3 também desempenha outras funções, algumas pouco compreendidas. Durante a infecção, NS3 interage com a proteína caveolina-1 presente em jangadas lipídicas (*lipid rafts*). As jangadas lipídicas são microdomínios enriquecidos com colesterol e esfingolípido presentes nas membranas da célula. O efeito causado por essa interação não é claro, mas parece estar relacionada a um evento de sinalização, ou de regulação, para o recrutamento de moléculas celulares necessárias durante o processamento da poliproteína viral ou replicação do RNA viral (Cordero *et al.*, 2014).

Células infectadas pelo DENV apresentam estruturas membranosas intracelulares interconectadas ao RE. Essas estruturas são conhecidas como membranas convolutas, vesículas e tubos de membrana. Acredita-se que elas favorecem a eficiência da replicação viral por servirem como uma plataforma para amplificação do RNA viral e por conferirem proteção contra a resposta imunológica (Welsch *et al.*, 2009). Existem indicativos de que NS3 possa estar envolvida na formação dessas estruturas. Um estudo realizado em 2004 mostrou que a expressão de NS3 poderia levar à proliferação de membranas derivadas do RE na região perinuclear. Ademais, NS3 interage com a proteína de ligação ao receptor nuclear (NRBP, do inglês *nuclear receptor binding protein*) e faz com que ela seja realocada do citoplasma para a região perinuclear. NRBP por sua vez está associada ao tráfego entre RE e Golgi. Não se sabe ao certo as consequências desse evento, mas acredita-se que possa estar relacionado à formação dessas estruturas, pois NRBP poderia regular o transporte de lipídios para essas regiões (Chua, Ng e Chow, 2004). Posteriormente, foi demonstrado por microscopia eletrônica que NS3 pode ser encontrada em membranas convolutas e vesículas (**Figura 7**), o que dá suporte à hipótese de que a NS3 participe da formação dessas estruturas membranares (Welsch *et al.*, 2009).

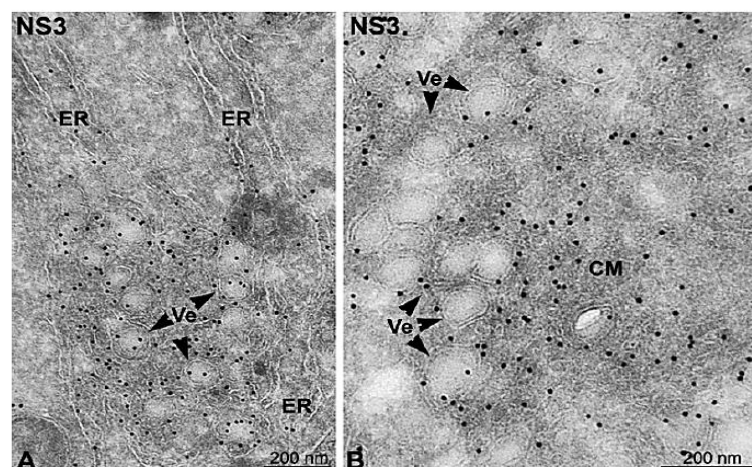


Figura 7. Localização de NS3 em células infectadas pelo DENV. Microscopia eletrônica de células Huh7 infectadas pelo DENV. O vírus induz a formação de estruturas membranosas interconectadas ao RE denominadas membranas convolutas (CM) e vesículas (Ve/setas). As células foram marcadas com anticorpos específicos para NS3 (Welsch *et al.*, 2009).

Há muito a ser explorado em relação às funções desempenhadas por NS3. Um estudo interessante realizado com NS3 e NS5 de diferentes flavivírus identificou que 108 proteínas humanas poderiam interagir com essas proteínas virais. As proteínas humanas identificadas que poderiam interagir com NS3 eram componentes do citoesqueleto, ou estavam relacionadas a processos como transporte vesicular, metabolismo de lipídeos, regulação transcricional e regulação do sistema imunológico (Le Breton *et al.*, 2011).

A protease NS2B/NS3 contribui para evasão do sistema imune do hospedeiro, pois interage com a isoforma epsilon da proteína quinase de IKB (IKK ϵ , do inglês *I κ B kinase ϵ*) mascarando seu domínio quinase, o que resulta no bloqueio da fosforilação catalisada por ela e da posterior translocação para o núcleo do fator regulador de interferon 3 (IRF3, do inglês *interferon regulatory factor 3*) (Angleró-Rodríguez, Pantoja e Sariol, 2014). NS2B/NS3 também bloqueia a ativação de IRF3 por meio da clivagem do mediador humano da ativação IRF3 (MITA, do inglês *human mediator of IRF3 activation*) (Yu *et al.*, 2012). Em ambos os casos ocorre a inibição da expressão de interferon tipo 1.

1.2.4. DENV e metabolismo

Nos últimos anos, vem crescendo o número de trabalhos que abordam alterações metabólicas induzidas pelo DENV. Durante a infecção, o perfil lipídico das células é alterado. Ocorrem mudanças na expressão de genes envolvidos na biossíntese de lipídeos, lipólise e β -oxidação como, por exemplo, aumento da expressão gênica das enzimas ácido graxo sintase (FAS, do inglês *fatty acid synthase*), acetil-CoA carboxilase (ACC), lipase de triacilglicerol do adipócito (ATGL, do inglês *adipose triglyceride lipase*), carnitina palmitoiltransferase-1 (CPT-1), entre outras (Tongluan *et al.*, 2017). Ocorre também o aumento do número de gotículas lipídicas (GLs) em alguns tipos celulares como em fibroblastos (Samsa *et al.*, 2009), leucócitos, macrófagos (Assunção-Miranda *et al.*, 2010) e células epiteliais pulmonares (Tang *et al.*, 2014). É interessante destacar que estudos clínicos de casos de dengue identificaram a diminuição dos níveis de colesterol e lipoproteínas de baixa densidade (LDL, do inglês *low-density lipoprotein*) no soro de pacientes (van Gorp *et al.*, 2002; Biswas *et al.*, 2015; Durán *et al.*, 2015; El-Bacha

et al., 2016), o que sugere que os triacilgliceróis poderiam estar sendo estocados na forma de GLs, em vez de serem secretados na forma de lipoproteínas.

NS3 é capaz de recrutar a enzima FAS para os sítios de replicação viral e estimular sua atividade, aumentando assim a síntese *de novo* de lipídeos (Heaton *et al.*, 2010). Esse evento parece ser mediado pela proteína Rab-18 (Rab, do inglês *Ras-related proteins in brain*), uma proteína da família Rab GTPase de reguladores do tráfego de membrana que pode ser encontrada no RE e em GLs (Tang *et al.*, 2014). A biossíntese de lipídeos é bastante relevante para a replicação viral, dado que a inibição farmacológica (Samsa *et al.*, 2009) ou o silenciamento da FAS (Tongluan *et al.*, 2017) culminam na redução da replicação do RNA viral e da formação de partículas virais infecciosas do DENV.

A lipofagia, autofagia seletiva de GLs, também está aumentada na infecção pelo DENV e permite que ácidos graxos sejam disponibilizados para que ocorra o aumento da β -oxidação (Heaton e Randall, 2010; Jordan e Randall, 2017). A infecção estimula a via da proteína quinase ativada por monofosfato de adenosina (AMPK, do inglês *5' adenosine-monophosphate activated kinase*) iniciando assim o processo de lipofagia (Jordan e Randall, 2017). Os ácidos graxos são o principal substrato energético de hepatócitos humanos (linhagem Huh7) infectados pelo DENV (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). Nessas células, a inibição farmacológica da β -oxidação utilizando etomoxir, um inibidor irreversível da CPT-1, reduz significativamente a formação de partículas virais infecciosas.

A glicólise também é estimulada durante a infecção pelo DENV. A inibição dessa via é acompanhada da redução da síntese de RNA viral e da produção de partículas infecciosas (Fontaine *et al.*, 2015). Ainda não está claro o papel da glicose durante a infecção, mas nosso grupo demonstrou que ela desempenha um papel anaplerótico no uso de ácidos graxos. Em células hepáticas humanas, Huh7, a capacidade celular de metabolizar glicose é favorecida durante a infecção que, por sua vez, aumenta a capacidade de oxidação de ácidos graxos endógenos, os quais são a principal fonte energética dessas células como mencionado anteriormente (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018).

1.2.5. DENV e mitocôndrias

Alguns trabalhos vêm apontando modificações estruturais e funcionais nas mitocôndrias de células infectadas pelo DENV. Estudos conduzido em células Huh7 apontaram que ocorre o alongamento das mitocôndrias pela inibição da fissão durante a infecção pelo DENV. A proteína 1 relacionada à dinamina (DRP1, do inglês *dynamamin-related protein-1*), que é um fator de fissão mitocondrial é inativado, o que parece ser mediado por NS4B (Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Barbier *et al.*, 2017). Essa alteração na morfologia mitocondrial foi associada a uma maior capacidade oxidativa nas células infectadas (Barbier *et al.*, 2017).

Por outro lado, um estudo conduzido por nosso grupo em células hepáticas humanas, HepG2, mostrou que as mitocôndrias de células infectadas com DENV apresentavam inchaço se comparadas às das células não infectadas (El-Bacha *et al.*, 2007). Além disso, possuíam uma diminuição da capacidade respiratória mitocondrial associada à síntese de trifosfato de adenosina (ATP, do inglês *adenosine triphosphate*), um menor conteúdo de ATP e uma redução do potencial de membrana mitocondrial (El-Bacha *et al.*, 2007). Isso pode estar relacionado ao fato de que a protease viral NS2B/NS3 é capaz de clivar as mitofusinas 1 e 2 (MFN1 e MFN2) que medeiam a fusão mitocondrial, interrompendo, assim, o processo (Yu *et al.*, 2015). Nosso grupo também mostrou a inibição da respiração mitocondrial em células Huh7. O consumo basal de oxigênio foi reduzido, assim como a capacidade máxima respiratória das células infectadas pelo DENV (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). Efeitos diferentes foram observados dependendo do estudo realizado, mas a razão dessas diferenças ainda não é clara.

Curiosamente, recentemente foi demonstrado que NS3 é importada para a mitocôndria e cliva a co-chaperona mitocondrial GrpEL1 (Gandikota *et al.*, 2020). Ainda não está claro se esse evento poderia de alguma forma alterar a função mitocondrial.

1.3. Mitocôndrias

1.3.1. Estrutura mitocondrial

As mitocôndrias são organelas dinâmicas, cuja estrutura pode variar de acordo com o tecido, estado fisiológico e organismo (Zick, Rabl e Reichert, 2009; Glancy *et al.*, 2020). Elas

são compostas por duas membranas, a externa e a interna, que compartimentalizam o espaço intermembranar e a matriz mitocondrial. A membrana externa permite a passagem livre de solutos por proteínas que formam poros. Já a membrana interna é mais restrita, permitindo a passagem de íons e substratos energéticos de forma controlada, via proteínas transportadoras específicas (Vogel *et al.*, 2006). A membrana interna mitocondrial pode ainda ser subdividida morfológicamente em duas porções, a membrana limite interna, que fica mais próxima à membrana externa; e as cristas mitocondriais, que são invaginações lamelares no sentido da matriz mitocondrial. Essas duas porções são conectadas por junções estreitas tubulares semelhantes a anéis (Vogel *et al.*, 2006; Lee, 2020) (**Figura 8A**).

Os complexos proteicos que fazem parte da fosforilação oxidativa, promovendo a síntese de ATP, encontram-se preferencialmente localizados nas cristas mitocondriais (Gilkerson, Selker e Capaldi, 2003; Vogel *et al.*, 2006). A ATP sintase inclusive contribui com a formação da curvatura das cristas, já que seus dímeros formam fileiras que dobram a bicamada lipídica localmente (**Figura 8B**), enquanto os demais componentes do sistema transportador de elétrons (ETS, do inglês *electron transport system*) encontram-se preferencialmente nas regiões mais planas da crista (Davies *et al.*, 2011).

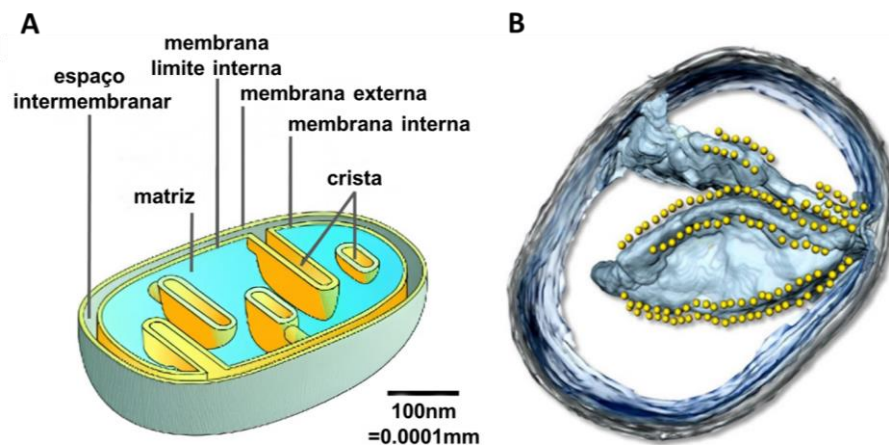


Figura 8. Estrutura mitocondrial. (A) Esquema ilustrativo da estrutura mitocondrial. (B) Superfície mitocondrial visualizada por tomografia crioelétrica, destacando duas cristas (azul) com os dímeros de ATP sintase em suas extremidades (amarelo). (Adaptado de Lee, 2020 - <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Além da ATP sintase outras proteínas contribuem para arquitetura das cristas. O complexo proteico MICOS (do inglês *mitochondrial contact site and cristae organizing system*) fica localizado na junção das cristas mitocondriais. Esse complexo é importante para formação e manutenção estrutural das cristas, na sua ausência as cristas podem assumir conformações aberrantes ou desfazem-se. Essas alterações além de afetar a capacidade respiratória mitocondrial, culminam na redução da proliferação e viabilidade celular (Eramo *et al.*, 2020). Outra proteína com destaque na manutenção das cristas é a proteína da atrofia óptica tipo 1 (OPA1, do inglês *optic atrophy type 1 protein*), acredita-se que OPA1 é necessária para manter as junções das cristas fechadas, restringindo assim a passagem de metabólitos e do citocromo c, que é uma proteína faz parte do ETS (Kondadi, Anand e Reichert, 2019).

O potencial de membrana mantido ao longo da membrana mitocondrial interna é a principal força motriz para o funcionamento da ATP sintase, ele é menor no interior das cristas do que na membrana limite interna, o que faz com que os prótons fiquem mais concentrados nas cristas (Song *et al.*, 2013). As cristas mitocondriais presentes em uma mesma mitocôndria podem ter potenciais de membrana distintos funcionando como unidades bioenergéticas independentes. Quando uma despolarização é induzida, algumas cristas podem ser afetadas enquanto outras não, o que evitaria uma disfunção mitocondrial (Wolf *et al.*, 2019).

1.3.2. Bioenergética mitocondrial

As mitocôndrias são componentes centrais do metabolismo. O catabolismo de diferentes substratos energéticos gera moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida (NADH) e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) para o ETS (Da Poian e Castanho, 2021).

A produção de ATP via fosforilação oxidativa envolve a redução de oxigênio à água, com elétrons doados por NADH e FADH₂. O complexo I (NADH/ubiquinona oxidoreductase) oxida NADH a NAD⁺. O complexo II (succinato desidrogenase) oxida FADH₂ a FAD. Os elétrons de NADH e FADH₂ são transferidos para ubiquinona. Ela se difunde livremente dentro da membrana mitocondrial interna e entrega os elétrons ao complexo III (ubiquinona:citocromo c oxidorreductase). A transferência de elétrons entre os complexos III e IV (citocromo c oxidase) é mediada pelo citocromo c. No complexo IV os elétrons encontram seu aceptor final, o oxigênio, que é reduzido formando H₂O. A transferência de elétrons pelos complexos I, III e

IV é acoplada ao bombeamento de prótons para o espaço intermembranar, que retornam a matriz pela atividade do complexo V (ATP sintase), gerando ATP a partir de ADP e fosfato inorgânico (Papa *et al.*, 2011; Andrieux *et al.*, 2021) (**Figura 9**).

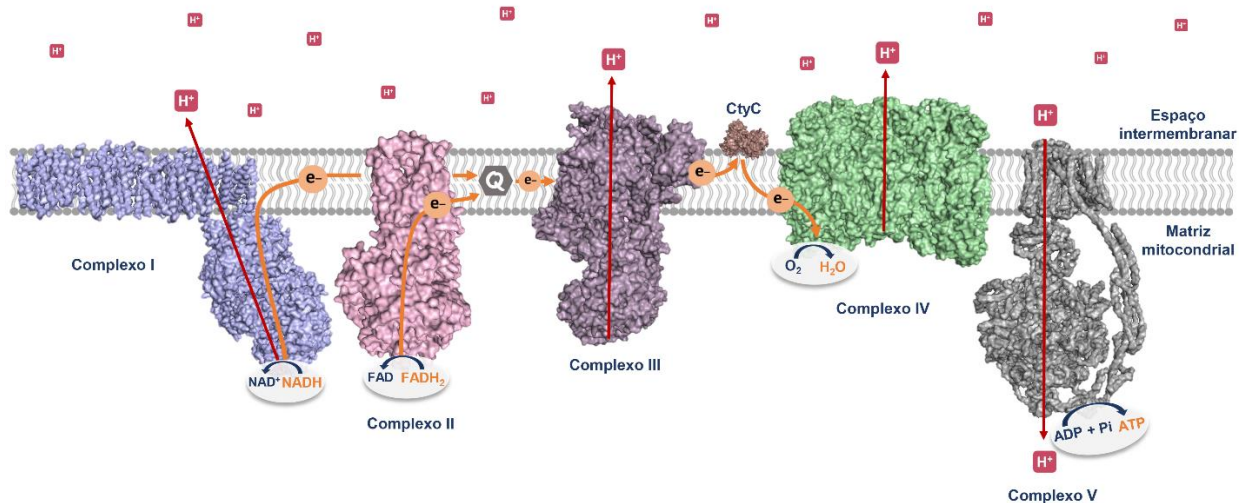


Figura 9. Esquema ilustrativo da fosforilação oxidativa. NADH e FADH₂ são oxidados transferindo elétrons (e⁻) via ETS até seu aceptor final, o oxigênio. O transporte de elétrons é acompanhado pelo bombeamento de prótons (H⁺) para o espaço intermembranar. Os complexos I, III e IV bombeiam em conjunto dez prótons, que posteriormente geram a força motriz para produção de ATP. Q: ubiquinona. CtyC: citocromo c. A ilustração não está em escala. As estruturas dos complexos foram geradas com PyMOL usando os PDB IDs: 3M9S, 3AEF, 1NTM, 3ZCF, 2Y69 e 5ARE.

Os elétrons carregados por NADH e FADH₂ vêm da oxidação de diferentes nutrientes através de vias metabólicas específicas, que convergem na formação acetil-coenzima A (acetil-CoA). O metabolismo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos converge para a formação de acetil-CoA, que é direcionada para o ciclo de Krebs. No ciclo, acetil-CoA e oxaloacetato dão origem ao citrato, que por sua vez é convertido a isocitrato. O isocitrato é convertido em α -cetoglutarato, e durante essa reação NAD⁺ é reduzido formando NADH. Posteriormente, há a formação de succinil-CoA acoplada à produção de mais uma molécula de NADH. Dando continuidade ao ciclo, o succinil-CoA dá origem ao succinato. A oxidação do succinato gera fumarato e é acompanhada da redução de FAD a FADH₂. O fumarato é convertido em malato. Em seguida, o malato é convertido em oxaloacetato e mais uma molécula de NADH é produzida nessa etapa (Martínez-Reyes e Chandel, 2020) (**Figura 10**).

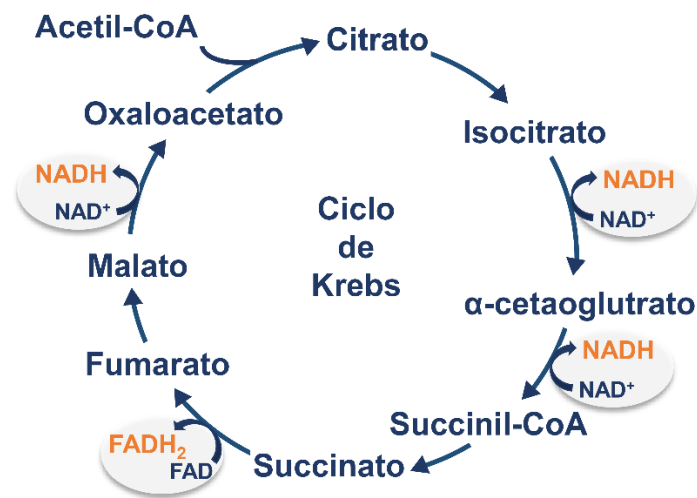


Figura 10. Esquema ilustrativo do ciclo de Krebs. A conversão de isocitrato a α -cetogluturato, α -cetogluturato a succinil-CoA e malato a oxalacetato gera NADH, que pode ser oxidado pelo complexo I da ETS. A oxidação do succinato pelo complexo II gera FADH₂ e fumarato. Posteriormente o FADH₂ pode ser oxidado no próprio complexo II.

A β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, além de gerar acetil-CoA para o ciclo de Krebs, gera NADH, que é oxidado pelo complexo I, e FADH₂, cujos elétrons são entregues à ubiquinona via flavoproteína de transferência de elétrons:ubiquinona oxidoreductase (ETF:QO, do inglês *electron transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase*). A atividade da ETF:QO ocorre em conjunto com a da flavoproteína de transferência de elétrons (ETF, do inglês *electron transfer flavoprotein*), que recebe elétrons de acil-CoA desidrogenases mitocondriais e os transfere para ETF:QO (Watmough e Frerman, 2010).

É interessante destacar que os complexos do ETS são estruturas dinâmicas que podem se associar formando uma variedade de estruturas supramoleculares, os supercomplexos (Cogliati, Cabrera-Alarcón e Enriquez, 2021). Estes mantêm a estabilidade dos complexos e ajudam a organizar o fluxo de elétrons, melhorando a eficiência das conversões de energia e reduzindo a produção de espécies reativas de oxigênio. Os complexos I, III e IV podem formar supercomplexos (SC, **Figura 11**). Dois tipos de SC, conhecidos como respirassomas, foram descritos, o NADH-respirassoma (SC I + III₂ + IV₁₋₂), e o CoQ-respirassoma (SC III₂ + IV e SC III₂ + IV₂). Alguns SC podem ter duas unidades do complexo III e um número variável de unidades do complexo IV (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Lapuente-Brun *et al.*, 2013; Novack *et al.*, 2020; Cogliati, Cabrera-Alarcón e Enriquez, 2021). Até o presente momento, o complexo II

parece não formar supercomplexos em mamíferos, mas recentemente foi descrita a formação de um supercomplexo contendo CI, II, III e IV em ciliados (Mühleip *et al.*, 2023).

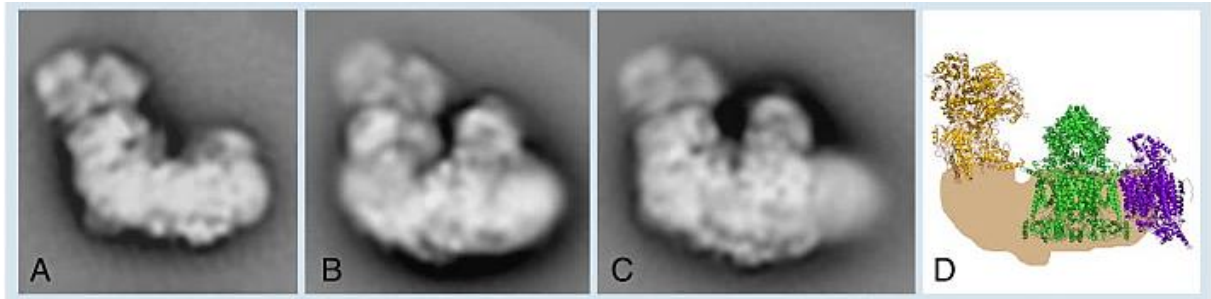


Figura 11. Exemplo de supercomplexo. Crio-microscopia eletrônica de um supercomplexo. (A) Complexo I. (B) Supercomplexo formado pelos complexos I + III₂. (C) Supercomplexo formado pelos complexos I + III₂ + IV. (D) Posição dos complexos individuais dentro do supercomplexo. O domínio hidrofílico do complexo I é mostrado em amarelo, o dímero do complexo III é mostrado em verde e o complexo IV é mostrado em roxo (Dudkina *et al.*, 2010).

Além de contribuir para estabilidade dos complexos e auxiliar na organização do fluxo de elétrons, os SC otimizam o uso dos substratos energéticos disponíveis. Os SC podem ter um *pool* exclusivo de ubiquinona e de citocromo c dedicado a receber elétrons provenientes do NADH, que fica retido no SC, enquanto outro *pool* de ubiquinona e citocromo c é destinado a receber elétrons de enzimas associadas a FAD; esse pool fica mais livre na membrana mitocondrial interna. O complexo IV também pode formar *pools* distintos, um deles recebe elétrons doados exclusivamente pelo NADH, outro é exclusivo para elétrons carregados pelo FADH₂, e um terceiro pool pode receber elétrons de ambos. Dessa forma, o uso de substratos é otimizado, pois diferentes substratos podem ser oxidados de forma simultânea (Lapiente-Brun *et al.*, 2013).

2. JUSTIFICATIVA

A dengue é uma das doenças transmitidas por mosquitos a seres humanos mais impactantes mundialmente em termos de saúde pública. É responsável por um número significativo de casos e mortes todos os anos e atualmente não possui um tratamento específico.

Evidências clínicas e experimentais apontam o fígado como alvo na infecção pelo DENV. Dados de estudos clínicos realizados post-mortem em pacientes infectados revelaram alterações hepáticas como hepatomegalia com focos hemorrágicos, necrose médio-sazonal (Leong *et al.*, 2007), assim como esteatose macro e microvesicular (Basílio-De-Oliveira *et al.*, 2005). Eventos de falência hepática aguda já foram descritos por diversos autores (Poovorawan *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2008; Arora *et al.*, 2015; Kumarasena *et al.*, 2016). Nesse contexto, torna-se relevante ter o fígado como modelo de estudo. Alguns trabalhos com modelos hepáticos *in vitro* têm apontado alterações metabólicas induzidas durante a infecção pelo DENV (Samsa *et al.*, 2009; Heaton *et al.*, 2010; Heaton e Randall, 2010; Fontaine *et al.*, 2015; Jordan e Randall, 2017), incluindo nossa observação prévia que a bioenergética mitocondrial é alterada durante a infecção de linhagem celular derivada de hepatocarcinoma humano (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018).

Recentemente foi descrito que a proteína não estrutural 3, NS3, do DENV pode ser importada para matriz de mitocôndrias isoladas (Gandikota *et al.*, 2020). NS3 é uma proteína multifuncional altamente conservada entre os flavivírus (Papageorgiou *et al.*, 2016). Ela é necessária para processamento da poliproteína viral e para posterior replicação do genoma do DENV (Meng *et al.*, 2015), sendo um importante alvo na pesquisa de antivirais (Luo *et al.*, 2015).

Apesar do crescente número de estudos que abordam a infecção por DENV e o metabolismo energético celular, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais o DENV é capaz de modular o metabolismo, e não há estudos mais aprofundados avaliando o papel de NS3 nesse contexto. Dessa forma, analisar a relação de NS3 com a mitocôndria representa um passo importante na compreensão dessas alterações.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Este trabalho tem por objetivo avaliar o possível papel das proteínas do DENV na modulação metabólica das mitocôndrias.

3.2. Objetivos Específicos

- Identificar proteínas virais associadas a mitocôndrias isoladas de células da linhagem de hepatocarcinoma humano Huh7 infectadas pelo DENV, bem como possíveis alterações de expressão proteica induzidas pela infecção, através da técnica de proteômica;
- Implementar um sistema para expressão heteróloga de NS3 em células humanas para avaliar diretamente o efeito desta proteína no metabolismo mitocondrial dessas células;
- Expressar e purificar as proteínas recombinantes NS3pro (domínio protease), NS3proS135A (domínio protease inativo) e NS3 inteira (NS3prohel) por cromatografia de afinidade a metal imobilizado;
- Avaliar as alterações na função mitocondrial (consumo de oxigênio frente a diferentes substratos, capacidade de formação de potencial de membrana, atividade de complexos do ETS etc.) induzidas pela incubação das formas de NS3 recombinantes em mitocôndrias isoladas de fígado.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Estabelecimento dos modelos de estudo *in vitro*

Células Huh7 (linhagem derivada de hepatocarcinoma humano), HEK293T (linhagem derivada de células epiteliais embrionárias humanas renais) e A549 (linhagem derivada de carcinoma epitelial pulmonar humano) foram cultivadas em DMEM (Gibco, Massachusetts, EUA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Gibco), penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL, HEPES 2 g/L e NaHCO₃ 2,2 g/L, e mantidas em câmara de incubação úmida de CO₂, a 37°C.

4.1.1 Infecção

Células Huh7 e A549 foram infectadas com DENV sorotipo 2 (cepa 16681) usando uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1, e incubadas em DMEM sem adição de FBS, por 1h, em câmara de incubação úmida de CO₂, a 37°C. Após este período de adsorção do vírus, o meio de cultura foi substituído por DMEM suplementado com 10% de SFB, penicilina 100 U/mL, estreptomicina 100 µg/mL e as células foram mantidas em cultura por 24h. Como controle, as células foram submetidas à infecção simulada (mock) através da incubação com meio de cultura retirado de uma cultura de células de mosquito C6/36 mantidas sob as mesmas condições que as células infectadas durante a propagação viral, mas na ausência de vírus.

4.1.2. Plasmídeos

Todos os plasmídeos utilizados nas transfecções estão descritos a seguir (**Tabela 1**). Para amplificação desses plasmídeos, bactérias DH5α competentes para transformação foram incubadas com o DNA plasmidial (50 ng) em 50 µL de meio de cultura Luria-Bertani (LB), por 30 min, no gelo, seguindo-se um choque térmico a 42°C por 40 s, e novamente incubação no gelo. As bactérias foram mantidas em 1 mL de LB por 1h a 37°C, centrifugadas a 4000 rpm por 4 min em temperatura ambiente e ressuspensas em 100 µL de meio. Em seguida, foram plaqueadas em placas de 100 mm com meio LB ágar suplementado com ampicilina 100 µg/mL e mantidas a 37°C por 18h. A ampicilina é utilizada como antibiótico de seleção onde as bactérias resistentes são mais propensas a possuírem o plasmídeo utilizado na transformação. Uma colônia foi retirada da placa e transferida para 250 mL de LB com ampicilina 100 µg/mL

e colocada sob agitação em incubadora a 37°C sob por 18h. Os plasmídeos foram purificados com o kit PureYield™ Plasmid Maxiprep System (Promega, Wisconsin, EUA).

Tabela 1 – Plasmídeos utilizados nas transfecções.

Plasmídeo	Descrição	Fornecedor
pBABEpuro-NS3	Vetor retroviral para células de mamífero, expressa NS3 (resíduos 1-618). Possui resistência à ampicilina e puromicina.	Genscript, Nova Jersey, EUA.
pCW57.1	Vetor lentiviral induzível para células de mamíferos, vetor vazio. Possui resistência à ampicilina e puromicina.	Addgene, Massachusetts, EUA.
pCW57.1_NS3	Vetor lentiviral induzível para células de mamíferos, expressa NS3 (resíduos 1-618). Possui resistência à ampicilina e puromicina.	Clonagem <i>in house</i> .
pVSV-G	Vetor lentiviral de envelope para células de mamífero, expressa a glicoproteína de envelope do vírus da estomatite vesicular (VSV). Possui resistência à ampicilina.	Addgene, Massachusetts, EUA.
psPAX2	Vetor lentiviral de empacotamento para células de mamífero, expressa a proteína do capsídeo, a polimerase e a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana 1 (HIV-1). Possui resistência à ampicilina.	Addgene, Massachusetts, EUA.
pcDNA3.1_NS3	Vetor de expressão para células de mamífero, expressa NS3 (resíduos 1-618). Possui resistência à ampicilina.	Biomatik, Ontario, Canadá.
pcDNA3.1_∅	Vetor de expressão para células de mamífero, vetor vazio. Possui resistência à ampicilina.	Retirada do inserto e recircularização do plasmídeo <i>in house</i> .

4.1.3. Expressão de NS3 através de transdução com vetor lentiviral induzível

Inicialmente, o gene NS3 (codifica os resíduos 1-618 de NS3) foi amplificado do plasmídeo doador pBaBepuro-NS3 utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific, Massachusetts, EUA). Paralelamente, o plasmídeo receptor, pCW57.1, foi digerido com as enzimas de restrição NheI e SalI FastDigest (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. A ligação do inserto ao plasmídeo receptor foi realizada com o kit Gibson Assembly Cloning (New England Biolabs, Massachusetts, EUA), gerando o plasmídeo pCW57.1_NS3. Este plasmídeo foi posteriormente enviado para sequenciamento na Plataforma de Sequenciamento de DNA (PSEQDNA-UFRJ) do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ, confirmando assim sua sequência.

O plasmídeo pCW57.1 é um vetor lentiviral Tet-On (ativação transcricional controlada por tetraciclina), que permite a expressão do gene de interesse pela adição de doxiciclina (DOX, análogo da tetraciclina) à cultura. Os vetores lentivirais integram-se ativamente no DNA genômico sem a necessidade de replicação celular, uma vez que ocorre transcrição reversa do RNA do vetor, formando uma cópia de DNA dupla fita que é integrada ao DNA da célula hospedeira (Dufait *et al.*, 2012).

Células HEK293T foram transfectadas com três plasmídeos: o vetor de transferência, que contém o gene de interesse (pCW57.1_NS3), o vetor de envelope (pVSV-G) e o vetor de empacotamento (psPAX2) utilizando Lipofectamina 3000 (Invitrogen, Massachusetts, EUA). As partículas virais geradas com o uso desses vetores são pseudotipadas, pois a glicoproteína do envelope usada é de um vírus diferente do das demais proteínas. Nesse caso, a glicoproteína de envelope pertence ao VSV, enquanto a proteína do capsídeo, a polimerase, e a transcriptase reversa pertencem ao HIV-1. Cabe ressaltar que essas partículas não são infecciosas. O sobrenadante das células transfectadas, contendo partículas lentivirais pseudotipadas, foi coletado 24, 48 e 72h pós-transfecção, centrifugado a 1.200 rpm por 5 min a fim de remover debris celulares, filtrado em filtro de 0,45 µm, e diluído 1:2 em meio fresco suplementado com polibreno 10 µg/mL (Sigma-Aldrich, Missouri, EUA). Essas partículas foram utilizadas na transdução da célula-alvo, A549 (linhagem derivada de carcinoma epitelial pulmonar humano). Essa linhagem celular foi escolhida por se tratar de um modelo de estudo utilizado em publicações científicas com DENV. Após a transdução, as células foram selecionadas com puromicina 1µg/mL (Sigma-Aldrich) até a morte das células de controle A549 progenitoras, a fim de estabelecer uma sublinhagem estável com expressão heteróloga de NS3. O mesmo processo foi realizado com o vetor vazio gerando a sublinhagem controle A549-Ø. Terminada a seleção, diferentes concentrações de DOX (Sigma-Aldrich) foram adicionadas à cultura para induzir a expressão de NS3 (**Figura 12**).

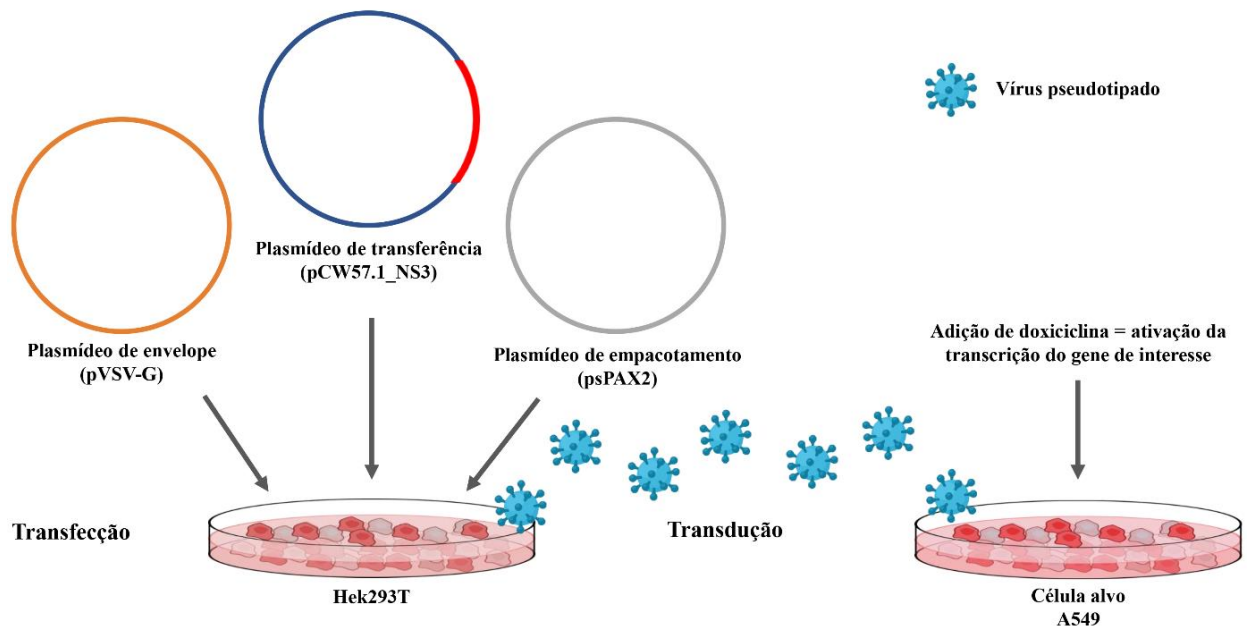


Figura 12. Esquema ilustrativo do sistema de transdução com vetor lentiviral induzível. Células HEK293T foram transfectadas com três plasmídeos: o vetor de transferência (pCW57.1, vetor lentiviral Tet-On), que contém o gene de interesse NS3, o vetor de envelope (pVSV-G) e o vetor de empacotamento (psPAX2) que possibilitam a formação de partículas lentivirais pseudotipadas. As células A549 foram transduzidas com essas partículas e selecionadas com puomicina. Após a seleção, a expressão de NS3 pode ser induzida com doxiciclina (DOX).

4.1.4. Expressão de NS3 através de transfecção

Células HEK293T foram transfectadas com o vetor pcDNA3.1_NS3 contendo a sequência codificante dos resíduos de 1 a 618 de NS3, usando-se PEI MAX 40K (Polysciences, Warrington, EUA) em uma proporção de 3:1 de PEI para DNA. Os complexos PEI:DNA foram preparados em Opti-MEM (Gibco) com 0,5 µg de DNA plasmidial por cm² de área de superfície de cultivo, incubados por 20 min em temperatura ambiente e adicionados à cultura celular. Após 12h, o meio de cultura foi trocado por meio fresco. Como controle, utilizamos o vetor vazio pcDNA3.1_∅, que foi gerado retirando o inserto (NS3) com as enzimas de restrição NheI e EcoRI FastDigest (Thermo Scientific) e recircularizado com a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Scientific).

4.2. Avaliação da expressão de NS3 por imunofluorescência

Células transduzidas, infectadas ou transfectadas, cultivadas sobre lamínulas em placas de 6 poços (1x10⁶ células por poço), foram utilizadas nos ensaios de imunofluorescência. As lamínulas foram retiradas das placas e fixadas com solução de formaldeído 4% em PBS, por 15

min, em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas com PBS, permeabilizadas com Triton X-100 0.1% por 7 min e incubadas com solução de bloqueio (PBS com BSA 1%) por 1h. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpo primário anti-NS3 (GeneTex) na diluição 1:1000, e anticorpo secundário anti-rabbit alexa fluor 488 ou anti-rabbit alexa fluor 594 (Life Technologies, Califórnia, EUA) na diluição 1:800. Todos os anticorpos foram diluídos em tampão de bloqueio e incubados por 1h. Após as incubações foram realizadas três lavagens com PBS. As células foram marcadas com DAPI (Invitrogen) por 10 min. Em seguida foram analisadas por microscopia óptica de fluorescência utilizando o microscópio Olympus IX81 e o programa CellSens Standard (Olympus, Tóquio, Japão).

4.3. Detecção de NS3 por western blotting

Células HEK293T após diferentes tempos de transfecção com pcDNA3.1_NS3 foram lisadas com o tampão de lise A (HEPES 20 mM, NaCl 150 mM, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM, glicerol 10% e Triton X-100 1%) contendo coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich). As proteínas presentes no extrato celular foram separadas em por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 15%, e transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Califórnia, EUA). A membrana foi bloqueada por 1h por incubação em TBS-T com leite desnatado 5%. Em seguida ela foi submetida à ligação com anticorpo primário anti-NS3 (GeneTex, Califórnia, EUA) na diluição 1:4.000 por 1h e ao anticorpo secundário anti-rabbit IRDye[®]800CW (LI-COR Biosciences, Nebraska, EUA) na diluição 1:25.000 por 1h. Após a incubação com cada um dos anticorpos mencionados, a membrana foi lavada três vezes com TBS-T por 10 min. Para o controle de carregamento, a membrana também foi incubada com anticorpo anti-GAPDH (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) na diluição 1:10.000 por 1h e anticorpo secundário anti-mouse IRDye[®]800CW (LI-COR Biosciences) na diluição 1:15.000 por 1h. A membrana foi lavada após as incubações como descrito anteriormente. A expressão proteica de NS3 em cada amostra foi analisada utilizando-se o leitor Licor Odyssey Scanner (LI-COR Biosciences). A intensidade das bandas foi quantificada usando-se o programa ImageJ/Fiji (Rasband, 1997-2018) e normalizada pela intensidade das bandas de GAPDH.

4.4. Determinação da viabilidade celular por ensaio de MTT

Células HEK293T foram semeadas em placas de 24 poços (7×10^4 células por poço), transfectadas com pcDNA3.1_NS3 ou pcDNA3.1_ø e após diferentes tempos de transfecção incubadas com uma solução de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) 0,5 mg/mL (USB, Ohio, EUA) em DMEM (Gibco). O ensaio se baseia no fato de que o MTT é reduzido em células viáveis, formando cristais de formazan, cuja solubilização permite a análise por espectrofotometria. Após 2h de incubação, a solução de MTT foi descartada e os cristais de formazan foram solubilizados em 200 µL de DMSO. A absorbância das amostras foi analisada em 570 nm no leitor SpectraMax M5 (Molecular Devices, Califórnia, EUA).

4.5. Proteômica de mitocôndrias isoladas

Para o isolamento de mitocôndrias, células Huh7 foram plaqueadas em garrafas de 150cm^2 (2×10^7 células), infectadas com DENV ou submetidas à infecção simulada (mock). Após 24h, as células foram coletadas e lisadas com um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem (Sigma-Aldrich). O lisado celular foi centrifugado a 700 xg (rotor Eppendorf® F-34-6-38), 10 min, a 4°C, a fim de remover os debris celulares. O sobrenadante foi coletado e posteriormente centrifugado a 15.000g, 10 min, a 4°C, para precipitar a fração enriquecida de mitocôndrias.

Para o isolamento das mitocôndrias, padronizamos um método usando gradiente de sacarose baseado em um protocolo bem estabelecido (Bozidis *et al.*, 2007). Resumidamente, reduzimos a velocidade de rotação, e compensamos esta alteração com um aumento no tempo de centrifugação. A fração enriquecida de mitocôndrias foi depositada sobre um gradiente descontínuo de sacarose de 1,7 M sob 1,0 M, e centrifugada a 17.000 xg por 80 min a 4°C. Após a centrifugação, uma banda correspondente as mitocôndrias forma-se entre as camadas de sacarose, essa foi coletada e centrifugada a 15.000 xg por 10 min a 4°C, e o pellet de mitocôndrias resultante foi armazenado a -80°C até o processamento das amostras.

Para realizar a extração de proteínas das amostras, os pellets foram incubados em uma solução de NH_4HCO_3 0,05 M contendo RapiGest SF Surfactant 0,2% (Waters, Massachusetts, EUA) por 12h a 37°C sob agitação (200 rpm). Após a incubação, as amostras foram submetidas a sonicação em banho por 30 min, seguido de centrifugação a 12.000 rpm por 1 min em

temperatura ambiente. Prontamente, as amostras foram filtradas e dessalinizadas utilizando um filtro Centriprep de 3 kDa (Merck Millipore). Elas passaram por três centrifugações por 30 min a 10°C com 500 µl de NH_4HCO_3 . Ao final das lavagens, o volume de amostra remanescente no filtro foi coletado (~250 µL), concentrado e seco à vácuo usando um sistema SpeedVac (Thermo Scientific). Posteriormente, cada amostra foi ressuspensa em uma solução de NH_4HCO_3 0,05 M com RapiGest SF Surfactant 0,2% e digerida com tripsina seguindo as instruções do fabricante.

Os peptídeos trípticos, em triplicata, foram carregados em um sistema nanoACQUITY (Waters). No total, 9 µl das amostras foram injetados (3 µl de cada vez) e dessalinizados online usando uma coluna coletora Symmetry C18 (Waters). Em sequência, uma etapa de cromatografia líquida foi realizada usando uma coluna HSS T3 (Waters) com um fluxo de fase móvel de 0,5 µL/min e um gradiente linear de 3-40% de acetonitrila com ácido fórmico 0,1%, em um tempo de execução de 210 min. Após a ionização da amostra por eletrospray (ESI) a 3000 V, 80°C, e voltagem do cone 35 V, os espectros de massa foram registrados usando o espectrômetro de massas de alta definição Waters Synapt™ G1 HD/MS (Waters, Manchester, Reino Unido), em interface com a cromatografia capilar do sistema nanoACQUITY. O controle do instrumento e a aquisição de dados foram conduzidos em um sistema de dados MassLynx (Versão 4.1, Waters), e os experimentos foram realizados por varredura de uma razão massa-carga (m/z) de 50-2000 usando um tempo de varredura de 1,0 s. A aquisição com o método MSe (Waters) foi realizada com energia de colisão alternando entre 6 V em baixa energia e aumentada de 12-40 V em alta energia, usando argônio como gás de colisão a uma pressão de 1 bar.

Todos os dados foram processados usando o software Progenesis QI para proteômica versão 2.0 (Nonlinear Dynamics, Waters, Manchester, Reino Unido). As massas exatas foram determinadas usando o Q-ToF's LockSpray™ do íon de referência Glu-fibrinopeptídeo, GFP (785,8426 m/z). Os dados brutos foram pesquisados com o software Progenesis QI contra o banco de dados de humanos do UniProt, inserido de sequências da cepa de DENV 16681. A carbamidometilação da cisteína foi definida como modificação fixa; a oxidação da metionina foi definida como modificação variável; e a tolerância a proteínas e peptídeos foi definida como 20 ppm e 10 ppm, respectivamente, com os seguintes requisitos de íons: dois fragmentos de peptídeo, cinco fragmentos de proteína e um peptídeo. Uma taxa de falsas descobertas foi definida como inferior a 1% e todas as proteínas quantificadas com um valor p inferior a 0,05

por ANOVA foram consideradas como uma identificação confiável para análise de abundância normalizada relativa.

4.6. Expressão e purificação de NS3 recombinante

Bactérias *Escherichia coli* BL21 (DE3) foram transformadas com plasmídeos pET32a(+)_NS3pro (Biomatik, Ontario, Canadá) contendo os resíduos 1 a 180 correspondentes ao domínio protease de NS3; ou pET32a(+)_NS3proS135A (Biomatik), que possui uma substituição da serina 135 da tríade catalítica por uma alanina tornando a protease inativa; ou pET32a(+)_NS3prohel (Biomatik) contendo os resíduos 1 a 618 correspondentes à NS3 inteira, todas elas fusionadas com uma cauda de histidina para permitir a purificação por cromatografia de afinidade. Esses plasmídeos de expressão bacteriana conferem resistência à ampicilina às bactérias, dessa forma elas foram cultivadas em 1 L de meio mínimo M9 contendo 100 µg/mL de ampicilina. A expressão das proteínas foi induzida com a adição de IPTG 0,6 mM quando a densidade óptica atingiu 0,6-0,7 a 600 nm. Após 18h de indução a 18°C, as células foram precipitadas por centrifugação e ressuspendidas em 40 mL de tampão A (Tris-HCl 50 mM [pH 8], NaCl 500 mM, imidazol 20 mM, glicerol 10%). As células foram lisadas por sonicação, seguindo-se centrifugação a 12.000 xg (rotor Eppendorf® F-34-6-38), 4°C, por 60 min. O sobrenadante contendo as proteínas expressas foi coletado, filtrado usando um filtro de 0,22 µm, aplicado na coluna HisTrap FF (GE Healthcare Life Sciences, Nova Jersey, EUA) para cromatografia de afinidade a metal imobilizado (IMAC), utilizando o tampão A para o equilíbrio e o tampão B (Tris-HCl 50 mM [pH 8], NaCl 500 mM, imidazol 500 mM, glicerol 10%) para eluição. As proteínas recombinantes aderidas à coluna foram eluídas com um gradiente linear de imidazol de 20-500 mM. NS3prohel passou por uma etapa adicional de gel filtração utilizando uma coluna com resina Sephacryl S-100 (Cytiva, Massachusetts, EUA). Posteriormente os eluatos contendo as proteínas recombinantes foram concentrados em sistema Amicon Ultra-4 3K (Merck Millipore), e dialisados com tampão C (Tris 50 mM [pH 8], NaCl 150 mM e glicerol 5%), e posteriormente com tampão D (Tris 50 mM [pH 8], glicerol 5% e etilenoglicol 5%). As amostras foram então armazenadas a -80°C e sua pureza confirmada por SDS-PAGE 15% (**Figura 13**).

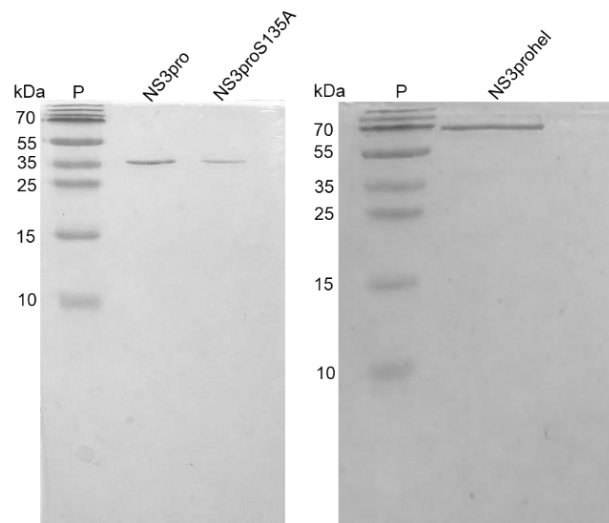


Figura 13. SDS-PAGE das proteínas recombinantes purificadas. O primeiro gel mostra as proteínas NS3pro e NS3proS135A recombinantes. O segundo gel mostra a proteína NS3prohel recombinante. P – Padrão de peso molecular.

4.7. Isolamento de mitocôndrias de fígado de camundongos

Camundongos machos da linhagem C57BL/6 de 12-20 semanas foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, o fígado desses animais foi rapidamente coletado para realizar isolamento de mitocôndrias. Os experimentos realizados com as mitocôndrias isoladas estão descritos a seguir e foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) em Experimentação Científica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro (protocolo n° 046/22).

O isolamento de mitocôndrias do fígado de camundongos foi realizado utilizando o método descrito por Frezza, Cipolat e Scorrano (2007), com pequenas adaptações. Brevemente, o fígado coletado e as células do tecido hepático foram rompidas em tampão de isolamento (Tris/MOPs 0,1 M [pH 7,4], EGTA/Tris 0,1 M [pH7,4], sacarose 1 M) utilizando-se um homogeneizador do tipo Potter-Elvehjem no gelo. O homogenato foi submetido a uma centrifugação inicial para remover os debris celulares a 700 xg (rotor Eppendorf® F-34-6-38), a 4°C, por 10 min, e o sobrenadante foi coletado. Esse foi centrifugado a 7.000 xg, a 4°C, por 10 min, formando um pellet contendo as mitocôndrias. O pellet foi lavado em tampão de isolamento gelado e centrifugado a 8.500 xg, a 4°C, por 10 min. As mitocôndrias isoladas foram então mantidas no gelo até o uso, e a concentração de proteínas das amostras foi avaliada pelo método de Bradford.

4.8. Ensaios de respirometria de alta resolução

As taxas de consumo de oxigênio mitocondrial, OCR (do inglês *oxygen consumption rate*), foram avaliadas por respirometria de alta resolução utilizando o sistema Oxygraph-2k (Oroboros Instruments, Innsbruck, Áustria) e o software DatLab 7.4.0.4 (Oroboros Instruments). Todos os experimentos foram conduzidos a 37°C, sob uma taxa de agitação de 750 rpm e 2 mL de volume final por câmara.

4.8.1. Ensaios com mitocôndrias isoladas de fígado de camundongo

Incubamos 300 µg de mitocôndrias isoladas com NS3pro, NS3proS135A, NS3prohel ou, como controle, com o tampão no qual as proteínas recombinantes foram diluídas (Tris 50 mM [pH 8], glicerol 5% e etilenoglicol 5%), em MIR05, suplementado com ATP 2 mM e succinato 10 mM, por 1h, no gelo. As respirometrias foram realizadas com 50 µg de amostra por câmara.

Para avaliação do efeito de concentrações crescentes das proteínas recombinantes sobre a respiração mitocondrial, conduzimos a respirometria adicionando conjuntamente três substratos respiratórios – malato 5 mM, piruvato 10 mM, succinato 10 mM – seguindo-se a adição sequencial de ADP 2,5 mM, rotenona 0,25 µM e antimicina A 0,5 mM. O OCR foi avaliado em diferentes condições.

Nos ensaios de respirometria alguns estados respiratórios são definidos. O estado respiratório 1 é o OCR sem a adição de substratos energéticos. O estado respiratório 2 representa o fornecimento dos substratos malato, piruvato e succinato às mitocôndrias, na ausência de ADP (respiração não associada à síntese de ATP). O estado 3 é obtido após a adição de ADP e representa a respiração acoplada à síntese de ATP. Por fim, temos o consumo residual de oxigênio, que é obtido na presença de rotenona e antimicina A (inibidores dos complexos I e III, respectivamente), que representa reações oxidativas que ainda ocorrem após a inibição do ETS e é descontado dos demais parâmetros. Calculamos então a respiração acoplada à síntese de ATP subtraindo a estado respiratório 2 do 3; a respiração *leak*, que aqui representa um estado de repouso não fosforilante quando os substratos são reduzidos, mas o ADP não é fornecido

(vazamento de prótons sem adenilatos); e a taxa de controle respiratório, RCR (do inglês *respiratory control rate*), que representa a razão entre a respiração acoplada e a respiração *leak*.

Ensaios de respirometria de alta resolução e o posterior cálculo do RCR também foram realizados com a adição de diferentes substratos de forma independente, com as sequências de adições descritas a seguir.

- Ensaios com malato e piruvato: malato 5 mM, piruvato 10 mM, ADP 2,5 mM, citocromo c 1 μ M e rotenona 0,25 μ M.

- Ensaios com succinato: malato 5 mM, rotenona 0,25 μ M, succinato 10 mM, ADP 2,5 mM, citocromo c 1 μ M e malonato 25 mM.

- Ensaios com palmitoil-carnitina: malato 2 mM, palmitoil-carnitina 20 μ M, ADP 2,5 mM, citocromo c 1 μ M e antimicina A 0,5 mM.

- Ensaios com ascorbato e TMPD: ascorbato 1 mM, TMPD 1 mM, citocromo c 1 μ M e KCN 1,5 mM.

4.8.2. Ensaios com células intactas ou permeabilizadas

Nos experimentos com células HEK293T intactas, as células foram transfectadas com pcDNA3.1_NS3 ou pcDNA3.1_ \emptyset , e após 24h de transfecção, 2×10^6 células foram suspensas em DMEM sem SFB e colocadas nas câmaras. Em seguida, o consumo de oxigênio foi avaliado, seguindo-se adições sequenciais de oligomicina 0,25 nM, FCCP titulado de 0,05 a 0,9 μ M, rotenona 0,25 μ M e antimicina A 0,5 mM. O OCR foi avaliado em diferentes condições definidas como:

- “Basal”: corresponde ao OCR após sua estabilização;
- “Acoplada”: corresponde ao OCR associado à síntese de ATP, é calculado subtraindo a respiração após a adição de oligomicina (“*leak*”) da basal;
- “*Leak*”: aqui corresponde ao OCR medido na presença de oligomicina, um inibidor da ATP sintase, que impede que os prótons retornem à matriz mitocondrial, de forma que o OCR reflete o vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e corresponde à respiração desacoplada da síntese de ATP;
- “Máxima”: que corresponde ao OCR medido na presença de FCCP, um ionóforo que desfaz o gradiente de prótons levando a que os complexos mitocondriais trabalhem em sua capacidade máxima de transporte de elétrons.

Rotenona e antimicina A foram adicionadas para determinar a taxa de consumo residual de oxigênio que é subtraída das demais.

Para avaliar a respiração em células permeabilizadas, 2×10^6 células HEK293T transfectadas por 24h foram suspensas em MIR05, adicionadas a cada câmara, e permeabilizadas com digitonina na concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$. O consumo de oxigênio foi avaliado com a utilização dos seguintes substratos e inibidores adicionados de forma sequencial: malato 5 mM, piruvato 10 mM, ADP 2,5 mM, rotenona 0,25 μM , succinato 10 mM e malonato 25 mM. O OCR associado ao complexo I foi calculado subtraindo o consumo de oxigênio na presença de rotenona (inibidor do complexo I) do consumo na presença dos substratos malato, piruvato e ADP. O OCR associado ao complexo II foi calculado subtraindo o consumo de oxigênio na presença de malonato (inibidor do complexo II) do consumo na presença do substrato succinato.

4.9. Medidas de potencial de membrana mitocondrial

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi$) foi avaliado em mitocôndrias isoladas, incubadas ou não com NS3pro, usando safranina O (Sigma-Aldrich), um corante fluorescente catiônico lipofílico que sofre supressão de fluorescência induzida pelo potencial de membrana. O ensaio foi realizado em fluorímetro Varian Cary Eclipse (Agilent, Califórnia, EUA), excitando-se a amostra com luz de comprimento de onda de 495 nm, e medindo-se a emissão de fluorescência a 587 nm, sob agitação em alta velocidade, a 37°C. Foram usados 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de mitocôndrias hepáticas isoladas, incubadas ou não com NS3pro, em 1 mL de MIR05 com safranina O 0,5 μM . O ensaio foi iniciado com a adição de malato 5 mM, piruvato 10 mM e succinato 10 mM, seguindo-se a adição de ADP 200 μM , oligomicina 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e FCCP 0,05 μM . O aumento do potencial de membrana diminui a intensidade de fluorescência da safranina, pois permite sua entrada nas mitocôndrias e a subsequente extinção do sinal. O cálculo do potencial de membrana é realizado subtraindo o valor do potencial de membrana máximo induzido pela adição de oligomicina (hiperpolarização) do valor mínimo induzido pela despolarização com FCCP. O valor do potencial máximo obtido é normalizado para representar 100% do potencial de cada amostra e é utilizado para calcular a percentagem de despolarização após a adição de ADP.

4.10. Análise dos complexos mitocondriais por eletroforese em gel “Nativo Azul” (BN-PAGE)

As amostras de mitocôndrias isoladas (300 µg de proteína), incubadas ou não com NS3pro ou NS3proS135A, foram diluídas em um volume final de 100 µL em PBS contendo coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) e lisadas com n-dodecil β-D-maltosídeo, DDM (Sigma-Aldrich), na concentração final de 1%, por 15 min, no gelo. Em seguida, foram centrifugadas a 2.000 g, a 4°C por, por 20 min. O sobrenadante foi coletado e 10 µL de tampão de amostra (ácido aminocaproico 2M, Bis-Tris 500 mM, EDTA 100 mM, comassie G-250 2%, pH 7) foram adicionados. 5 µL de amostra foram aplicados em gel NativePAGE 4-16% Bis-Tris (Invitrogen) e a eletroforese conduzida utilizando os tampões ânodo (Bis-Tris 50 mM, pH 7) e cátodo azul (Bis-Tris 15 mM, tricina 50 mM, comassie G-250 0,02%, pH 7), em amperagem constante de 6 A, a 4°C. Após dois terços da corrida, o tampão cátodo azul foi substituído por tampão cátodo sem comassie G-250 até o término da eletroforese.

4.11. Atividade da succinato desidrogenase (SDH)

A atividade da enzima SDH foi realizada com extratos de mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos, incubadas ou não com NS3pro, utilizando-se o protocolo adaptado de Simonin e Galina (2013). Resumidamente, a atividade da SDH foi determinada utilizando 2,6-diclorofenolindofenol, DCPIP (Sigma-Aldrich), um aceptor artificial de elétrons. O ensaio foi conduzido em placas de 96 poços, aos quais foram adicionados aproximadamente 20 µg de mitocôndrias isoladas em 200 µl de meio de reação (tampão fosfato 20mM [pH 7], Triton X-100 0,1%, azida de sódio 4mM, succinato 5mM, DCPIP 300 mM). A placa foi agitada por 10 s, a redução de DCPIP foi monitorada por 3 min, a 600 nm, a 35°C, utilizando-se o leitor SpectraMax M5. O cálculo da atividade foi realizado usando o coeficiente de extinção molar de DCPIP reduzido ($21,0 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), normalizando-se os valores pela concentração de proteínas de cada amostra.

4.12. Análise eletroforética e coloração com nitrato de prata

Para avaliar se o citocromo c poderia ser clivado por NS3, 3 µM de citocromo c foram incubados com 300 nM ou 600 nM de NS3pro em tampão TRIS-HCL 200 mM (pH 8.5) por 1h a 37°C. NS3proS135A foi utilizada como controle. As amostras foram aplicadas em géis SDS-

PAGE 20% e após a eletroforese o gel foi corado com nitrato de prata seguindo o protocolo descrito por Kavran e Leahy (2014). Brevemente, o gel foi fixado com tampão de fixação (metanol 50%, ácido acético 12% e formaldeído 0,0185%) *overnight*. Em seguida, o gel foi lavado cinco vezes em água, incubado com uma solução de tiosulfato de sódio 1.3 mM por 1 min e novamente lavado. O gel foi corado utilizando uma solução com AgNO_3 11.8 M e formaldeído 0,028% por 20 min, lavado em água e revelado com uma solução contendo Na_2CO_3 6%, tiosulfato de sódio 0.05 mM e formaldeído 0,037%. A reação foi interrompida com uma solução de metanol 50% e ácido acético 12%.

4.13. Análises estatísticas

Todos os gráficos foram construídos utilizando o programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, Califórnia, EUA) com os dados expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando análise de variância One-way ANOVA com pos hoc de Sidak ou utilizando teste t de Student. Resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1. Perfil proteômico de mitocôndrias de linhagem de células hepáticas humanas infectadas pelo DENV

Nosso grupo e outros demonstraram que a infecção por DENV afeta a função mitocondrial nas células hospedeiras, alterando a preferência de oxidação de substratos energéticos nesta organela (Zeidler *et al.*, 2017; Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares pelos quais isso se dá. Hipotetizamos que proteínas virais do DENV poderiam modular o metabolismo mitocondrial diretamente. Na busca de componentes virais que pudessem se associar a essa organela, analisamos através de técnicas proteômicas as alterações causadas pela infecção por DENV no perfil de proteínas presentes nas mitocôndrias de células Huh7. Para isso, isolamos as mitocôndrias de células infectadas ou mock, extraímos as proteínas presentes nesta organela e analisamos as proteínas presentes em cada condição por espectrometria de massas. Para a identificação das proteínas, usamos bancos de dados tanto de proteínas celulares como das proteínas do DENV.

Identificamos peptídeos de algumas proteínas do DENV nessa análise, sendo elas NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5 e proteína E (**Tabela 2**). A identificação dessas proteínas na amostra indica que elas podem se encontrar de alguma forma associada às mitocôndrias, seja na superfície, dentro dessas organelas ou anexadas a membranas associadas à mitocôndria (MAM, do inglês *mitochondria-associated membranes*). A maior parte dos peptídeos identificados (44,4%) pertenciam à NS3 (**Figura 14A**). Estes cobriram 46,6% da extensão da NS3, englobando todos os seus domínios (**Figura 14B**). Dessa forma, de todas as proteínas virais identificadas em nosso *screening* por proteômica, consideramos que NS3 é a que tem mais chances de se encontrar de fato associada às mitocôndrias durante uma infecção. Por isso, escolhemos focar em NS3 nesta tese.

Tabela 2 - Peptídeos de proteínas do DENV identificados por análise proteômica em mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas.

Sequência peptídica	Comprimento do peptídeo (aa)	Proteína
AELEDGAYR	9	Serina protease NS3
AGNDIAACLSKNGK	14	Serina protease NS3
AVQTKPGLFK	10	Serina protease NS3
CMKPVILTDGEER	13	Serina protease NS3
DLISYGGGWK	10	Serina protease NS3
DPFPQSNAPIIDEEREIPER	20	Serina protease NS3
EGEEVQVLALEPGKNPR	17	Serina protease NS3
EKVDAIDGEYR	11	Serina protease NS3
RGDLPVWLAYR	10	Serina protease NS3
GILGYSQIGAGVYK	14	Serina protease NS3
IEPSWADVK	9	Serina protease NS3
IYSDPLALK	9	Serina protease NS3
LEGEWKEGEEVQVLALEPGK	20	Serina protease NS3
LTIMDLHPGAGK	12	Serina protease NS3
MLLDNINTPEGIIPSMFEPERK	23	Serina protease NS3
NNQILEENVEVEIWK	16	Serina protease NS3
RLTIMDLHPGAGK	13	Serina protease NS3
RYLPAIVR	8	Serina protease NS3
SIEDNPEIEDDIFR	14	Serina protease NS3
SWNSGHEWVTDKFKGK	15	Serina protease NS3
TLILAPTR	8	Serina protease NS3
TTFVDLMRR	9	Serina protease NS3
TVWVPSIK	9	Serina protease NS3
VAAEGINYADRR	12	Serina protease NS3
WCFDGVK	7	Serina protease NS3
YQTPAIR	7	Serina protease NS3
AHEEGICGIR	10	Proteína não estrutural 1
ASFIEVK	7	Proteína não estrutural 1
CGSGIFITDNVHTWTEQYK	19	Proteína não estrutural 1
LENLMWK	7	Proteína não estrutural 1
LITEWCCR	8	Proteína não estrutural 1
QITPELNHILSENEVK	16	Proteína não estrutural 1
NLAGPVSQHNYPGYHTQITGPWHLGK	27	Proteína não estrutural 1
LTIMTGDIK	9	Proteína não estrutural 1
SHTLWSNGVLESEMIIPK	18	Proteína não estrutural 1
SLRPQPTELK	10	Proteína não estrutural 1
TDWIPLALTIK	11	Proteína não estrutural 2A
GLNPTAIFLTLSR	14	Proteína não estrutural 2A
TDWIPLALTIK	11	Proteína não estrutural 2A
VRPTFAAGLLLR	12	Proteína não estrutural 2A
CPTQGEPSSLNEEQDKR	16	Proteína de envelope E
DSPVNIEAEPFPGDSYIIIIGVEPGQLK	27	Proteína de envelope E
ETLVTFK	7	Proteína de envelope E
GGIVTCAMFR	10	Proteína de envelope E
GSSIGQMFETTMR	13	Proteína de envelope E
HSMVDRGWGNGCGLFGK	17	Proteína de envelope E
ITPQSSTTEAELTGYGTVTMECSPR	25	Proteína de envelope E
LITVNPVTEK	11	Proteína de envelope E
NKPTLDFELIK	11	Proteína de envelope E
EAVEDSRFWELVDK	14	RNA polimerase NS5
EDQWCGSLIGLTSR	14	RNA polimerase NS5
EGGAMYADDTAGWDTR	16	RNA polimerase NS5
GSRAIYMWLGAR	13	RNA polimerase NS5
LQSGVDVFFIPPEK	14	RNA polimerase NS5
NIGIESEIPNLDIIGK	16	RNA polimerase NS5
TPVESWEEIPLYGK	14	RNA polimerase NS5
NPTVDGITVIDLDPIPYDPK	20	Proteína não estrutural 4B

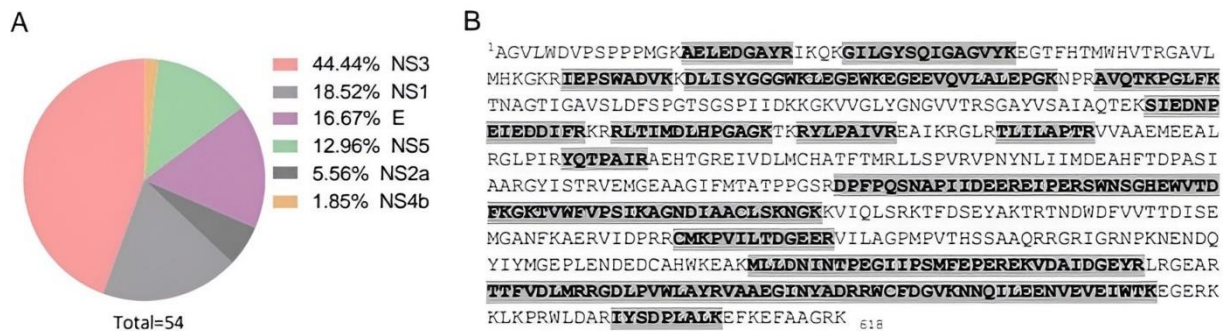


Figura 14. Screening por proteômica de mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas. (A) Gráfico de pizza mostrando a porcentagem de peptídeos DENV identificados por espectrometria de massa. (B) Sequência de NS3 com os peptídeos identificados destacados em cinza escuro correspondendo a uma cobertura de 46,6% da proteína (288 de 618 aa). Informações do Uniprot: Entrada: P29990; Nome da entrada: POLG_DEN26; Nome da proteína: Genoma da poliproteína; Organismo: vírus da dengue tipo 2 (cepa Tailândia/16681/1984) (DENV-2); Comprimento: 3391 aa.

A infecção pelo DENV em células Huh7 parece também ter causado uma diminuição da abundância de determinadas proteínas nas mitocôndrias do hospedeiro. Em nossos experimentos de proteômica, encontramos 25 proteínas celulares moduladas negativamente nas mitocôndrias (pelo menos duas vezes em relação ao mock) de células Huh7 infectadas pelo DENV, sendo a maioria delas (48%) relacionada ao metabolismo energético (**Figura 15 e Tabela 3**). Destas, um terço pertence ao sistema de transporte de elétrons mitocondrial (NDUFA9 é uma subunidade do complexo I, UQCR10 é uma subunidade do complexo III, ATP5MF e ATP5MK são subunidades do complexo V; **Figura 15 e Tabela 3**). Isso indica que o metabolismo energético mitocondrial parece de fato estar impactado durante a infecção pelo DENV em linhagens de células hepáticas humanas.

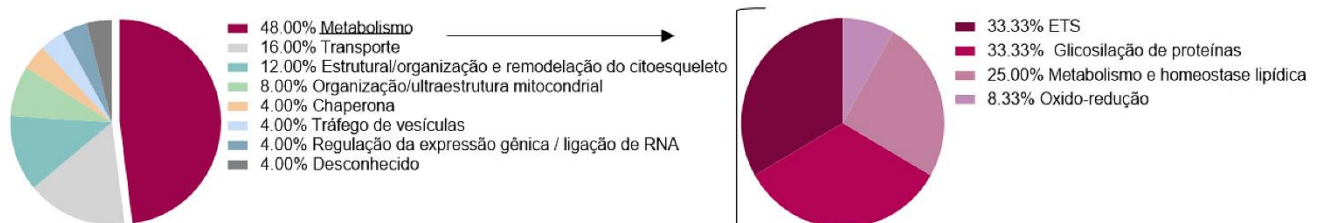


Figura 15. Funções das proteínas celulares alteradas pela infecção. Os gráficos de pizza mostram a distribuição das proteínas do hospedeiro moduladas negativamente na infecção (pelo menos duas vezes em relação ao mock), classificadas quanto à função com o auxílio do banco de dados UniProt.

Tabela 3 - Proteínas moduladas negativamente (redução de pelo menos duas vezes em relação ao mock) em mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas com DENV.

Proteína	Código de acesso	Contagem de peptídeos	Peptídeos únicos	Razão relativa ao mock
MPC1	Q9Y5U8	1	1	Infinito
Erlina-1	O75477	3	1	9,419946815
ACTBL2	Q562R1	5	1	5,331133383
HS905	Q58FG0	8	1	3,981651002
OSTC	Q9NRP0	1	1	3,65329968
NDUA9	Q16795	2	2	3,609761243
Rab-10	P61026	6	1	3,474165322
SURF4	O15260	4	2	3,243158327
AOFB	P27338	2	2	3,043336011
MSI2H	Q96DH6	1	1	2,834187272
MTCH2	Q9Y6C9	5	5	2,747435429
TBA1C	Q9BQE3	13	1	2,617916804
Erlina-2	O94905	6	3	2,583379753
TOM22	Q9NS69	2	2	2,566999952
HACD3	Q9P035	6	4	2,472867908
TMCO1	Q9UM00	3	2	2,472185745
NUD14	O95848	1	1	2,400975718
ATPK	P56134	4	3	2,246875441
REEP6	Q96HR9	1	1	2,241302476
RPN2	P04844	19	17	2,224549122
LRC59	Q96AG4	14	12	2,121383016
QCR9	Q9UDW1	1	1	2,081254815
ATPMK	Q96IX5	2	1	2,065188135
MIC60	Q16891	18	14	2,053471114
OST48	P39656	17	15	2,004083047

5.2. Estabelecimento de um modelo celular de expressão heteróloga da proteína NS3

A fim de compreender as consequências da associação de NS3 à mitocôndria sobre o metabolismo dessa organela, buscamos estabelecer um modelo celular através da expressão heteróloga de NS3 em células Huh7. Uma opção seria transfectar as células a fim de expressar NS3, mas ensaios conduzidos anteriormente por nosso grupo mostraram que o procedimento de transfecção em si afetava a função mitocondrial em células Huh7, portanto, descartamos a possibilidade de realizarmos transfecção nessas células.

Vetores retrovirais são considerados eficientes para a introdução de genes específicos em diversos tipos celulares. A transdução com vetores retrovirais permite ainda a integração do

gene de interesse no genoma das células, pois ocorre transcrição reversa do RNA do vetor, formando uma cópia de DNA dupla fita que é integrada ao DNA da célula hospedeira. Posteriormente, essas células podem ser selecionadas com antibiótico de seleção cujo gene de resistência (contido originalmente no plasmídeo) também se encontra integrado no genoma. Assim, o estabelecimento de sublinhagens estáveis com expressão constitutiva da proteína de interesse é muito mais eficiente do que na transfecção, onde o vetor fica no núcleo das células em forma de corpo epissomal. Esse eventualmente é perdido à medida que as células se dividem. Portanto, a transfecção é mais usada para expressão transiente (Pear *et al.*, 1993; Hossle, Seger e Steinhoff, 2002; Coroadinha *et al.*, 2010).

Decidimos então adotar um modelo de transdução com vetor γ -retroviral, com o qual estabelecemos duas sublinhagens que expressavam NS3 constitutivamente, Huh7-NS3 e A549-NS3. A expressão de NS3 foi bem-sucedida em ambas as sublinhagens, mas as células Huh7-NS3 pararam de proliferar, tornando inviável conduzir experimentos com essas células.

Já com as células A549-NS3, ao conduzir ensaios de imunofluorescência, observamos que apenas cerca de 20% das células apresentavam marcação positiva para NS3, embora tenham sido selecionadas com o antibiótico puromicina, cujo gene de resistência estava no plasmídeo (**Figura 16**).

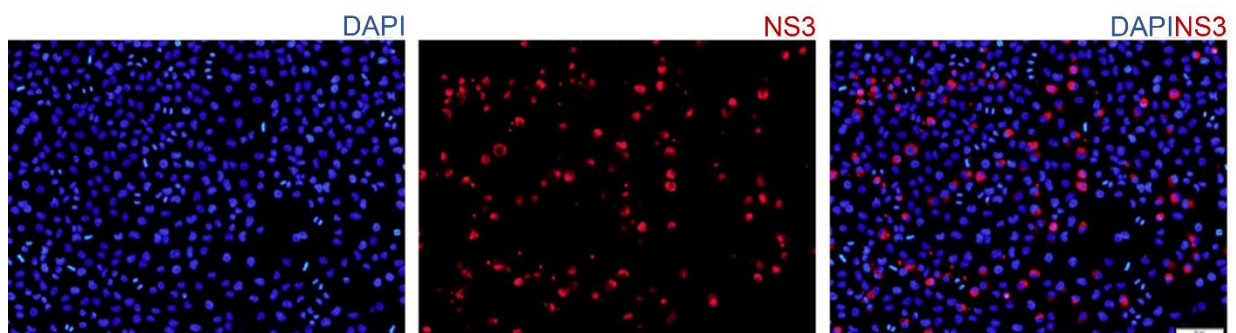


Figura 16. Expressão de NS3 em células A549 submetidas à transdução com vetor γ -retroviral. Imagens representativas de células A549-NS3 incubadas com anticorpos anti-NS3 (vermelho) e analisadas por microscopia óptica de fluorescência com objetiva de 20x. Os núcleos foram marcados com DAPI (azul). A barra de escala corresponde a 50 μ m.

Como mencionado anteriormente, mesmo após seleção, não observamos uma alta porcentagem de células positivas para NS3. Mesmo sendo constantemente mantidas em cultura com o antibiótico de seleção, notamos que com o passar do tempo a porcentagem de células com marcação positiva para NS3 pareceu diminuir. Isso nos fez pensar que a expressão de NS3 a longo prazo não era viável. Optamos então por um sistema induzível para expressão transiente da NS3 utilizando um vetor viral.

Utilizamos então um vetor lentiviral do sistema Tet-On, cuja expressão da proteína de interesse pode ser induzida pela adição de doxiciclina (DOX), um análogo da tetraciclina, à cultura. Os vetores lentivirais do tipo Tet-On são projetados para expressar um ativador transcricional responsivo à tetraciclina, que na presença desse antibiótico ou de um análogo, se liga ao promotor do gene de interesse dando início a transcrição (Baron e Bujard, 2000). Os vetores lentivirais possuem algumas vantagens em relação ao sistema γ -retroviral. Eles se integram ativamente ao DNA genômico sem a necessidade de replicação celular, pois possuem um sinal de endereçamento nuclear. No caso dos vetores γ -retrovirais, é necessário que as células estejam em processo de divisão celular, para que ocorra o desaparecimento da membrana nuclear, assim o cDNA viral pode ser transportado para o núcleo e integrado ao genoma celular. Dessa maneira, a transdução com vetores lentivirais pode ser considerada mais eficiente do que a transdução com vetores γ -retrovirais. Somado a isso, os lentivírus são mais estáveis e podem atingir títulos virais mais elevados quando comparados aos γ -retrovírus (Dufait *et al.*, 2012).

Novamente, células A549 foram transduzidas, passaram por seleção com o antibiótico puromicina, e diferentes concentrações de DOX foram utilizadas para induzir a transcrição de NS3. Infelizmente esse sistema de expressão não foi eficiente, e a expressão de NS3 foi baixa (**Figura 17**). Os tempos pós-indução de 48, 72 e 96 h também foram testados, mas não foram observadas diferenças significativas (dados não mostrados).

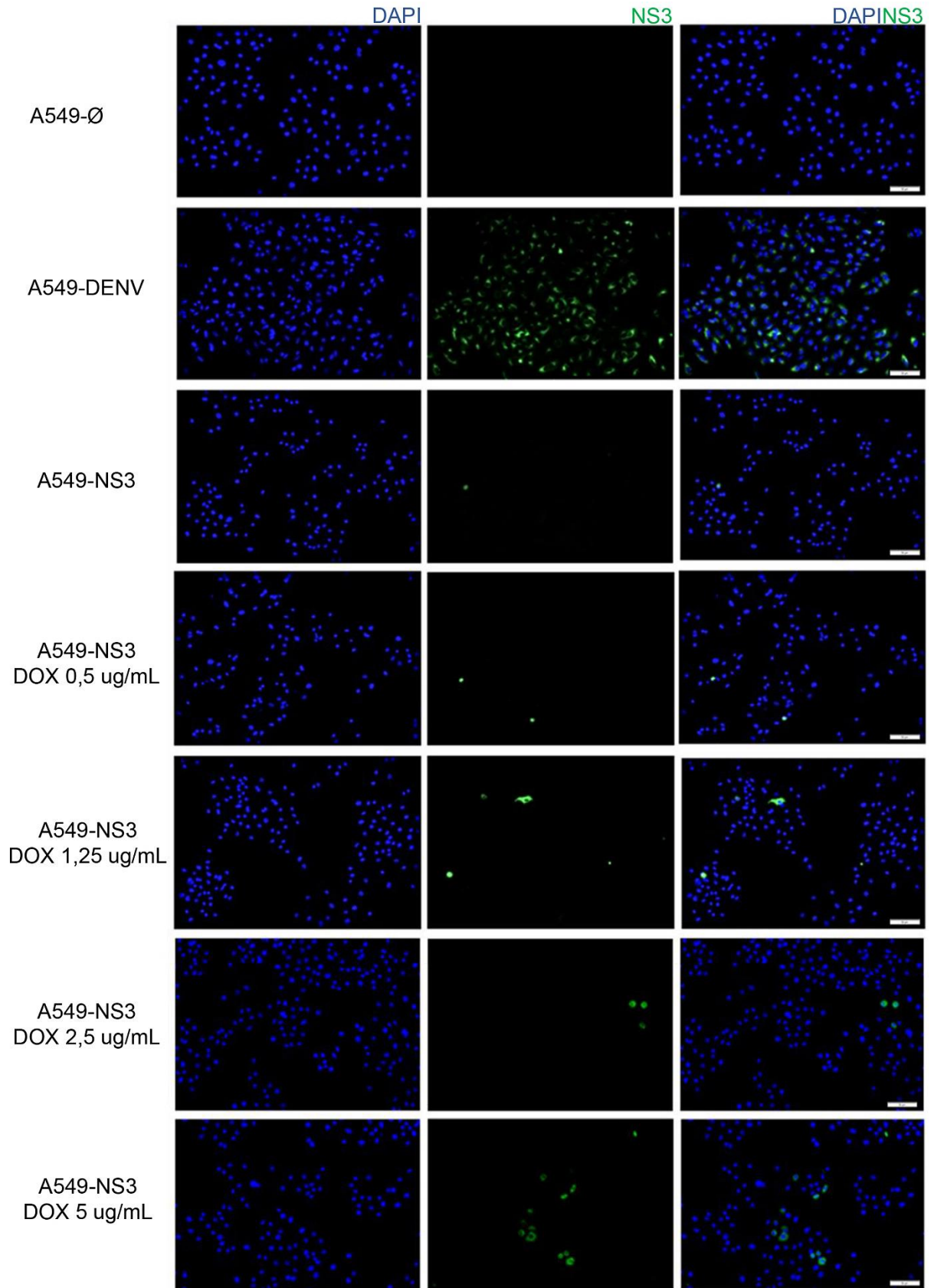


Figura 17. Expressão de NS3 em células A549 utilizando transdução com vetor lentiviral Tet-On. As células foram marcadas com anticorpos anti-NS3 (verde) e analisadas por microscopia de fluorescência com objetiva de 20 \times . Núcleos corados com DAPI (azul). A barra de escala corresponde a 50 μ m.

Os dados em conjunto mostram uma baixa taxa de expressão de NS3 independente do sistema de expressão heteróloga usado. É possível que as células possuam mecanismos imunes inatos que bloqueiam a expressão de NS3 ou direcionam NS3 para degradação e que, durante a infecção natural, esses mecanismos sejam pelo menos parcialmente neutralizados. Como não obtivemos um modelo celular com alta expressão de NS3, buscamos outras abordagens para avaliar o papel de NS3 no metabolismo.

Dentro do período experimental desta tese, outro grupo publicou um estudo mostrando que NS3 possui um sinal de endereçamento que permite sua entrada na mitocôndria (Gandikota *et al.*, 2020). Esses resultados estão de acordo com nossos dados de proteômica, e nos incentivaram a buscar novas formas de estudar o efeito de NS3 sobre a função mitocondrial. Utilizando NS3 recombinante e mitocôndrias isoladas de fígado, os autores do artigo demonstraram que, uma vez dentro da mitocôndria, NS3 encontra uma proteína-alvo de proteólise do hospedeiro, a cochaperona de Hsp70 mitocondrial, GrpEL1 (Gandikota *et al.*, 2020). Resolvemos, então, utilizar uma abordagem semelhante à utilizada neste artigo para avaliarmos os efeitos da NS3 na função mitocondrial, mais especificamente no metabolismo energético.

5.3. O domínio protease de NS3 afeta a respiração mitocondrial em mitocôndrias isoladas

Produzimos diferentes constructos de NS3 recombinante (**Figura 18**) para avaliar o efeito da NS3 na função mitocondrial por respirometria de alta resolução. Como Gandikota *et al.* (2020) mostraram que o domínio protease de NS3 entrava na mitocôndria mais eficientemente do que a NS3 inteira, realizamos a maior parte dos experimentos usando com o domínio protease. Além do domínio protease de NS3, aqui referido como NS3pro (resíduos 1-180), expressamos e purificamos o domínio protease de NS3 contendo uma substituição da serina 135 da tríade catalítica (His51, Asp75 e Ser135) por uma alanina, o que a torna cataliticamente inativa (aqui referido como NS3proS135A, **Figura 18**). O constructo da protease inativa serviu para avaliarmos os efeitos da NS3pro que seriam dependentes e os independentes da atividade catalítica de NS3. Além disso, validamos, posteriormente, os principais achados usando também a proteína inteira (resíduos 1-618).

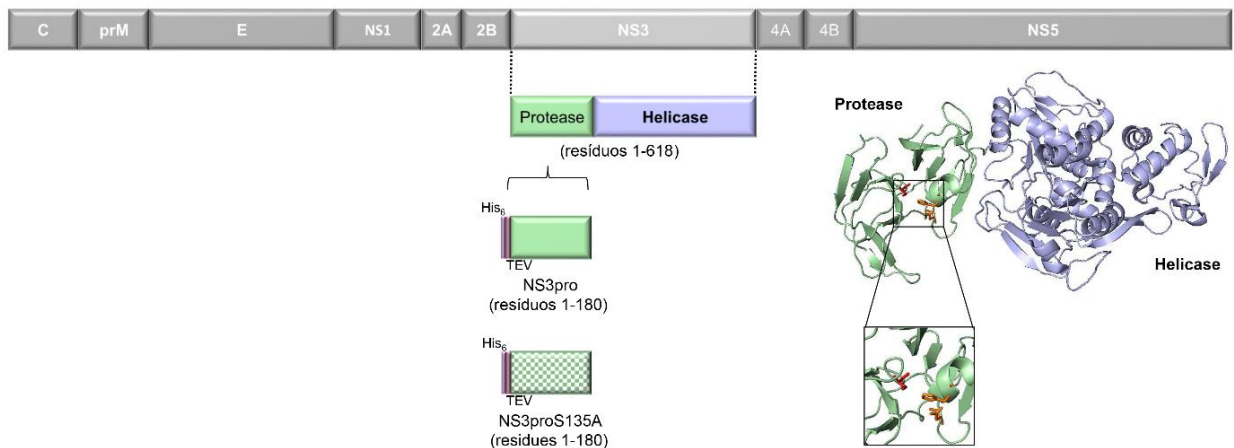


Figura 18. Esquema dos constructos utilizados para expressão do domínio protease de NS3 (NS3pro). O constructo de NS3pro recombinante compreendendo os resíduos 1-180 da proteína DENV NS3 (verde) foi clonado com uma *tag* de hexa-histidina (His-tag) (rosa) e uma sequência de clivagem TEV (roxo). NS3proS135A (verde quadriculado) possui uma substituição da serina 135 por uma alanina e é cataliticamente inativa. A estrutura tridimensional da proteína NS3 é representada em fita com os domínios helicase (lilás) e protease (verde), destacando-se a tríade catalítica composta pela histidina na posição 51 (laranja), aspartato na posição 75 (laranja) e serina na posição 135 (vermelho). A representação da proteína foi gerada usando o PyMOL com o PDB ID: 2VBC.

Incubamos mitocôndrias isoladas de fígado de camundongos machos de 12-20 semanas com NS3pro ou NS3proS135A recombinantes por 1h no gelo antes de realizar estudos funcionais por respirometria de alta resolução. Como controle utilizamos mitocôndrias incubadas com o tampão usado para diluir as proteínas recombinantes. Realizamos os ensaios de respirometria com diferentes concentrações molares dessas proteínas recombinantes (100, 200, 300 e 600 nM), utilizando um protocolo multi-substrato, no qual avaliamos alterações na taxa de consumo de oxigênio, OCR, das mitocôndrias na presença tanto de substratos que alimentam o ciclo de Krebs (piruvato, malato) quanto do substrato do complexo II (succinato), na presença de ADP (substrato da ATP sintase) (**Figura 19**).

Os ensaios de respirometria de alta resolução podem fornecer diferentes parâmetros. Um deles é o OCR no estado respiratório 1, obtido quando as mitocôndrias são incubadas com meio de respiração antes da adição de substratos. Após a adição de substratos como o malato, piruvato e succinato (mas na ausência de ADP) temos o estado respiratório 2. Esta é uma respiração não fosforilante (não usada para síntese de ATP) uma vez que ADP ainda não foi adicionado. Em seguida, com a adição de ADP, temos o OCR acoplado à síntese de ATP, que

representa o estado de fosforilação oxidativa ativado por ADP, que também é conhecido como estado respiratório 3. Por fim, com a adição de rotenona e antimicina A (inibidores dos complexos I e III, respectivamente), temos o consumo residual de oxigênio, que representa reações laterais oxidativas que ainda ocorrem após a inibição do ETS (**Figura 19**).

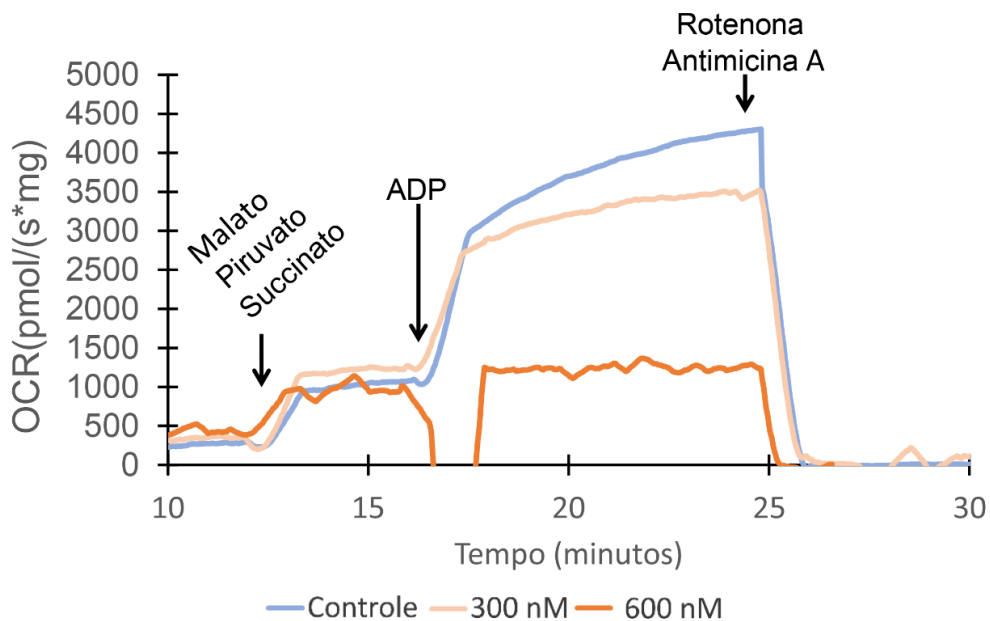


Figura 19. Resultados representativos de ensaios de respirometria de alta resolução utilizando um protocolo multi-substrato. As mitocôndrias isoladas foram incubadas ou não com NS3pro nas concentrações indicadas.

Com os parâmetros obtidos no ensaio de respirometria de alta resolução, calculamos inicialmente o OCR acoplado à síntese de ATP (respiração acoplada), subtraindo o estado respiratório 2 do estado 3. Esse é um dos indicadores mais importantes na respirometria, pois representa o consumo de oxigênio relacionado à síntese de ATP.

A incubação de mitocôndrias isoladas com 200 ou 300 nM NS3pro levou à diminuição de 37,8 a 42,8% na respiração acoplada, quando foi utilizado o protocolo multi-substrato (**Figura 20A**). Na concentração de 300 nM, a NS3proS135A, cataliticamente inativa, teve efeitos semelhantes à NS3pro na respiração acoplada, causando uma diminuição de 37% em média no OCR, sugerindo que o efeito observado seja independente da atividade protease de NS3pro (**Figura 20A**). Quando as mitocôndrias foram incubadas com NS3pro na concentração mais elevada, de 600 nM, a respiração acoplada foi bastante prejudicada, apresentando uma diminuição de 86%. Por outro lado, quando utilizamos a protease inativa, NS3proS135A, a

concentração de 600 nM causou uma redução do OCR de apenas 56% em média (**Figura 20A**). Dessa forma, a diferença entre os efeitos dos constructos da protease ativa e inativa indicam que nas concentrações mais altas, o efeito seja dependente da atividade protease. Em conjunto esses dados sugerem que, em altas concentrações (600 nM), a NS3pro prejudica a função mitocondrial provavelmente degradando proteínas mitocondriais de maneira inespecífica. No entanto, a NS3pro afeta a respiração mitocondrial independente de sua atividade de protease em concentrações mais baixas (300 nM).

Uma diminuição da respiração acoplada pode se dar por dois motivos principais: por um aumento do consumo de oxigênio que é mantido principalmente para compensar o vazamento de prótons (respiração *leak*), que reduz a eficiência da síntese de ATP ao reduzir a capacidade de reter prótons no espaço intermembranas; ou por um prejuízo na eficiência do ETS, que pode se dar pela redução da atividade ou da função de componentes do ETS ou de enzimas que geram cofatores reduzidos para serem entregues no ETS. Na análise da respiração *leak*, aqui medida como um estado de repouso não fosforilante quando os substratos reduzidos são fornecidos (malato, piruvato e succinato), mas sem o fornecimento de ADP (vazamento de prótons sem adenilatos), NS3pro levou a uma diminuição de 21% na respiração *leak* apenas na concentração mais elevada (600 nM), o que parece ser dependente da protease, já que o mesmo efeito não foi observado com NS3proS135A (**Figura 20B**). Esse dado reforça que NS3pro na concentração de 600 nM afeta drasticamente a função mitocondrial, perturbando até mesmo a respiração associada ao vazamento de prótons. Além disso, como não houve alteração da respiração *leak* na presença de NS3pro 300 nM, a diminuição na respiração acoplada induzida por ela parece ser devida a algum prejuízo no metabolismo mitocondrial e não a um aumento no desacoplamento (o que pode ocorrer devido a algum dano na membrana ou outros mecanismos de vazamento de prótons).

A taxa de controle respiratório (RCR), que representa a razão entre a respiração acoplada e a respiração *leak*, reflete a capacidade das mitocôndrias de fosforilar o ADP em ATP e é um parâmetro clássico para indicar alterações na função mitocondrial (Brand e Nicholls, 2011). Como o cálculo do RCR é uma forma de normalizar as variâncias dos dados brutos, adotamos o RCR como um indicador da função mitocondrial nos experimentos avaliados em seguida. Aqui, observamos que NS3pro prejudicou o RCR de maneira dose dependente (**Figura 20C**), refletindo uma diminuição na eficiência da mitocôndria na produção de ATP.

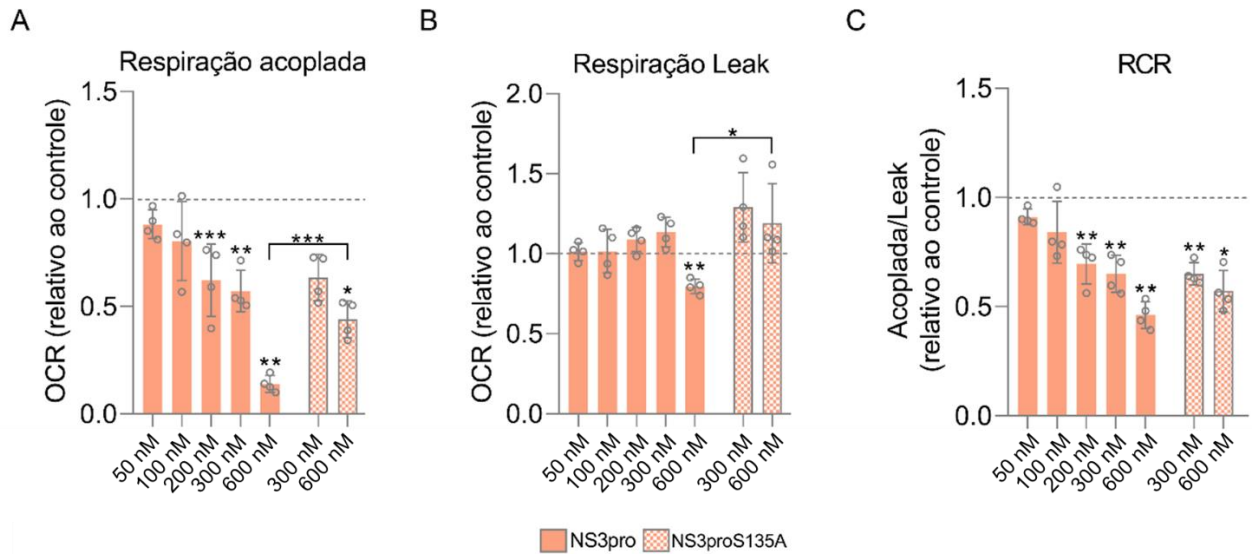


Figura 20. NS3pro afeta a respiração mitocondrial. As mitocôndrias foram isoladas e incubadas com NS3pro (barras cheias) ou com NS3proS135A (barras quadriculadas) nas concentrações indicadas, e o consumo de oxigênio foi avaliado. Os gráficos estão expressos em relação ao controle (mitocôndrias incubadas com o tampão no qual as proteínas recombinantes foram diluídas). (A) Respiração acoplada à síntese de ATP (B) Respiração *leak*. (C) Taxa de controle respiratório (RCR: acoplada/*leak*). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

É interessante destacar que as alterações observadas no RCR refletem mais as mudanças observadas no OCR da respiração acoplada à síntese de ATP (**comparação entre as figuras 20A e C**) do que alterações na respiração *leak* (vazamento de prótons) (**Figura 20B**). Sendo assim, a diminuição do RCR causada pela incubação de mitocôndrias com NS3pro indica uma menor capacidade fosforilativa e não uma redução da eficiência de síntese de ATP por vazamento de prótons.

Já que parte dos efeitos observados parece estar ligada à atividade protease de NS3, o que poderia comprometer a função mitocondrial ao interromper a integridade da membrana interna, medimos a capacidade das mitocôndrias de manter o potencial de membrana quando incubadas com NS3pro. As análises mostraram que as mitocôndrias incubadas com 300nM ou 600nM de NS3pro têm a mesma capacidade de manter o potencial de membrana quando comparado à condição controle, sugerindo que NS3pro não afeta a integridade da membrana ou danifica profundamente esta organela, mesmo em concentrações mais altas (**Figura 21**).

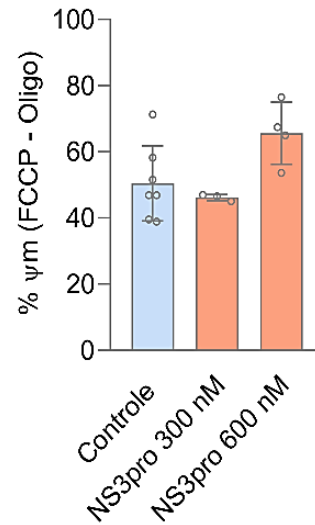


Figura 21. NS3pro não compromete o potencial de membrana mitocondrial. O gráfico mostra o percentual de despolarização do potencial de membrana após a adição de ADP de mitocôndrias isoladas incubadas ou não com NS3pro 300nM e 600nM. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

Avaliamos também a integridade dos complexos respiratórios das mitocôndrias incubadas com 300 nM e 600 nM de NS3pro através da análise das proteínas presentes na membrana mitocondrial separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (“gel nativo azul”, BN-PAGE). Por ser uma eletroforese corrida em condições não-desnaturantes, é possível visualizarmos complexos multiproteicos presentes nas amostras (igualmente preparadas em condições não desnaturantes). Não observamos quaisquer alterações na montagem de complexos ou sinais de degradação nas amostras incubadas com NS3pro (**Figura 22**). Portanto, NS3pro parece afetar a função mitocondrial por meio de mecanismos mais específicos, em vez de uma ruptura inespecífica de membrana ou pela desmontagem de complexos proteicos.

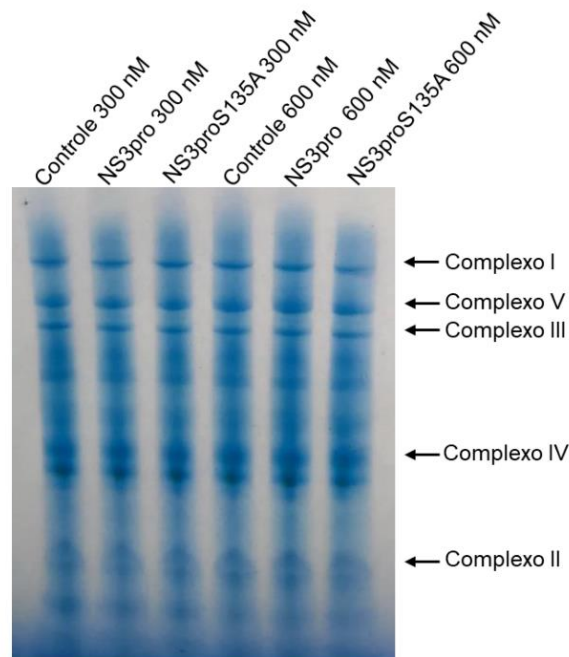


Figura 22. NS3pro não compromete a integridade dos complexos do ETS. Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições não-desnaturantes (BN-PAGE) de extratos de proteínas de mitocôndrias isoladas incubadas ou não com NS3pro 300nM e 600nM. As posições estimadas dos complexos estão indicadas.

Embora 600nM de NS3pro não afete o potencial de membrana ou comprometa a integridade dos complexos respiratórios, não podemos descartar efeitos inespecíficos associados à sua atividade protease, dado que observamos resultados diferentes no consumo de oxigênio quando comparamos a NS3pro com NS3proS135A nessa concentração. Portanto, adotamos as concentrações de 300 nM de NS3pro nos experimentos subsequentes.

5.4. NS3pro inibe a utilização de piruvato/malato, succinato e palmitoil-carnitina de maneiras distintas

Uma vez que observamos que NS3pro afeta a respiração mitocondrial utilizando um protocolo multi-substrato, decidimos investigar a contribuição de cada substrato energético individualmente para o efeito anteriormente observado. Realizamos ensaios de respirometria de alta resolução em mitocôndrias isoladas incubadas com NS3pro na presença de substratos que alimentam o ciclo de Krebs (piruvato e malato), de um substrato que alimenta o ETS diretamente, o succinato, que é substrato do complexo II do ETS (succinato desidrogenase), ou de palmitoil-carnitina que passa por β -oxidação mitocondrial.

Para melhor compreensão dos experimentos seguintes, cabe aqui ilustrar brevemente como se dá a utilização dos diferentes substratos e a ação dos inibidores que utilizamos. O malato e o piruvato são substratos cuja oxidação gera NADH, tanto diretamente pela malato desidrogenase e pela piruvato desidrogenase, respectivamente, quanto pela oxidação subsequente de seus metabólitos por outras desidrogenases no ciclo de Krebs (**Figura 23**). O NADH gerado, por sua vez, é oxidado pelo complexo I, o qual pode ser inibido por rotenona. O succinato também pode ser gerado a partir da oxidação de malato e piruvato no ciclo de Krebs ou pode entrar diretamente na mitocôndria quando adicionado experimentalmente, sendo oxidado diretamente pelo complexo II (que é a enzima succinato desidrogenase). Este apresenta FAD como grupo prostético e recebe elétrons do succinato, gerando FADH₂. O malonato é um inibidor competitivo do complexo II. Já a β-oxidação de palmitoil-carnitina gera tanto NADH, que é oxidado no complexo I, quanto FADH₂, que constitui grupo prostético das proteínas do complexo ETF-ETF:QO (**Figura 23**).

Os elétrons transferidos na oxidação de NADH (pelo complexo I) e FADH₂ (pelo complexo II ou ETF-ETF:QO) são entregues à ubiquinona, que os transfere para o complexo III (inibido por antimicina A). O TMPD pode ser utilizado como doador de elétrons para o complexo IV e o ascorbato garante sua redução. O KCN é utilizado como inibidor do complexo IV. Como mencionado anteriormente, a transferência de elétrons pelos complexos I, III e IV é acoplada ao bombeamento de prótons para formação de potencial de membrana e o retorno de prótons através da ATP sintase é a força motriz utilizada na síntese de ATP (**Figura 23**).

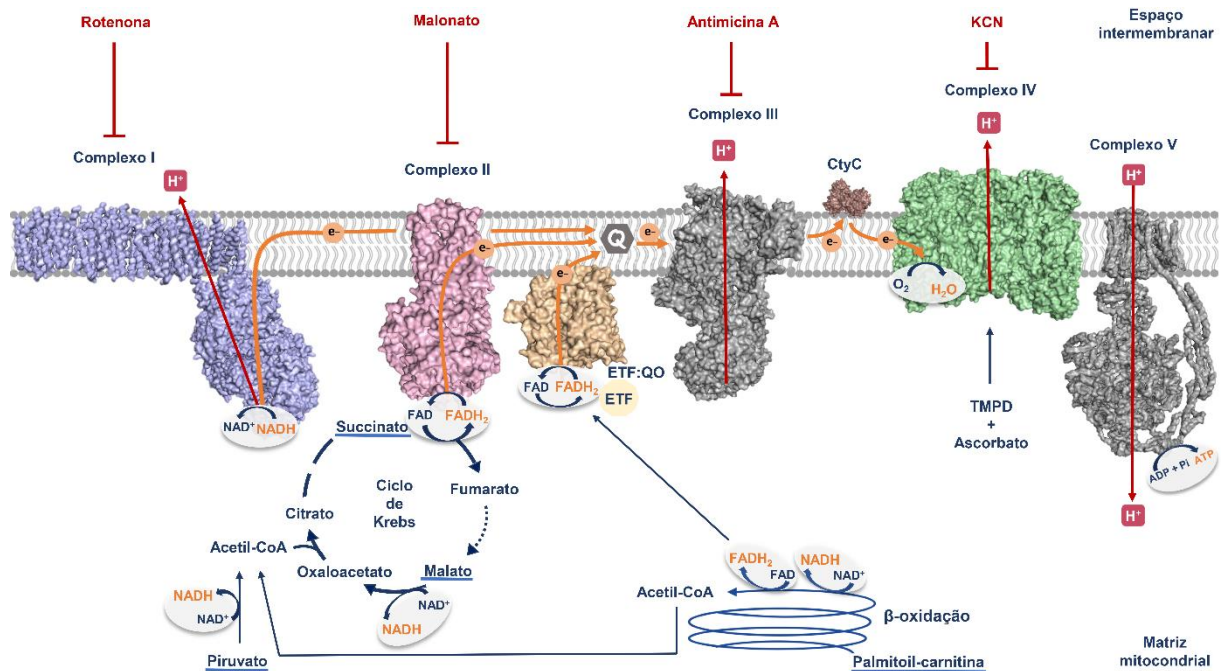


Figura 23. Esquema ilustrativo do sistema transportador de elétrons com os substratos e inibidores utilizados nos ensaios de respirometria de alta resolução. e-: elétrons. H+: prótons. Q: ubiquinona. CtyC: citocromo c. As setas de ponta chata (vermelho) indicam inibição. A ilustração não está em escala. As estruturas dos complexos foram geradas com PyMOL usando os PDB IDs: 3M9S, 3AEF, 2GMH, 1NTM, 3ZCF, 2Y69 e 5ARE.

Observamos que NS3pro afeta a utilização desses substratos de forma distinta. Quando malato e piruvato foram utilizados como substratos, ocorreu uma redução de 40,6% no RCR das mitocôndrias incubadas com NS3pro se comparadas ao controle. Por outro lado, quando a incubação foi feita usando a protease inativa, NS3proS135A, não observamos diferenças significativas em relação ao controle, sugerindo que o efeito causado pela NS3pro na oxidação de malato/piruvato está relacionada à sua atividade protease (**Figura 24A**). Curiosamente, o efeito dependente da atividade protease, que se dá na oxidação de malato/piruvato, não foi observado no protocolo multi-substrato (ver **Figura 20C**). É possível que esse efeito seja mascarado pelos efeitos independentes dessa atividade no metabolismo mitocondrial quando na presença de múltiplos substratos.

Quando fornecemos succinato como substrato, tanto NS3pro quanto NS3proS135A causaram efeitos semelhantes, ambas afetam a respiração associada ao succinato reduzindo o RCR em 56,2% e 40,6%, respectivamente (**Figura 24B**). Dessa forma, é possível concluir que

NS3pro interfere na OCR dependente de succinato por um mecanismo independente de sua atividade de protease.

O consumo de oxigênio mitocondrial foi também avaliado na presença de palmitoil-carnitina, forma do palmitato passível de ser transportada (pelo transportador de acil-carnitina) para dentro da mitocôndria. Na matriz mitocondrial, a enzima palmitoil-carnitina aciltransferase 2 transfere o grupo acil da acil-carnitina para a coenzima A, formando acil-CoA (forma “ativa” do palmitato) e carnitina livre (Ojuka *et al.*, 2016). A acil-CoA fica então disponível para engajar na β -oxidação. Como mencionado anteriormente, em células Huh7, os ácidos graxos tornam-se a principal fonte energética durante a infecção pelo DENV (Fernandes-Siqueira *et al.*, 2018). Logo, incluir um ácido graxo nos experimentos seria interessante para compreendermos se NS3 estaria relacionada a esse efeito observado durante a infecção. O RCR associado à palmitato teve uma redução de 53,25% em mitocôndrias incubadas com NS3pro, mas não com NS3proS135A (**Figura 24C**). Esse efeito é oposto ao observado durante a infecção de células Huh7.

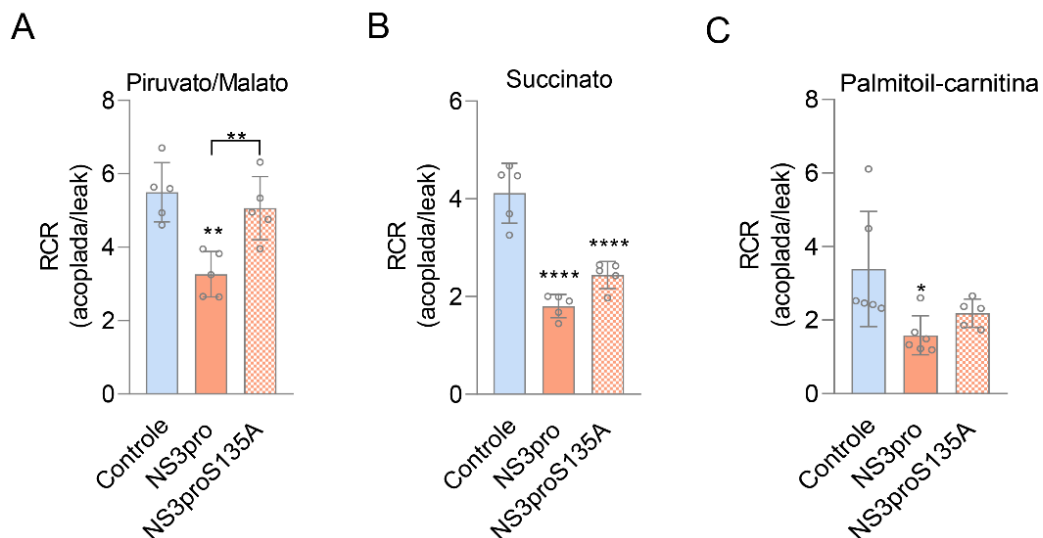


Figura 24. NS3 afeta os complexos respiratórios de diferentes maneiras. (A) RCR de mitocôndrias isoladas incubadas ou não com NS3pro ou NS3proS135A usando malato e piruvato como substratos (B) RCR usando succinato como substrato. (C) RCR usando palmitoil-carnitina como substrato. Dados expressos como média \pm desvio padrão. *, $p=0,0323$; **, $p<0,005$; ****, $p<0,0001$.

5.5. NS3pro afeta o consumo de oxigênio associado ao succinato prejudicando a função do citocromo c

Ensaio de respirometria avaliam o funcionamento de ETS através de medidas de consumo de oxigênio. Desta forma, todas as medidas realizadas dependem diretamente da

atividade do complexo IV, dado que este é o complexo que transfere os elétrons para o oxigênio, formando água, ou seja, é o complexo diretamente responsável pelo consumo de oxigênio. Para avaliar se o complexo IV contribuiria em parte com o efeito observado na redução do RCR com diferentes substratos, medimos a atividade do complexo IV por respirometria de alta resolução fornecendo TMPD e ascorbato para reduzir o complexo IV. NS3pro alterou levemente a atividade do complexo IV, diminuindo o consumo de oxigênio em 12,5% em média comparado ao controle, $p=0,07$. (**Figura 25**).

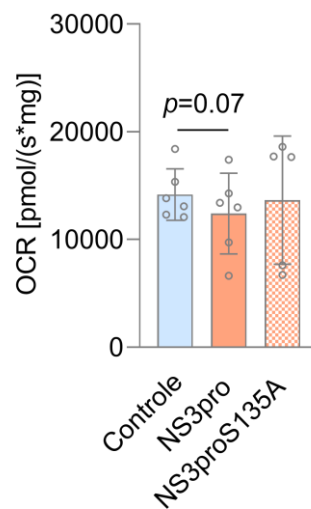


Figura 25. NS3pro não afeta consideravelmente o funcionamento do complexo IV. Consumo de oxigênio associado ao complexo IV avaliado utilizando TMPD e ascorbato como substratos. Dados expressos como média \pm desvio padrão.

O efeito no complexo IV pode contribuir parcialmente, mas não explica totalmente a diminuição de 56,2% no RCR quando succinato é utilizado como substrato, a diminuição de 53,25% no RCR com palmitoil-carnitina e nem a diminuição de 40,6% no RCR quando malato e piruvato são fornecidos como substratos, sugerindo que NS3pro não atua diretamente na funcionalidade do complexo IV. Como o efeito no complexo IV não explica as alterações no consumo de oxigênio associado à oxidação de substratos, uma outra possibilidade seria que NS3pro poderia interferir diretamente na função dos complexos I, II, III e do citocromo c (que realiza o transporte de elétrons do complexo III para o IV).

Na presença de NS3pro, o RCR mitocondrial sofreu uma diminuição mais significativa quando succinato foi utilizado como substrato (**Figura 24**). Logo, decidimos avaliar se NS3pro prejudica a atividade do complexo II diretamente, por meio de ensaio colorimétrico com extratos de mitocôndrias previamente incubadas (ou não) com NS3pro. Nesse ensaio, a

oxidação de succinato, na presença do acceptor artificial de elétrons DCPIP, foi rastreada medindo a absorbância das amostras em um comprimento de onda específico, cuja variação reflete a redução do DCPIP. Curiosamente, NS3pro estimulou levemente a atividade do complexo II (em 13,44%) (**Figura 26**). Dessa forma, podemos concluir que a redução do consumo de oxigênio associado à oxidação de succinato não se deve a um efeito direto na atividade da succinato desidrogenase.

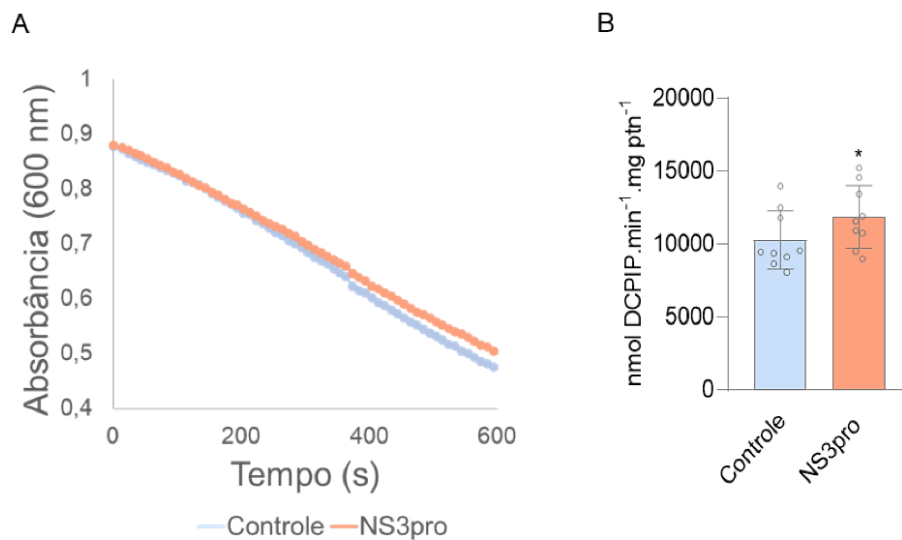


Figura 26. NS3pro estimula a atividade da succinato desidrogenase (SDH). A atividade da SDH foi avaliada em extratos de mitocôndrias isoladas incubadas ou não com NS3pro usando succinato como substrato e DCPIP como acceptor artificial de elétrons. (A) Resultados representativos do ensaio. (B) Atividade da SDH calculada utilizando o coeficiente de extinção molar de DCPIP reduzido ($21,0 \text{ mM}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). Dados expressos como média \pm desvio padrão. *, $p=0,0124$.

Em seguida, exploramos a hipótese de que NS3pro poderia afetar o citocromo c. Normalmente o citocromo c é utilizado em ensaios de respirometria como um controle de qualidade das preparações de mitocôndrias isoladas, isso porque danos à membrana externa mitocondrial podem resultar em perda parcial de citocromo c. Aqui, vimos que o potencial de membrana não está alterado nas mitocôndrias incubadas com NS3pro, o que indica que não há danos à membrana interna. Então, para testar se NS3pro estaria comprometendo a função do citocromo c, fornecemos citocromo c exógeno para as mitocôndrias isoladas previamente incubadas com NS3pro. Se sua adição restabelecesse o OCR aos níveis do controle, poderíamos assumir que ele é o elemento limitante do ETS neste contexto.

Na presença de piruvato e malato ou palmitoil-carnitina a suplementação com citocromo c não restaurou a diminuição do OCR induzida por NS3pro (**Figura 27A, C e D**). Mas quando succinato é fornecido como substrato, a adição de citocromo c restaura completamente a diminuição do OCR causada por NS3pro (**Figura 27B e D**). Portanto, NS3pro parece interferir no transporte de elétrons através do citocromo c quando succinato é o substrato, mas não quando piruvato e malato ou palmitoil-carnitina são oxidados.

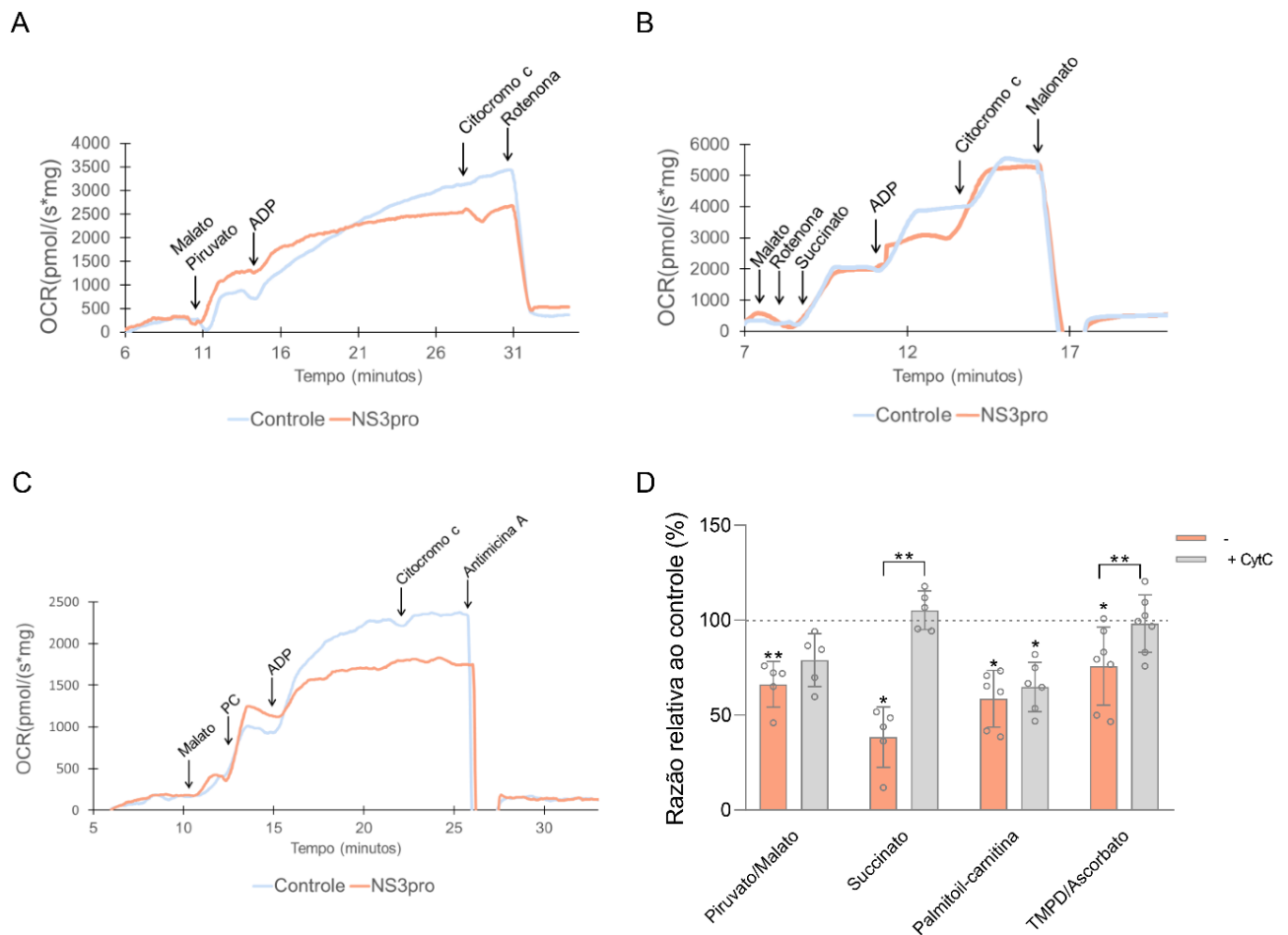


Figura 27. NS3pro interfere no transporte de elétrons através do citocromo c quando succinato é usado como substrato. (A), (B) e (C) Resultados representativos de ensaios de respirometria de alta resolução utilizando os substratos indicados. (D) Razão do consumo de oxigênio relativo ao controle antes e depois da suplementação com citocromo c (CytC). Dados representados como média \pm desvio padrão. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,009$.

Como NS3pro parece atuar sobre o citocromo c, verificamos se o citocromo c poderia ser alvo de clivagem dessa protease. Para isso, incubamos o citocromo c com 300 nM e 600 nM de NS3pro, e analisamos as bandas correspondentes a essas incubações por SDS-PAGE 20%. Não houve aparente proteólise do citocromo c quando incubado com NS3pro (**Figura 28**).

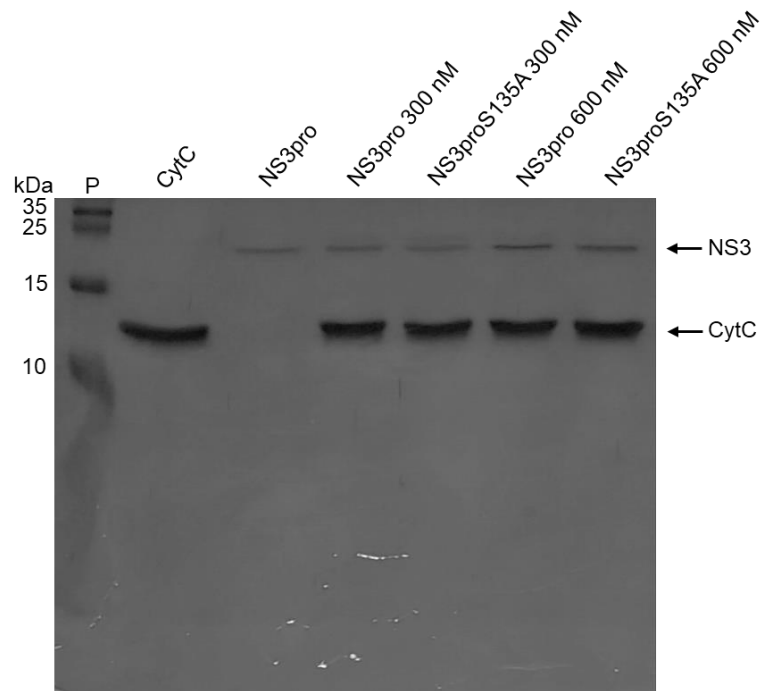


Figura 28. NS3pro não degrada citocromo c. SDS-PAGE 20% corado com prata com amostras de citocromo c (CytC) incubadas ou não com NS3pro e NS3proS135A.

Conforme mencionado, a redução da respiração associada à oxidação de malato e piruvato e palmitoil-carnitina parece ser causada por uma degradação (pela atividade da protease NS3) de algum componente responsável pela metabolização desses substratos, uma vez que o NS3proS135A, cataliticamente inativa, não prejudica a respiração mitocondrial na presença deles (**Figura 24A**). Por outro lado, o efeito do NS3pro na oxidação do succinato parece ocorrer de maneira independente da protease (**Figura 24B**). De fato, não vimos nenhum sinal de proteólise do citocromo c quando incubado com NS3pro (**Figura 28**).

5.6. NS3prohel prejudica o consumo de oxigênio induzido por succinato, mas não por malato/piruvato ou palmitato, em mitocôndrias isoladas

Até aqui, avaliamos o efeito do domínio protease de NS3 sobre a respiração mitocondrial. No entanto, não há relatos da presença de um peptídeo de NS3 menor, contendo apenas o domínio protease, nas células infectadas pelo DENV. Então, para verificar se os efeitos na respiração mitocondrial observados com NS3pro são reprodutíveis com a proteína NS3 inteira, contendo todos os seus domínios (NS3prohel), conduzimos ensaios de respirometria de alta resolução com NS3prohel recombinante e avaliamos o consumo de oxigênio associado a malato/piruvato, palmitoil-carnitina e succinato.

Na presença de piruvato/malato ou de palmitoil-carnitina não houve diferenças significativas no RCR entre as mitocôndrias controle e as incubadas com NS3prohel (**Figura 29**). Mas com succinato houve uma diminuição de 31,38% no RCR das mitocôndrias incubadas com a proteína inteira (**Figura 29**). Nas três condições, o efeito de NS3pro foi mais significativo que o de NS3prohel (**comparação entre as Figuras 24 e 29**). Como mencionado, a importação de NS3pro é mais eficiente do que a de NS3prohel (Gandikota *et al.*, 2020). Esse fato poderia explicar por que os efeitos observados com NS3pro são mais intensos. No entanto, como comentado anteriormente, o domínio protease sozinho nunca foi relatado durante a infecção.

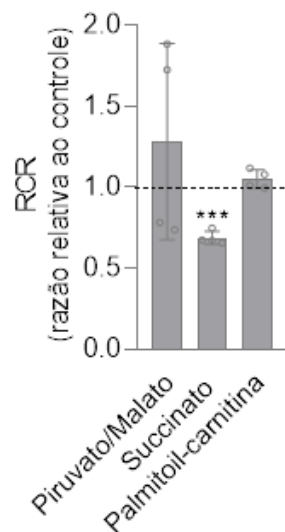


Figura 29. NS3prohel reduz a respiração mitocondrial associada à oxidação de succinato. RCR de mitocôndrias isoladas incubadas com NS3prohel usando malato/piruvato, succinato e palmitoil-carnitina como substratos. ***, $p=0,0006$.

5.7. A transfecção de NS3prohel prejudica o consumo de oxigênio associado ao succinato nas mitocôndrias de células permeabilizadas

Reunidos, os resultados indicam que a proteína NS3 do DENV tem potencial para alterar o metabolismo mitocondrial. É importante avaliar se os efeitos desencadeados por NS3 são fisiologicamente relevantes, logo expressar NS3 dentro de uma célula torna-se necessário. As metodologias empregadas anteriormente para expressão de NS3 não se mostraram eficientes, então decidimos expressar NS3prohel em células HEK293T para avaliar possíveis diferenças no padrão respiratório mitocondrial. Optamos por utilizar células HEK293T, já que esta linhagem celular é conhecida como sendo fácil de transfectar (Baldi *et al.*, 2007).

As células HEK293T foram transfectadas e analisadas nos tempos de 12, 18 e 24 h pós transfecção. Como esperado, observamos um aumento gradual na expressão de NS3 por *western blotting* (**Figura 30A**) após a transfecção das células. Para verificar o percentual de células transfectadas, conduzimos ensaios de imunofluorescência. Em 12 h após a transfecção, observamos uma média de 13% de células com marcação positiva para NS3. Em 18 h, a marcação positiva foi observada em 11,6% das células, e em 24 h em 19,3% das células (**Figura 30B**). Dessa forma, observamos uma baixa eficiência de transfecção, assim como nossas tentativas anteriores de transdução com outras linhagens celulares. Verificamos se a baixa porcentagem de expressão estava relacionada à morte celular, mas não observamos alterações na viabilidade entre as células transfectadas com NS3 e as células controle transfectadas com o vetor vazio (**Figura 30C**). Estes dados reforçam nossa hipótese de que as células possuam mecanismos imunes inatos que bloqueiam a expressão de NS3 ou direcionam NS3 para degradação, e que, durante a infecção natural, esses mecanismos são pelo menos parcialmente neutralizados por outras proteínas virais ou não são eficazes no local de replicação viral. Não encontramos aqui nenhuma evidência de que a expressão de NS3 cause toxicidade às células, seja por análise morfológica ou por ensaio de viabilidade.

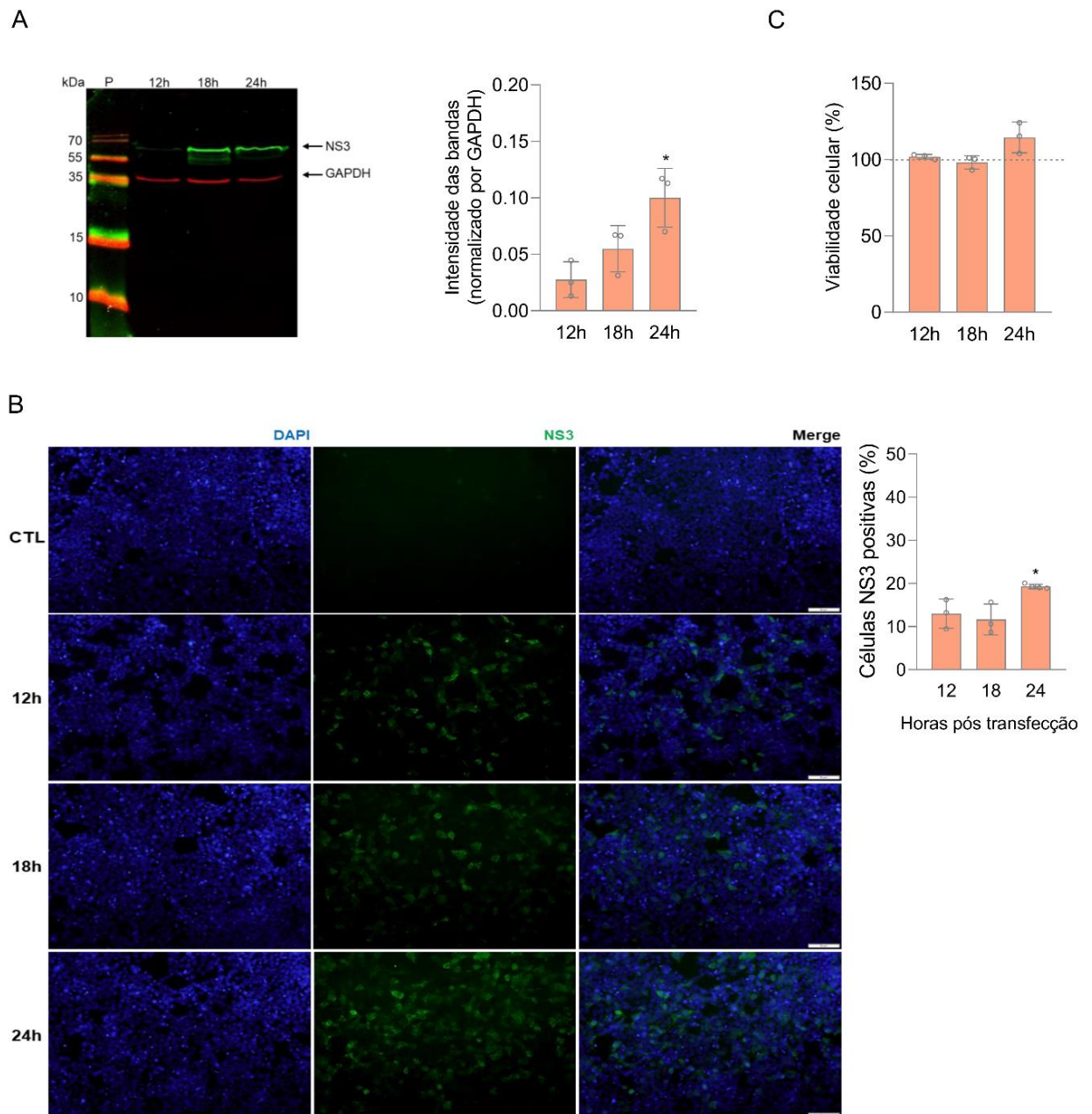


Figura 30. Expressão de NS3 em células HEK293T transfectadas. (A) Western blotting e análise quantitativa de densidade das bandas de extratos de proteínas totais de HEK293T transfectadas com pcDNA3.1_NS3 coletados 12, 18 e 24 h pós transfecção. A proteína NS3 apresenta 70 kDa e é observada com marcação verde. A proteína GAPDH, com 37 kDa, observada com marcação vermelha, foi utilizada como controle de carregamento de proteína. P: padrão de peso molecular. *, $p=0,0171$ (significância entre 12 e 24h). (B) Imunofluorescência de células HEK293T após diferentes tempos de transfecção. As células foram marcadas com anticorpos anti-NS3 (verde), e analisadas por microscopia de fluorescência com objetiva de 20x. Os núcleos foram corados com DAPI (azul). A barra de escala corresponde a 50 μm . CTL: controle de transfecção (vetor vazio). O gráfico mostra a porcentagem de células com marcação positiva para NS3 nos diferentes tempos analisados. *, $p=0,0209$ (significância entre 18 e 24h). (C) Viabilidade celular relativa ao controle de transfecção (uso de vetor vazio), analisada pelo ensaio de redução de MTT. Todos os dados estão expressos como média \pm desvio padrão.

Embora a taxa de transfecção tenha sido baixa, conduzimos ensaios de respirometria de alta resolução em células intactas ou permeabilizadas previamente transfectadas com NS3 ou com o vetor vazio para ver se pelo menos alguns dos efeitos observados em mitocôndrias isoladas se reproduzem em células expressando NS3. Nos experimentos com células intactas é possível avaliarmos o consumo de oxigênio associado à oxidação de substratos endógenos e dos presentes no meio de cultura. Nessa condição não só o metabolismo mitocondrial, mas também o metabolismo celular por completo contribui para o resultado observado. O resultado tanto depende da capacidade das células de captar metabólitos, metabolizá-los dentro das células (por diversas vias como glicólise, catabolismo de aminoácidos, glicogenólise etc.) quanto de sua utilização nas mitocôndrias. Já nos experimentos com células permeabilizadas, rompemos a membrana plasmática para que substratos diretamente utilizados pelas mitocôndrias (succinato, piruvato, malato etc.) sejam acessíveis. Nesse processo, o metabolismo citoplasmático e de outras organelas fica prejudicado. Dessa forma, os experimentos com células permeabilizadas se assemelham mais aos de mitocôndrias isoladas. Ele será importante, no entanto, para analisarmos se as células conseguiriam expressar NS3 em níveis suficientes para vermos os mesmos efeitos na função mitocondrial que observamos em mitocôndrias isoladas incubadas com NS3 recombinante.

Avaliamos diferentes parâmetros em células intactas. A respiração basal corresponde ao OCR das células mantidas em meio de cultura completo (DMEM). A respiração acoplada corresponde ao OCR associado à síntese de ATP e é calculado subtraindo-se a respiração *leak* da respiração basal. A respiração *leak* corresponde ao OCR medido na presença de oligomicina, um inibidor da ATP sintase, que impede que os prótons retornem à matriz mitocondrial pela fosforilação oxidativa. Dessa forma, o OCR da respiração *leak* reflete o vazamento de prótons através da membrana mitocondrial interna e corresponde à respiração desacoplada da síntese de ATP na ausência de um desacoplador. Por fim, a respiração máxima corresponde ao OCR medido na presença de FCCP, um ionóforo que desfaz o gradiente de prótons, levando o ETS a operar em sua capacidade máxima de transporte de elétrons. Em células intactas, não observamos nenhuma diferença do OCR entre a condição controle (vetor vazio) e células transfectadas com NS3 (**Figura 31A**).

Já nas células permeabilizadas, observamos uma diminuição discreta (de 8% em média), mas significativa ($p=0,0365$), na oxidação do substrato respiratório succinato, mas não na oxidação dos substratos piruvato e malato quando comparado ao controle (**Figura 31B**).

Esses dados indicam que a expressão de NS3 é capaz de recapitular pelo menos parcialmente os efeitos observados em mitocôndrias isoladas incubadas com NS3pro. Dessa forma, podemos dizer que essas células possuem a capacidade de sintetizar NS3 em níveis suficientes para vermos seus efeitos na oxidação de succinato. É importante ressaltar que tais efeitos provavelmente foram pequenos porque apenas cerca de 20% da população de células transfectadas de fato expressavam NS3 (**Figura 30B**).

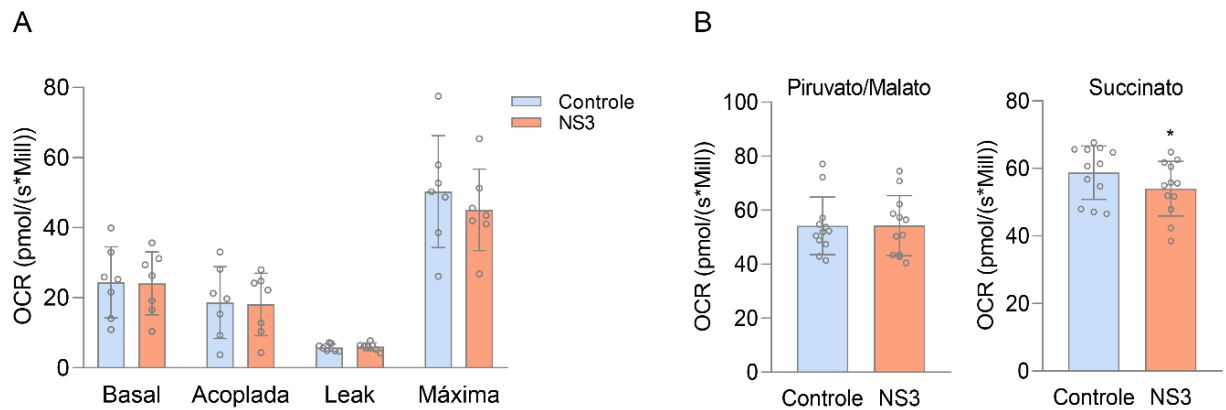


Figura 31. A oxidação de succinato diminui em células HEK293T que expressam NS3. (A) A taxa de consumo de oxigênio (OCR) foi avaliada por respirometria de alta resolução em uma suspensão de células intactas analisadas em DMEM. (B) Respirometria de alta resolução em suspensão de células permeabilizadas com digitonina em meio de respiração MIR05. O primeiro gráfico mostra a respiração acoplada associada à oxidação de piruvato e malato, e o segundo a associada à oxidação de succinato. O controle (azul) representa o resultado obtido com células HEK293T transfectadas com o vetor vazio, e "NS3" (laranja) resultado obtido com células que expressam NS3. Os dados estão expressos como média ± desvio padrão. *, p=0,0365.

6. DISCUSSÃO

6.1. Proteínas virais associadas à mitocôndria

Na análise proteômica por espectrometria de massas, observamos que das dez proteínas do DENV, seis (NS1, NS2A, NS3, NS4A, NS5 e proteína E) foram encontradas nas amostras de mitocôndrias isoladas de células hepáticas infectadas por DENV. Essa análise foi uma abordagem inicial na busca de proteínas virais que poderiam estar associadas a modulação do metabolismo mitocondrial, e trata-se de um mapeamento em triplicata técnica usado como base para os experimentos subsequentes. Identificamos peptídeos únicos (exclusivos) dessas proteínas, o que é um parâmetro importante que contribui para a confiabilidade da análise.

Dentre os flavivírus, existem outros casos de proteínas virais que se associam a mitocôndrias. Por exemplo, a proteína NS5 do vírus da encefalite japonesa (JEV) já foi detectada em mitocôndrias, interagindo com a proteína trifuncional mitocondrial (TFP, do inglês *trifunctional protein*) (Kao *et al.*, 2015). Essa enzima catalisa três das quatro reações da via de β -oxidação de ácidos graxos de cadeia longa, e ao interagir com a TFP, a NS5 de JEV afeta a oxidação desses substratos. Já proteína C do vírus da hepatite C (HCV) associa-se à membrana externa mitocondrial (Schwer *et al.*, 2004) provocando o aumento da captação de cálcio, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e inibição seletiva do complexo I (Korenaga *et al.*, 2005). As proteínas NS4B e p7 do HCV também parecem se associar a mitocôndrias ou a MAMs. Resultados de um experimento de interactoma sugeriram que essas proteínas poderiam interagir com duas subunidades da ATP sintase (ATP5H e MTATP6) (Ramage *et al.*, 2015). Foi descrito que p7 diminui a síntese de ATP e causa despolarização mitocondrial (You *et al.*, 2017). Posteriormente, outro estudo mostrou que as proteínas C, E2, p7, NS5A e NS3 do HCV podem ser encontradas em MAMs, mas que NS3 é enriquecida em frações mitocondriais. Além disso, a proteína C e NS3 parecem interagir com VDAC1 (do inglês *anti-voltage dependent anion channel 1*), uma porina localizada na membrana mitocondrial externa que regula o transporte de metabólitos e íons para o espaço intermembranar, assim como a liberação de fatores pró-apoptóticos, mas o papel dessa interação não é claro (Duponchel *et al.*, 2023). NS4B do DENV e do vírus do Zika (ZIKV) induzem alongamento mitocondrial, mas essas proteínas não foram encontradas nas mitocôndrias e sim colocalizadas com membranas convolutas e MAMs (Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Barbier *et al.*, 2017). Esses dados são um indicativo de que a interação de proteínas virais com as mitocôndrias

possa ser facilitada durante a infecção. Para o DENV, parece que a interação de proteínas virais com as mitocôndrias pode ser de fato facilitada, pois já foi descrito que as membranas convolutas, membranas derivadas do RE enriquecidas de proteínas virais, entram em contato físico com as mitocôndrias. Essa interação provavelmente favorece o alongamento mitocondrial induzido por NS4B, já que esses contatos ocorrem entre as membranas convolutas e mitocôndrias alongadas. Por sua vez, o alongamento mitocondrial favorece a replicação do DENV (Chatel-Chaix *et al.*, 2016).

Como mencionado, encontramos NS3 em mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas por DENV com uma excelente cobertura de sua sequência de aminoácidos. Esse é um indicativo bastante significativo de que essa proteína se localiza nas mitocôndrias durante a infecção. Apesar de que a maior parte de NS3 também se associe ao RE durante a infecção (Reid *et al.*, 2018), ela possui um sinal de endereçamento que permite sua translocação para matriz mitocondrial (Gandikota *et al.*, 2020) e foi identificada em frações enriquecidas de mitocôndrias (Chatel-Chaix *et al.*, 2016; Barbier *et al.*, 2017). Esses estudos sustentam que, além de seu papel durante replicação viral, NS3 também é endereçada para as mitocôndrias, onde desempenhariam outras funções. Aqui, desvendamos um possível papel da proteína NS3 do DENV na modulação do metabolismo mitocondrial.

6.2. Alterações do metabolismo mitocondrial induzidas por NS3

Em nossos experimentos de proteômica, encontramos proteínas celulares moduladas negativamente nas mitocôndrias (reduzidas pelo menos duas vezes em relação ao mock) de células Huh7 infectadas pelo DENV, sendo a maioria delas relacionada ao metabolismo energético. NDUFA9 está entre essas proteínas identificadas e é importante para estabilização da junção entre a parte intermembranar do complexo I e o braço do complexo que fica voltado para matriz mitocondrial. Essa estabilização é crítica para a montagem e atividade do complexo I (Stroud *et al.*, 2013). A diminuição da expressão dessa proteína pode ser um indicativo de que a atividade do complexo I possa ser afetada durante a infecção pelo DENV. Considerando que parte das proteínas identificadas com níveis reduzidos pertenciam ao ETS e os indícios da presença de NS3 nas mitocôndrias, investigamos se essa proteína viral poderia afetar a função mitocondrial.

Inicialmente conduzimos experimentos com a protease NS3 por já ter sido mostrado anteriormente que a entrada deste domínio de NS3 na mitocôndria era mais eficiente do que a importação da proteína inteira (Gandikota *et al.*, 2020). Nossa intenção com esta estratégia foi a de que ela permitisse a observação mais clara dos efeitos causados pela proteína. No entanto, não existem relatos do domínio protease ser encontrado sem o domínio helicase durante a infecção pelo DENV. Em células de mamíferos, apenas uma clivagem dentro do domínio helicase já foi descrita. Essa clivagem gera um fragmento de 50 kDa correspondente a cerca de 460 resíduos a partir do N-terminal de NS3 (Arias, Preugschat e Strauss, 1993). Contudo, a possibilidade de uma clivagem entre os domínios não pode ser completamente descartada. Essa região é susceptível a atividade de proteases *in vitro*, o que foi descrito para outro flavivírus, o vírus do Oeste do Nilo (WNV) (Wengler e Wengler, 1991).

Confirmando a nossa hipótese de que a NS3pro afeta o funcionamento mitocondrial, observamos uma inibição da respiração acoplada. Na presença de múltiplos substratos, o efeito de NS3pro na respiração acoplada não pareceu ser dose-dependente. Com 200 nM e 300 nM de proteína a diminuição no consumo de oxigênio foi bem próxima. Já com 600 nM, os efeitos foram bem mais proeminentes. Parece haver um limiar do efeito associado ao domínio protease, pois essa queda drástica no consumo de oxigênio não ocorre com a protease cataliticamente inativa na concentração de 600 nM. Nesta tese, optamos por investigar os efeitos de 300 nM de NS3 a fim de evitar possíveis efeitos proteolíticos inespecíficos que poderiam ocorrer com altas concentrações dessa proteína.

NS3pro de DENV é capaz de clivar pequenos peptídeos cromogênicos *in vitro* (Yusof *et al.*, 2000; Phong *et al.*, 2011), além da proteína mitocondrial GrpEL1 *in vitro* e em células transfectadas (Gandikota *et al.*, 2020). Esses trabalhos também apontam que a atividade catalítica de NS3pro é menor que do que quando está associada ao seu cofator NS2B. Outros estudos, incluindo o que descreveu uma região de 40 resíduos de aminoácidos de NS2B que é essencial para atividade do complexo NS2B-NS3 (Falgout, Miller e Lai, 1993), apontam que NS2B é necessária para clivagem de peptídeos maiores (substratos tetrapeptídicos, por exemplo) e da poliproteína viral. Não identificamos NS2B na análise proteômica de mitocôndrias isoladas de células Huh7 infectadas pelo DENV. Contudo, NS2B é uma proteína transmembranar do RE que se mostrou essencial para o recrutamento de NS3 do ZIKV para o complexo de replicação viral, onde NS3 realiza a maioria das funções relacionadas à replicação viral (Xing *et al.*, 2020). NS2B pode estar localizada em outras regiões do RE que não as regiões

de contato com as mitocôndrias e NS3 poderia entrar na mitocôndria livremente, já que ocorre a clivagem na junção NS2B/NS3.

Testamos a atividade de NS3pro usando o peptídeo cromogênico cloridrato Bz-Arg-AMC, mas não obtivemos sucesso, possivelmente nosso protocolo precise de adequações. Ainda assim, consideramos NS3pro como uma protease ativa nos baseando nos efeitos distintos observados com a protease mutada cataliticamente inativa, NS3proS135A. Além disso, como mencionado, NS3pro sozinha é capaz de clivar GrpEL1 (Gandikota *et al.*, 2020). Dessa forma, é possível que alguma interação dentro do microambiente mitocondrial possa favorecer a atividade de NS3pro.

6.3. Efeitos da NS3 na oxidação de diferentes substratos na mitocôndria

Um dos resultados mais interessantes desta tese foi a observação de um efeito diferencial da NS3pro sobre a utilização de diferentes substratos energéticos. NS3pro afetou tanto a respiração associada à malato/piruvato quanto a de succinato quando fornecidos separadamente. Os efeitos mais proeminentes, entretanto, são observados na respiração quando succinato, substrato do complexo II do ETS, é o substrato energético fornecido. É interessante destacar que a redução do RCR associada à oxidação de succinato foi anteriormente reportada em células hepáticas HepG2 durante a infecção pelo DENV (El-Bacha *et al.*, 2007). Nossos dados sugerem fortemente que NS3 pode ser a responsável por esse efeito durante a infecção. A diminuição do RCR não se deve a um efeito direto no complexo II dado que a sua atividade não foi afetada por NS3 nos ensaios enzimáticos. Também observamos que a diminuição no RCR não está associada a uma atividade direta de NS3 sob complexo IV, embora ocorra uma aparente diminuição na respiração quando TMPD e ascorbato, substratos diretos do complexo IV, são utilizados como substratos para mitocôndrias isoladas incubadas com NS3pro. Esta diminuição provavelmente está relacionada ao fato de o TMPD entregar elétrons ao citocromo c que posteriormente os entrega ao complexo IV. Logo, suspeitamos que a função do citocromo c pudesse estar comprometida na presença de NS3pro. De fato, aqui mostramos que ação de NS3 no consumo de oxigênio dependente de succinato, mas não de piruvato/malato ou palmitoil-carnitina, é dependente de uma interferência na função do citocromo c. Isso foi evidente ao mostrarmos que, em mitocôndrias incubadas com NS3pro, o OCR é restaurado para os níveis do controle após suplementação com citocromo c.

Outro aspecto interessante quanto aos efeitos diferenciais no consumo de diferentes substratos é a dependência ou não da atividade protease de NS3. A oxidação de malato e piruvato, assim como de palmitoil-carnitina, parece ser dependente da atividade protease de NS3, uma vez que o mesmo efeito não é observado quando a protease cataliticamente inativa é utilizada. Já a diminuição da respiração associada a oxidação de succinato, que é dependente de citocromo c, parece ser independente da atividade protease. De acordo com esses dados, não observamos qualquer degradação de citocromo c recombinante quando incubado com NS3pro, reforçando a ausência de proteólise.

Nesta tese não exploramos se os efeitos de NS3 na ETS dependem de sua importação para a mitocôndria. Dessa forma, não podemos descartar a possibilidade de que NS3 afete a respiração mitocondrial interagindo com componentes da superfície dessa organela. Uma vez que o prejuízo induzido por NS3 na utilização de succinato nas mitocôndrias parece depender do citocromo c, uma possibilidade seria NS3 induzir a liberação de citocromo c da mitocôndria ao alterar a permeabilidade da membrana mitocondrial externa. Este mecanismo foi descrito para outros vírus que induzem apoptose em células infectadas (Galluzzi *et al.*, 2008). Por exemplo, as proteínas NS3/NS4A do HCV causam a translocação da proteína pró-apoptótica X associada à Bcl-2 (BAX, do inglês *Bcl-2 associated X-protein*) para as mitocôndrias, permeabilização da membrana externa mitocondrial e liberação de citocromo c de células transfectadas, induzindo apoptose (Nomura-Takigawa *et al.*, 2006, Deng *et al.*, 2008; Javed e Manzoor, 2018).

No entanto, nossos dados não sustentam essa possibilidade, pois não observamos alterações na capacidade de formação de potencial de membrana entre as mitocôndrias incubadas com NS3 e as controle. Logo, podemos dizer que NS3 não afeta a permeabilidade da membrana mitocondrial interna. Isso, no entanto, ainda não descarta a possibilidade de um prejuízo da membrana externa por NS3. Porém, a oxidação de malato e piruvato não é afetada em mitocôndrias de células transfectadas ou mitocôndrias isoladas incubadas com NS3prohel. Isso sugere que as mitocôndrias incubadas com NS3prohel continuam funcionais, plenamente capazes de gerar ATP na presença de outros substratos a despeito de um comprometimento específico na oxidação de succinato. Somado a isso, não foi observado comprometimento da viabilidade celular das células transfectadas com NS3prohel, indicando que não está ocorrendo uma liberação maciça de citocromo c no citoplasma, o que induziria apoptose. Em vez disso, é mais concebível que NS3 se ligue ao citocromo c, prejudicando assim o transporte de elétrons.

Essa possibilidade é bastante interessante, pois poderia também representar um mecanismo anti-apoptótico induzido pelo DENV. Se NS3 for mesmo capaz de interagir com o citocromo c, é possível que ela impeça que o citocromo c se associe ao fator 1 ativador da peptidase apoptótica (Apaf1, do inglês *apoptotic peptidase activating factor 1*), inibindo então a formação do apoptossoma. Diversos vírus se utilizam de mecanismos anti-apoptóticos para aumentar a viabilidade da célula hospedeira e permitir uma maior produção de partículas virais (Galluzzi *et al.*, 2008). Pretendemos explorar essa possibilidade no futuro. Não havendo interação entre NS3 e citocromo c, outra possibilidade é NS3 prevenir a associação do citocromo c com os complexos respiratórios (III e IV) de forma indireta.

Uma questão enigmática é porque o consumo de oxigênio é restaurado aos níveis do controle com a suplementação com citocromo c somente quando succinato é o substrato energético fornecido. Existem algumas possíveis explicações para isso. Uma delas seria a existência de pools distintos de citocromo c nas mitocôndrias que se associam independentemente a diferentes complexos respiratórios. A segunda seria que NS3 possa interferir com fatores de montagem que regulam a associação de supercomplexos específicos contendo os complexos III e IV que preferencialmente recebem elétrons do complexo II, em vez de interferir diretamente no citocromo c. A terceira possibilidade seria existência de diferentes subpopulações de mitocôndrias no fígado que são mais enriquecidas em complexo II e mais propensas às ações NS3. Evidências estruturais e funcionais reportadas atualmente na literatura fornecem bases que sustentam as duas primeiras hipóteses.

Como mencionado anteriormente, os complexos respiratórios podem se associar de forma dinâmica e formar SC. Um estudo mostrou que a formação de SC pode modular o uso de substratos energéticos (Lapunte-Brun *et al.*, 2013). Por exemplo, nesse estudo o silenciamento do complexo I desfaz a associação do complexo III que fazia parte de supercomplexos contendo CI e aumenta o transporte de elétrons através dos complexos II e III. Dessa forma, pode-se concluir que existem duas populações de complexo III, uma ligada aos SC e outra não. O complexo III presente no SC recebe elétrons vindos do NADH via complexo I, enquanto o *pool* de complexo III que não faz parte dos SC pode receber os elétrons do FADH₂ via complexo II ou vindos de outros complexos que possuem FAD como grupo prostético (Lapunte-Brun *et al.*, 2013). Já foi descrito que os SC podem conter um *pool* de ubiquinona e citocromo c específico dedicado aos elétrons provenientes do NADH, que fica associado aos SC formados com o complexo I (Acín-Pérez *et al.*, 2008; Lapunte-Brun *et al.*, 2013). Além

disso, existe um *pool* de ubiquinona e citocromo c associado a um *pool* de complexo IV que não faz parte dos SC e que pode receber elétrons do FADH₂. Dessa forma, as diferentes populações de complexos IV permitem que as mitocôndrias oxidem vários substratos simultaneamente, minimizando a inibição competitiva entre a utilização de piruvato e succinato, por exemplo (Lapiente-Brun *et al.*, 2013). Assim, é possível que NS3 interfira apenas com *pools* de citocromo c ligados ao complexo IV que recebem elétrons de enzimas dependentes de FADH₂ (como a succinato desidrogenase). Esses *pools* de citocromo c poderiam ser mais acessíveis a NS3. Por outro lado, o pool de citocromo c que participa dos supercomplexos contendo o complexo I estariam menos expostos e/ou seriam menos vulneráveis às ações da NS3. Alternativamente, NS3 poderia alterar a formação desses supercomplexos modulando seus fatores de montagem. Qualquer que seja o mecanismo, ao atuar especificamente sobre a utilização do succinato, a NS3 do DENV pode acabar modulando a fonte de carbono utilizada para o metabolismo oxidativo nas células infectadas.

Já o efeito observado com palmitoil-carnitina, no qual a suplementação com citocromo c não restaura o OCR, pode estar relacionado a interação de enzimas da β -oxidação de ácidos graxos com o SC formado pelos complexos I, III e IV. O contato físico entre as enzimas da β -oxidação e esse SC ocorre em dois pontos. O primeiro ponto de contato ocorre entre o domínio de ligação ao NADH do complexo I e TFP, que realiza três das quatro reações necessária para o encurtamento de ácidos graxos de cadeia longa (Wang *et al.*, 2019), como a palmitoil-carnitina. TFP possui duas subunidades, α e β , a subunidade α possui atividade enoil-CoA hidratase e 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, e a subunidade β possui atividade 3-cetoacil-CoA tiolase. A reação catalisada pela 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase gera NADH (Eaton *et al.*, 2000). O NADH pode ser canalizado diretamente para o domínio de ligação ao NADH do complexo I (Wang *et al.*, 2019). O segundo ponto de contato é entre ETF:QO, que recebe elétrons vindos do FADH₂ durante a β -oxidação, e o complexo III presente no SC. Os elétrons vindos do FADH₂ seriam transferidos para a ubiquinona e logo em seguida para o complexo III (Wang *et al.*, 2019). Cabe lembrar que acetil-CoA também é produzido na β -oxidação e pode entrar no ciclo de Krebs. Logo, o *pool* de citocromo c presente nesse SC também pode não ser afetado por NS3.

Em células transfectadas com NS3prohel, só observamos a redução da respiração associada à oxidação de succinato, que foi o efeito mais significativo em mitocôndrias isoladas. Nenhum efeito foi observado quando malato e piruvato foram usados como substratos.

Diferentemente da NS3pro, a NS3prohel também não interferiu na oxidação de malato e piruvato em mitocôndrias isoladas. Isso pode estar relacionado à maior eficiência de entrada de NS3pro na mitocôndria, como mencionado anteriormente (Gandikota *et al.*, 2020). Comparando a diminuição no RCR de mitocôndrias isoladas incubadas com NS3pro e NS3prohel, o efeito mais proeminente foi o da NS3pro, o que está de acordo com essa possibilidade. Além disso, como a eficiência de transfecção foi baixa, representando apenas 20% do total de células, efeitos mais tênues de NS3prohel podem estar sendo mascarados pela presença de um número muito maior de células não transfectadas, que, portanto, não apresentam influência da NS3. É interessante ressaltar que a porcentagem de expressão de NS3 foi baixa independente do sistema de expressão utilizado, o que pode estar relacionado a diversas explicações. NS3 do ZIKV pode sofrer ADP-ribosilação por uma das isoformas da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP, do inglês *poly (ADP-ribose) polymerase*), a PARP12, enzima conhecida por atuar na resposta imune inata a patógenos, o que desencadeia sua degradação proteossomal (Li *et al.*, 2018 e 2021). Considerando que NS3 é altamente conservada entre flavivírus (Papageorgiou *et al.*, 2016), pode ser que a NS3 do DENV seja reconhecida por mecanismos imunes inatos semelhantes que desestabilizam a proteína na célula hospedeira. A maior expressão da NS3 nas células infectadas (comparado à transdução ou transfecção) sugere que durante a infecção natural esses mecanismos seriam pelo menos parcialmente neutralizados por componentes virais, ou que NS3 se encontre em um ambiente celular mais protegido, favorecendo sua estabilização.

7. CONCLUSÕES

Encontramos a NS3 do DENV associada às mitocôndrias de células infectadas e identificamos proteínas relacionadas ao metabolismo moduladas negativamente durante a infecção pelo DENV, reforçando que o metabolismo energético mitocondrial é impactado durante a infecção.

NS3pro diminui o consumo de oxigênio mitocondrial quando malato e piruvato são utilizados como substratos energéticos, de maneira dependente da atividade protease de NS3. NS3pro também afeta a capacidade respiratória mitocondrial quando palmitoil-carnitina é o substrato energético fornecido. O domínio protease individualmente não foi descrito durante uma infecção natural, logo a relevância fisiológica de NS3pro na oxidação de malato/piruvato e palmitoil-carnitina é incerta.

NS3pro inibe a respiração mitocondrial induzida por succinato prejudicando *pools* específicos de citocromo c nas mitocôndrias de maneira independente da atividade protease de NS3. Os efeitos sobre o consumo de oxigênio dependente de succinato foram confirmados tanto em mitocôndrias isoladas utilizando NS3prohel recombinante, quanto em células transfectadas com NS3, o que indica que esses efeitos provavelmente ocorrem durante a infecção por DENV.

Nossos dados sugerem que NS3 pode ser um dos atores moleculares que medeiam as alterações metabólicas em células infectadas por DENV, interferindo diretamente no ETS de maneira substrato-específica. Nossos achados foram os primeiros a demonstrar o potencial de NS3 em modular diretamente o metabolismo mitocondrial, interferindo em componentes do ETS.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A. e Enriquez, J.A. (2008). Respiratory Active Mitochondrial Supercomplexes. *Molecular Cell* 32, 529–539.
- Andrieux, P., Chevillard, C., Cunha-Neto, E. e Nunes, J. P. S. (2021). Mitochondria as a Cellular Hub in Infection and Inflammation. *Int J Mol Sci.* 22, e11338.
- Angleró-Rodríguez, Y.I., Pantoja, P., e Sariol, C.A. (2014). Dengue virus subverts the interferon induction pathway via NS2B/3 protease-IκB kinase epsilon interaction. *Clin Vaccine Immunol.* 21, 29-38.
- Arias, C.F., Preugschat, F., e Strauss, J.H. (1993). Dengue 2 Virus NS2B and NS3 Form a Stable Complex That Can Cleave NS3 within the Helicase Domain. *Virology* 193, 888-899.
- Arora S., Nathaniel S.D., Paul J.C., e Hansdak S.G. (2015). Acute liver failure in dengue haemorrhagic fever. *BMJ Case Rep.* 209443.
- Assunção-Miranda, I., Amaral, F.A., Bozza, F.A., Fagundes, C.T., Sousa, L.P., Souza, D.G., Pacheco, P., Barbosa-Lima, G., Gomes, R.N., Bozza, P.T., Da Poian, A.T., Teixeira, M.M., Bozza, M.T. 2010. Contribution of macrophage migration inhibitory factor to the pathogenesis of dengue virus infection. *FASEB J.* 24, 218-228.
- Baldi, L., Hacker, D. L., Adam, M. e Wurm, F. M. (2007). Recombinant protein production by large-scale transient gene expression in mammalian cells: state of the art and future perspectives. *Biotechnology Letters* 29, 677–684.
- Basílio-de-Oliveira C.A., Aguiar G.R., Baldanza M.S., Barth O.M., Eyer-Silva W.A., Paes M.V. (2005). Pathologic study of a fatal case of dengue-3 virus infection in Rio de Janeiro, Brazil. *Braz J Infect Dis.*, 9, 341-347.
- Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, A.L., e Medin, C.L. (2017). Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* 500, 149-160.
- Baron, U. e Bujard, H (2000). Tet repressor-based system for regulated gene expression in eukaryotic cells: Principles and advances. *Methods in Enzymology* 327, 401-421.
- Biswas, H.H., Gordon, A., Nuñez, A., Perez, M.A., Balmaseda, A., e Harris, E. (2015). Lower Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels Are Associated with Severe Dengue Outcome. *PLoS Negl Trop Dis.* 9, e0003904.
- Blum, T. B., Hahn, A., Meier, T. e Kühlbrandt, W. (2019). Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Biophysics and Computational Biology* 116, 4250-4255.
- Bozidis, P., Williamson, C. D., e Colberg-Poley, A. M. (2007). Isolation of endoplasmic reticulum, mitochondria, and mitochondria-associated membrane fractions from transfected cells and from human cytomegalovirus-infected primary fibroblasts. *Curr Protoc Cell Biol*, chapter 3, unit 3.27.
- Brand, M. D. e Nicholls, D. G. (2011). Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J.* 435, 297–312.
- Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C.J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A., e Bartenschlager, R. (2016). Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe.* 20, 342–356.
- Chiang, P.Y., e Wu, H.N. (2016). The role of surface basic amino acids of dengue virus NS3 helicase in viral RNA replication and enzyme activities. *FEBS Letters* 590, 2307-2320.
- Chua, J.J., Ng, M.M., e Chow VT. (2004). The non-structural 3 (NS3) protein of dengue virus type 2 interacts with human nuclear receptor binding protein and is associated with alterations in membrane structure. *Virus Res.* 102, 151-163.

- Cogliati, S., Cabrera-Alarcón, J. L. e Enriquez, J. A. (2021). Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochem Soc Trans.* 49, 2655–2668.
- Coroadinha, A.S., Gama-Norton, L., Amaral, A.I., Hauser, H., Alves, P.M., e Cruz, P.E. (2010). Production of retroviral vectors: review. *Curr Gene Ther.* 10, 456-473.
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J.M., Conceição, T.M., Higa, L.M., Castanho, M.A., e Da Poian, A.T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 39, 155-170.
- Da Poian, A.T., e Castanho, M.A.R.B (2021). *Integrative Human Biochemistry*. Springer New York, NY. 2. ed., p. 364-367.
- Davidson, R.B., Hendrix, J., Geiss, B.J., e McCullagh, M. (2018). Allosteric in the dengue virus NS3 helicase: Insights into the NTPase cycle from molecular simulations. *PLoS Comput Biol.* 14, e1006103.
- Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B. e Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Biophysics and Computational Biology* 108, 14121-14126.
- Decroly, E., Ferron, F., Lescar, J., e Canard, B. (2011). Conventional and unconventional mechanisms for capping viral mRNA. *Nat Rev Microbiol.* 10, 51-65.
- Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I. e Hotta, H. (2008). Hepatitis C Virus Infection Induces Apoptosis through a Bax-Triggered, Mitochondrion-Mediated, Caspase 3-Dependent Pathway. *Journal of Virology* 82, 10375–10385.
- Dudkina, N. V., Kouřil, R., Peters, K., Braun, H. e Boekema, E. J. (2010) Structure and function of mitochondrial supercomplexes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1797, 664–670.
- Duponchel, S., Monnier, L., Molle, J., Bendridi, N., Alam, M. R., Gaballah, A., Grigorov, B., Ivanov. A., Schmiel, M., Odenthal, M., Ovize, M., Rieusset, J., Zoulim, F. e Bartosch, B. (2023). Hepatitis C virus replication requires integrity of mitochondria-associated ER membranes. *JHEP Reports* 5, e100647.
- Durán, A., Carrero, R., Parra, B., González, A., Delgado, L., Mosquera, J., e Valero, N. (2015). Association of lipid profile alterations with severe forms of dengue in humans. *Arch Virol.* 160, 1687-1692.
- Eaton, S., Bursby, T., Middleton, B., Pourfarzam, M., Mills, K., Johnson, A. J. e Bartlett, K. (2000). The mitochondrial trifunctional protein: centre of a beta-oxidation metabolon? *Biochem Soc Trans.* 28, 177-182.
- El-Bacha, T., Midlej, V., Silva, A.P.P., Costa, L.S., Benchimol, M., Galina, A., e Da Poian, A.T. (2007). Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1772, 1158-1166.
- El-Bacha, T., Struchiner, C.J., Cordeiro, M.T., Almeida, F.C.L., Marques, E.T. Jr., e Da Poian, A.T. (2016). 1H Nuclear Magnetic Resonance Metabolomics of Plasma Unveils Liver Dysfunction in Dengue Patients. *Journal of Virology* 90, 7429-7443.
- Eramo, M. J., Lisnyak, V., Formosa, L. E. e Ryan, M. T. (2020). The 'mitochondrial contact site and cristae organising system' (MICOS) in health and human disease. *J Biochem.* 167, 243-255.
- Falgout, B., Pethel, M., Zhang, M.Y., e Lai, C.J. (1991). Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of Virology* 65, 2467–2475.
- Falgout, B., Miller, R.H. e Lai, C. J. (1993). Deletion analysis of dengue virus type 4 nonstructural protein NS2B: identification of a domain required for NS2B-NS3 protease activity. *Journal of Virology* 67, 2034–2042.
- Fernandes-Siqueira, L.O., Zeidler, J.D., Sousa, B.G., Ferreira, T., e Da Poian, A.T. (2018). Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during Dengue Virus Infection. *mSphere* 3, e00458-17.
- Frezza, C., Cipolat, S. e Scorrano, L. (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nature Protocols* 2, 287–295.
- Fontaine, K.A., Sanchez, E.L., Camarda, R., e Lagunoff M. (2015). Dengue Virus Induces and Requires Glycolysis for Optimal Replication. *Journal of Virology* 89, 2358–2366.
- Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z. e Kroemer, G. (2008). Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. *PLoS Pathog.* 4, e1000018.

- Gandikota, C., Mohammed, F., Gandhi, L., Maisnam, D., Mattam, U., Rathore, D., Chatterjee, A., Mallick, K., Billoria, A., Prasad, V.S.V., Sepuri, N.B.V.S., e Venkataramana, M. (2020). Mitochondrial Import of Dengue Virus NS3 Protease and Cleavage of GrpEL1, a Cochaperone of Mitochondrial Hsp70. *Journal of Virology* 94, e01178-20.
- García Cordero, J., León Juárez, M., González-Y-Merchand, J.A., Cedillo Barrón, L., e Gutiérrez Castañeda, B. (2014). Caveolin-1 in lipid rafts interacts with dengue virus NS3 during polyprotein processing and replication in HMEC-1 cells. *PLoS One* 9, e90704.
- Gilkerson, R. W., Selker, J. M. L. e Capaldi, R. A. (2003). The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Letters* 546, 355-358.
- Glancy, B., Kim, Y., Katti, P. e Willingham, B. (2020). The Functional Impact of Mitochondrial Structure Across Subcellular Scales. *Front. Physiol.* 11, e541040.
- Guzman, M. G., Gubler, D.J., Izquierdo, A., Martinez, E., e Halstead, S.B. (2016). Dengue infection. *Nature Reviews / Disease Primers* 2, nrdp.2016.55.
- Heaton, N.S., Perera, R., Berger, K.L., Khadka, S., Lacount, D.J., Kuhn, R.J. e Randall, G. (2010). Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *PNAS* 107, 17345-17350.
- Heaton, N.S. e Randall, G. (2010). Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8, 422-432.
- Hossle, J.P., Seger, R.A., e Steinhoff, D. (2002). Gene therapy of hematopoietic stem cells: strategies for improvement. *News Physiol Sci.* 17, 87-92.
- Institute for Health Metrics and Evaluation - IHME (2021). Global Burden of Disease Collaborative Network. Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019) Results. *OurWorldInData.org*. Disponível em: <https://ourworldindata.org/grapher/dengue-incidence?time=latest>. Data de acesso: 14/01/2023.
- Javed, F. e Manzoor, S. (2018). HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade. *Microb Pathog.* 124, 346-355.
- Jordan, T.X. e Randall, G. (2017). Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis to Stimulate a Proviral Lipophagy. *Journal of Virology* 91, e02020-16.
- Kao, Y., Chang, B., Liang, J., Tsai, H., Lee, Y., Lin, R. e Lin, Y. (2015). Japanese Encephalitis Virus Nonstructural Protein NS5 Interacts with Mitochondrial Trifunctional Protein and Impairs Fatty Acid β -Oxidation. *PLoS Pathog.* 11, e1004750.
- Kavran, J. M. e Leahy, D. L. (2014). Silver Staining of SDS-polyacrylamide Gel. *Methods in Enzymology*, 541.
- Khanam, A., Gutiérrez-Barbosa, H., Lyke, K. E. e Chua, J. V. (2022) Immune-Mediated Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viruses* 14, 2575.
- Klema, V. J., Padmanabhan, R. e Choi, K. H. (2015). Flaviviral Replication Complex: Coordination between RNA Synthesis and 5'-RNA Capping. *Viruses* 7, 4640-4656.
- Kondadi, A. K., Anand, R. e Reichert, A. S. (2019). Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity. *Int J Mol Sci.* 20, e4311.
- Korenaga, M., Wang, T., Li, Y., Showalter, L. A., Chan, T., Sun, J. e Weinman, S. A. (2005). Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J Biol Chem.* 280, 37481-37488.
- Kumar R., Tripathi P., Tripathi S., Kanodia A., e Venkatesh V. (2008). Prevalence of dengue infection in north Indian children with acute hepatic failure. *Ann Hepatol*, 7, 59-62.
- Kumarasena R.S., Niriella M.A., Ranawaka C.K., Miththinda J.K.N.D., De Silva A.P., Dassanayaka A.S., e De Silva H.J. (2016). Predicting acute liver failure in dengue infection. *Ceylon Medical Journal*, 61, 35-36.
- Kundharapu, S. e Chowdary, T.K. (2022). Dengue Virus NS4b N-Terminus Disordered Region Interacts with NS3 Helicase C-Terminal Subdomain to Enhance Helicase Activity. *Viruses* 4, 1712.

- Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colás, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quirós, P. M., Calvo, E., Rodríguez-Hernández, M.A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., López-Otín, C., Pérez-Martos, A., Fernández-Silva, P., Fernández-Vizarra, E. e Enríquez, J. A. (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567-1570.
- Laserna, A., Barahona-Correa, J., Baquero, L., Castañeda-Cardona, C., e Rosselli, D. (2018). Economic impact of dengue fever in Latin America and the Caribbean: a systematic review. *Rev Panam Salud.* 42, e111.
- Le Breton, M., Meyniel-Schicklin, L., Deloire, A., Coutard, B., Canard, B., de Lamballerie, X., Andre, P., Rabourdin-Combe, C., Lotteau, V., e Davoust, N. (2011). Flavivirus NS3 and NS5 proteins interaction network: a high-throughput yeast two-hybrid screen. *BMC Microbiol.* 11, 234.
- Lee, J. W. (2020). Protonic Capacitor: Elucidating the biological significance of mitochondrial cristae formation. *Sci Rep.* 10, e10304.
- Li, L., Zhao, H., Liu, P., Li, C., Quanquin, N., Ji, X., Sun, N., Du, P., Qin, C., Lu, N. e Cheng, G. (2018). PARP12 suppresses Zika virus infection through PARP-dependent degradation of NS1 and NS3 viral proteins. *Sci Signal.* 11, 535, eaas9332.
- Li, L., Shi, Y., Li, S., Liu, J., Zu, S., Xu, X., Gao, M., Sun, N., Pan, C., Peng, L., Yang, H. e Cheng, G. (2021). ADP-ribosyltransferase PARP11 suppresses Zika virus in synergy with PARP12. *Cell Biosci.* 11, 116.
- Lin, C., Amberg, S.M., Chambers, T.J., e Rice, C.M. (1993). Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site. *Journal of Virology* 67, 2327-2335.
- Lindenbach, B.D., Thiel, H., e Rice, C.M. (2007). Flaviviridae: the viruses and their replication. In: *Fields virology*, 5th Edition. Wolters kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1101–1152.
- Lobigs, M. (1993). Flavivirus premembrane protein cleavage and spike heterodimer secretion requires the function of the viral proteinase NS3. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90, 6218-6222.
- Luo, D., Vasudevan, S.G., e Lescar, J. (2015). The flavivirus NS2B-NS3 protease-helicase as a target for antiviral drug development. *Antiviral Res.* 118, 148-158.
- Madhry, D., Pandey, K. K., Kaur, J., Rawat, Y., Sapra, L., Kumar, R., Srivastava, R. K., Bhattacharyya, S. e Verma, B. (2021). Role of non-coding RNAs in Dengue virus-host interaction. *Front. Biosci. (Schol Ed)* 13, 44–55.
- Martínez-Reyes, I. e Chandel, N.S. (2020). Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease. *Nature Communications*, 11.
- Meng, F., Badierah, R.A., Almehdar, H.A., Redwan, E.M., Kurgan, L., e Uversky, V.N. (2015). Unstructural biology of the dengue virus proteins. *FEBS Journal* 282, 3368–3394.
- Mühleip, A., Flygaard, R. K., Baradaran, R., Haapanen, O., Gruhl, T., Tobiasson, V., Maréchal, A., Sharma, V. e Amunts, A. (2023). Structural basis of mitochondrial membrane bending by the I–II–III2–IV2 supercomplex. *Nature* 615, 934-938.
- Murphy, B. R. e Whitehead, S. S. (2011). Immune Response to Dengue Virus and Prospects for a Vaccine. *Annu. Rev. Immunol.* 29, 587–619.
- Niyomrattanakit, P., Winoyanu wattikun, P., Chanprapaph, S., Angsuthanasombat, C., Panyim, S., e Katzenmeier, G. (2004). Identification of residues in the dengue virus type 2 NS2B cofactor that are critical for NS3 protease activation. *Journal of Virology* 78, 13708- 13716.
- Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K. e Hotta, H. (2006). Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol.* 87, 1935-1945.
- Novack, G. V., Galeano, P., Castaño, E. M. e Morelli, L. (2020). Mitochondrial Supercomplexes: Physiological Organization and Dysregulation in Age-Related Neurodegenerative Disorders. *Front Endocrinol.* 11, 600.

- Ojuka, E., Andrew, B., Bezuidenhout, N., George, S., Maarman, G., Madlala, H. P., Mendham, A. e Osiki, P. O. (2016). Measurement of β -oxidation capacity of biological samples by respirometry: a review of principles and substrates. *Review Am J Physiol Endocrinol Metab.* 310, e715-23.
- Papa, S., Martino, P. L., Capitanio, G., Gaballo, A., De Rasmio, D., Signorile, A. e Petruzzella, V. (2011). The Oxidative Phosphorylation System in Mammalian Mitochondria. *Advances in Mitochondrial Medicine* 942, 3-37.
- Papageorgiou, L., Loukatou, S., Sofia, K., Maroulis, D., e Vlachakis, D. (2016). An updated evolutionary study of Flaviviridae NS3 helicase and NS5 RNA-dependent RNA polymerase, reveals novel invariable motifs as potential pharmacological targets. *Mol Biosyst.* 12, 2080-2093.
- Pear, W.S., Nolan, G.P., Scott, M.L., e Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8392-8396.
- Perera, R., e Kuhn, R.J. (2008). Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr Opin Microbiol.* 11, 369-377.
- Phong, W. Y., Moreland, N. J., Lim, S. P., Wen, D., Paradkar, P. N. e Vasudevan, S. G. (2011). Dengue protease activity: the structural integrity and interaction of NS2B with NS3 protease and its potential as a drug target. *Biosci. Rep.* 31, 399-409.
- Poovorawan Y., Hutagalung Y., Chongsrisawat V., Boudville I., e Bock H. L. (2006). Dengue virus infection: a major cause of acute hepatic failure in Thai children. *Ann Trop Paediatr*, 26, 17-23.
- Ramage, H. R., Kumar, R., Verschueren, E., Johnson, J. R., Von Dollen, J., Johnson, T., Newton, B., Shah, P., Horner, J., Krogan, N. J. e Ott, M. (2015). A Combined Proteomics/Genomics Approach Links Hepatitis C Virus Infection with Nonsense-Mediated mRNA Decay. *Mol Cell.* 57, 329-340.
- Rasband, W.S. (1997-2018). ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>.
- Reid, D.W., Campos, R. K., Child, J. R., Zheng, T., Chan, K. W. K., Bradrick, S. S., Vasudevan, S. G., Garcia-Blanco, M. A. e Nicchitta, C. V. (2018). Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. *Journal of Virology* 92(7), e01766-17.
- Samsa, M.M., Mondotte, J.A., Iglesias, N.G., Assunção-Miranda, I., Barbosa-Lima, G., Da Poian, A.T., Bozza, P.T., e Gamarnik, A.V. (2009). Dengue virus capsid protein usurps lipid droplets for viral particle formation. *PLoS Pathog.* 5, e1000632.
- Schwer, B., Ren, S., Pietschmann, T., Kartenbeck, J., Kaehlcke, K., Bartenschlager, R., Yen, T. S. B. e Ott, M. (2004). Targeting of Hepatitis C Virus Core Protein to Mitochondria through a Novel C-Terminal Localization Motif. *Journal of Virology*, 78, 7958-7968.
- Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde (2022). Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 48 de 2022. *Boletim Epidemiológico* volume 45.
- Screaton, G., Mongkolsapaya, J., Yacoub, S., e Roberts, C. (2015). New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat Rev Immunol.* 15, 745-759.
- Silva, J. P. e Fernandez-Sesma, A. (2023). Challenges on the development of a dengue vaccine: a comprehensive review of the state of the art. *Journal of General Virology* 104.
- Simonin e Galina (2013). Nitric oxide inhibits succinate dehydrogenase-driven oxygen consumption in potato tuber mitochondria in an oxygen tension-independent manner. *Biochem. J.* 449, 263-273.
- Song, D. H., Park, J., Maurer, L. L., Lu, W., Philbert, M. A. e Sastry, A. M. (2013). Biophysical significance of the inner mitochondrial membrane structure on the electrochemical potential of mitochondria. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 88, e062723.
- Stroud, D. A., Formosa, L. E., Wijeyeratne, X. W., Nguyen, T. N. e Ryan, M. T. (2013). Gene Knockout Using Transcription Activator-like Effector Nucleases (TALENs) Reveals That Human NDUFA9 Protein Is Essential for Stabilizing the Junction between Membrane and Matrix Arms of Complex I. *J Biol Chem.* 288, 1685-1690.

- Tang, W., Lin, R., Liao, C., e Lin, Y. (2014). Rab18 Facilitates Dengue Virus Infection by Targeting Fatty Acid Synthase to Sites of Viral Replication. *Journal of Virology* 88, 6793–6804.
- Tay, M.Y., Saw, W.G., Zhao, Y., Chan, K.W.K., Singh, Chong, Y., Forwood, J.K., Ooi, E.E., Grüber, G., Lescar, J., Luo, D., e Vasudevan, S.G. (2015). The C-terminal 50 Amino Acid Residues of Dengue NS3 Protein Are Important for NS3-NS5 Interaction and Viral Replication. *J Biol Chem.*, 290, 2379–2394.
- Tay, M.Y.F. e Vasudevan, S.G. (2018). The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. *Adv Exp Med Biol.* 1062, 147-163.
- Teo, K.F. e Wright, P.J. (1997). Internal proteolysis of the NS3 protein specified by dengue virus 2. *Journal of General Virology* 78, 337–341.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., Ehse, S., Krause, F., Chan, D.C., Alexander, C., Bauer, C., Youle, R., Langer, T., e Martinou, J.C. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 28, 1589–1600.
- Tongluan, N., Ramphan, S., Wintachai, P., Jaresithikunchai, J., Khongwichit, S., Wikan, N., Rajakam, S., Yoksan, S., Wongsirirroj, N., Roytrakul, S., e Smith, D.R. (2017). Involvement of fatty acid synthase in dengue virus infection. *Virol J.* 14.
- Valle, R.P.C., e Falgout, B. (1998). Mutagenesis of the NS3 Protease of Dengue Virus Type 2. *Journal of Virology* 72, 624–632.
- van Gorp, E.C., Suharti, C., Mairuhu, A.T., Dolmans, W.M., van Der Ven, J., Demacker, P.N., e van Der Meer, J.W. (2002). Changes in the plasma lipid profile as a potential predictor of clinical outcome in dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis.* 34, 1150-1153.
- Vogel, F., Bornhövd, C., Neupert, W., e Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol.* 175, 237–247.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A.D., Watowich, S.J., Gubler, D.J., e Weaver, S.C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *Journal of Virology* 74, 3227–3234.
- Wang, Y., Palmfeldt, J., Gregersen, N., Makhov, A. M., Conway, J. F., Wang, M., McCalley, S. P., Basu, S., Alharbi, H., St Croix, C., Calderon, M. J., Watkins, S. e Vockley, J. (2019). Mitochondrial fatty acid oxidation and the electron transport chain comprise a multifunctional mitochondrial protein complex. *J Biol Chem.* 294, 12380-12391.
- Watmough, N.J. e Frerman, F.E. (2010). The electron transfer flavoprotein: Ubiquinone oxidoreductases. *Biochimica et Biophysica Acta.* 12, 1910-1916.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C.K., Walther, P., Fuller, S.D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., e Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe* 5, 365-375.
- Wengler, G. e Wengler, G. (1991). The Carboxy-Terminal Part of the NS 3 Protein of the West Nile Flavivirus Can Be Isolated as a Soluble Protein after Proteolytic Cleavage and Represents an RNA-Stimulated NTPase. *Virology*, 184, 707-715.
- Wolf, D. M., Segawa, M., Kondadi, A. K., Anand, R., Bailey, S. T., Reichert, A. S., van der Bliek, A. M., Shackelford, D. B., Liesa, M. and Shirihai, O. S. (2019). Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J.* 38, e101056.
- World Health Organization (2009). Dengue: guidelines for diagnostic, treatment, prevention and control. Chapter 1: Epidemiology, burden of disease and transmission.
- World Health Organization (2022). Dengue and severe dengue. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>. Data de acesso: 14/01/2023.
- Xing, H., Xu, S., Jia, F., Yang, Y., Xu, C., Qin, C. e Shi, L. (2020). Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. *Virus Res.* 2, e197793.

- You, D., Lee, H., Kim, W., Kim, H. J., Lee, G. Y. e Yoo, Y. D. (2017). Hepatitis C virus p7 induces mitochondrial depolarization of isolated liver mitochondria. *Mol Med Rep.* 16, 9533-9538.
- Yu, C.Y., Chang, T.H., Liang, J.J., Chiang, R.L., Lee, Y.L., Liao, C.L., e Lin, Y.L. (2012). Dengue virus targets the adaptor protein MITA to subvert host innate immunity. *PLoS Pathog.* 8, e1002780.
- Yu, C.Y., Liang, J.J., Li, J.K., Lee, Y.L., Chang, B.L., Su, C.I., Huang, W.J., Lai, M.M.C., e Lin, Y.L. (2015). Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins. *PLoS Pathog.* 11, e1005350.
- Yusof, R., Clum, S., Wetzel, M., Krishna Murthy, H.M., e Padmanabhan, R. (2000). Purified NS2B/NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids *in Vitro*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 9963–9969.
- Zeidler, J.D., Fernandes-Siqueira, L.O., Barbosa, G.M. e Da Poian, A.T. (2017). Non-Canonical Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses*, 9.
- Zick, P., Rabl, R., e Reichert, A. S. (2009). Cristae formation—linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* 1793, 5–19.



OPEN

On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination

Lorena O. Fernandes-Siqueira^{1,4}, Fabiana A. P. Ferreira^{1,4}, Bruna G. Sousa¹, Nathane C. Mebus-Antunes¹, Thais C. Neves-Martins¹, Fabio C. L. Almeida^{1,2}, Gustavo C. Ferreira¹, Didier Salmon¹, Luciana S. Wermelinger³ & Andrea T. Da Poian^{1✉}

The Covid-19 pandemic, caused by SARS-CoV-2, has resulted in over 6 million reported deaths worldwide being one of the biggest challenges the world faces today. Here we present optimizations of all steps of an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based test to detect IgG, IgA and IgM against the trimeric spike (S) protein, receptor binding domain (RBD), and N terminal domain of the nucleocapsid (N-NTD) protein of SARS-CoV-2. We discuss how to determine specific thresholds for antibody positivity and its limitations according to the antigen used. We applied the assay to a cohort of 126 individuals from Rio de Janeiro, Brazil, consisting of 23 PCR-positive individuals and 103 individuals without a confirmed diagnosis for SARS-CoV-2 infection. To illustrate the differences in serological responses to vaccinal immunization, we applied the test in 18 individuals from our cohort before and after receiving ChAdOx-1 nCoV-19 or CoronaVac vaccines. Taken together, our results show that the test can be customized at different stages depending on its application, enabling the user to analyze different cohorts, saving time, reagents, or samples. It is also a valuable tool for elucidating the immunological consequences of new viral strains and monitoring vaccination coverage and duration of response to different immunization regimens.

Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first identified in December 2019 in Wuhan, China, and has rapidly spread worldwide, as the causative agent for the current Covid-19 pandemics (CORONA-VIRUS Disease 2019)^{1,2}. This betacoronavirus is an enveloped positive-sense single-stranded RNA virus formed by four structural proteins: nucleocapsid (N), membrane (M), envelope (E), and spike (S). SARS-CoV-2 entry into the target cells involves the binding of a region of S protein, the receptor binding domain (RBD), to the cell surface angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2)³. Most infected people have cold-like symptoms or are asymptomatic. However, in some individuals, infection may result in a multisystem disease, progressing mainly to an acute respiratory distress syndrome (ARDS). So far, over 6 million deaths have been associated to Covid-19 around the world⁴.

Social distancing, use of masks and immunization are the most effective strategies to control the dissemination of the disease⁵⁻⁷. Therefore, populational testing is critical to accurately monitor the course of the disease and drive policies for the mitigation of the disease outcomes⁸. Additionally, there is a latent risk of the emergence of new variants⁹ with greater virulence or for which the effectiveness of the vaccines is reduced. These factors pinpoint the importance of customizable tests for the antigens of interest, allowing a quick and effective response in monitoring infection, as well as contributing to the elucidation of the immunological consequences of the new strains.

Serological tests vary in their individual performance characteristics. Currently, they are not recommended to assess for immunity to SARS-CoV-2 following vaccination since some of the tests do not detect the antibodies generated by Covid-19 vaccines¹⁰. In this context, a wide variety of assays to detect immunological reactivity

¹Institute of Medical Biochemistry Leopoldo de Meis, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. ²National Center for Structural Biology and Bioimaging (CENABIO), Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-590, Brazil. ³School of Pharmacy, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil. ⁴These authors contributed equally: Lorena O. Fernandes-Siqueira and Fabiana Abdalla. ✉email: dapoian@bioqmed.ufrj.br

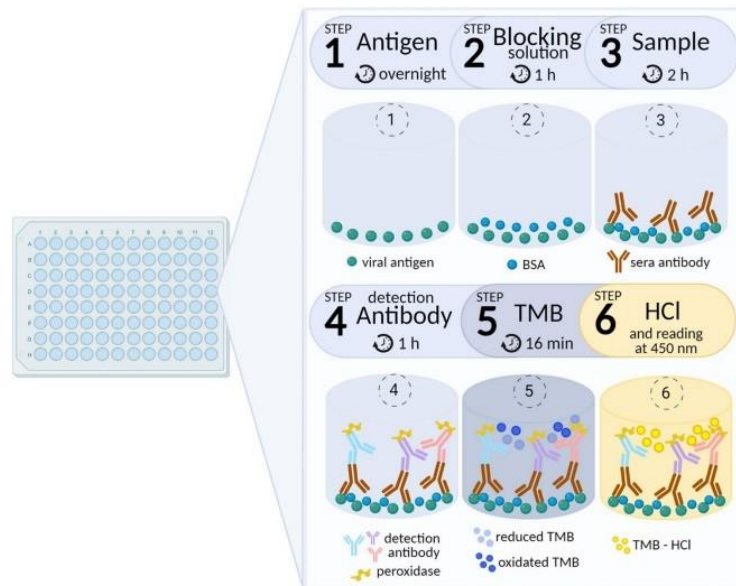


Figure 1. Scheme summarizing the assay steps. Step 1 corresponds to an overnight plate coating with each of the three SARS-CoV-2 antigens used in the assay—S, RBD and N-NTD recombinant proteins. In the step 2, the empty spaces on well surface are filled with 3% BSA solution (blocking solution). In the step 3, serum samples are added to allow the specific binding of sera immunoglobulin to the antigen. Step 4 corresponds to the addition of peroxidase-conjugated antibodies that specifically bind to sera IgG, IgA or IgM bound to the plate. Step 5 correspond to the addition of the chromogenic reagent TMB that is reduced as peroxidase reaction proceeds, developing a blue color. In step 6 peroxidase reaction is stopped by HCl addition, which also converts blue TMB in a yellow compound that is quantified spectrophotometrically at 450 nm. Created with BioRender.com.

against SARS-CoV-2 antigens are still being developed, tested, and applied. It is important to highlight the high costs of the commercial SARS-CoV-2 serological kits, which also can limit their use¹¹.

Here, we describe an efficient in-house enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) that assesses the presence of three different antibody isotypes, IgA, IgM and IgG, directed against multiple SARS-CoV-2 antigens used in the diagnosis of Covid-19 (the trimeric spike protein, S; the S protein receptor binding domain, RBD; and the N terminal domain of the nucleocapsid protein, N-NTD). Some possible applications of the developed assay are also presented.

Results

Choice of antigens. Most serological diagnostic tests for SARS-CoV-2 use S and N proteins as the main antigens due to their high immunogenic characteristic^{11,12}. In addition, serum reactivity to RBD has also been reported as a good predictor of SARS-CoV-2 infection^{13–15}. For the assay described here, we used three different antigens: the trimeric S; the RBD (residues 319 to 541 of S protein); and the N-terminal domain of N protein (residues 44 to 180 of N protein; N-NTD) (Fig. S1). We evaluated separately the reactivity of 3 immunoglobulins (IgG, IgA and IgM) to each of the antigens (S, RBD, N-NTD), so that the test provides 9 different reactivity results for each serum.

Assay development. The assay presented here was adapted from a previously reported protocol¹⁶ to allow the analysis of 3 types of serum antibodies—IgG, IgA, and IgM—against 3 SARS-CoV-2 antigens—trimeric Spike (S), RBD and N-NTD. To set the best assay conditions, we varied the antigen coating density, sera and detection antibodies' concentration, as well as the incubation time with blocking solution, sera, detection antibodies and chromogenic substrate for assay development. A schematic representation of the complete assay is shown in Fig. 1.

To determine the best conditions of plate coating with the viral antigens, and the appropriate dilutions of sera and secondary antibodies, we used serum samples from 23 individuals with positive PCR result for SARS-CoV-2, as well as three sera collected before SARS-CoV-2 pandemic (Table 1). Since PCR + samples reacted differently

Characteristics		Pre-pandemic (n = 42)	Asymptomatic (n = 63)	Symptomatic without PCR confirmation (n = 40)	PCR-positive (n = 23)	Vaccinated (previously non-reactive) (n = 11)	Vaccinated (previously reactive to S IgG) (n = 7)
Seroconversion (IgG), %	Spike (S)	ND	8	17	100	100	100
	RBD	ND	8	11	78	100	100
	N-NTD	ND	14	17	52	0	60
Age, average (range)		38 (19–70)	33 (20–66)	36 (24–61)	37 (21–62)	43 (27–59)	27 (22–36)
Sex, %	Female	43	66	68	75	73	86
	Male	57	34	32	25	27	14
Main symptoms, %	Fever	NA	ND	40	25	NA	0
	Cough	NA	ND	55	46	NA	14
	Anosmia/ageusia	NA	ND	27	46	NA	57
	Sore throat	NA	ND	60	37	NA	14
	Sneezes	NA	ND	62	37	NA	28
	Nasal congestion/runny nose	NA	ND	67	37	NA	71
	Headache	NA	ND	45	46	NA	28
	Chills/myalgia	NA	ND	22	33	NA	57
Gastrointestinal symptoms	NA	ND	25	33	NA	28	
Days post PCR at collection date, average (range)		NA	NA	NA	51 (10–167)	NA	NA
Vaccine, %	CoronaVac	NA	NA	NA	NA	36	29
	ChAdOx1 nCoV-19	NA	NA	NA	NA	64	71

Table 1. Cohort characteristics. ND not detected; NA not applicable.

with each of the antigens, the 4 most reactive samples for a given antigen were chosen for the optimization of the respective test.

Antigen coating density. For an in-house ELISA, determining the ideal antigen concentration to coat the plates is particularly important when the antigens are also produced in-house. To define the best antigen coating density, we performed two-fold serial dilution of each antigen (S, RBD and N-NTD), ranging from 0.25 to 16 µg/ml, with 50 µl of antigen solution applied per well (12.5 to 800 ng antigen per well). For each antigen, tests were conducted using the 4 most appropriate PCR+ and 3 pre-pandemic samples assayed for either IgG (Fig. 2A–C), IgA or IgM detection (Fig. S2). We observed no reactivity of pre-pandemic sera at any condition tested, while a dose-dependent antigen recognition profile was identified for most PCR+ samples. We then chose the concentration of 4 µg/ml for all antigens to perform the subsequent assays.

To evaluate the actual contribution of RBD to sera reactivity to S, we performed an assay coating the plates with S or RBD with the concentrations adjusted to maintain the same amount of RBD epitopes. Since S and RBD molecular masses are approximately 180 kDa and 26 kDa, respectively, we compared sera reactivity using 4 µg/ml S with 0.6 µg/ml RBD (RBD molar equivalent in the complete S) or 4 µg/ml RBD (maintaining the same protein mass) (Fig. S3). We observed a high reactivity to RBD even when used at a lower concentration. This result may be associated with a large amount of sample antibodies directed to the RBD, suggesting that this domain has a major contribution in the reactivity against the entire S. No significant changes were observed in the results of PCR+ samples for IgG when 4 or 0.6 µg/ml RBD concentration were used, suggesting that using 0.6 µg/ml RBD is enough to ensure reliable results for this immunoglobulin. However, for the IgA and IgM detection assay, a better separation of positive samples was revealed when 4 µg/ml RBD was used.

Sera dilution. To determine the best sera concentration to be used in the assay, we performed two-fold serial dilution of the 4 most appropriate PCR+ and 3 pre-pandemic sera samples, with dilutions ranging from 1:25 to 1:800. Assays were performed by using 4 µg/ml of the antigens to coat the plates, assessing reactivity to either IgG (Fig. 2D–F), IgA or IgM (S4). We found that, especially for IgG reactivity against all the antigens (Fig. 2D–F) and for all antibodies tested against N-NTD (Figs. 2F and S4E,F), dilutions lower than 1:50 result in a substantial increase in the background of some negative samples, which may generate false positive results. For most cases of PCR+ samples, the ideal dilution was between 1:50 and 1:100 (to reach values that allow a good separation of positives from negatives samples).

To evaluate quantitatively the assay sensitivity, we broadened the sera dilution range (tenfold serial dilutions) using three different groups of positive samples: (i) 23 PCR+ sera collected before vaccination has started (PCR+); (ii) 4 sera from individuals vaccinated with two doses of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine who were not reactive before vaccination (Vaccinated—previously non-reactive); and (iii) 4 sera from individuals vaccinated with two doses of ChAdOx1 nCoV-19 vaccine who were reactive before vaccination (Vaccinated—previously S IgG reactive). As negative controls, we used 10 sera samples collected before pandemic. Sera titration revealed

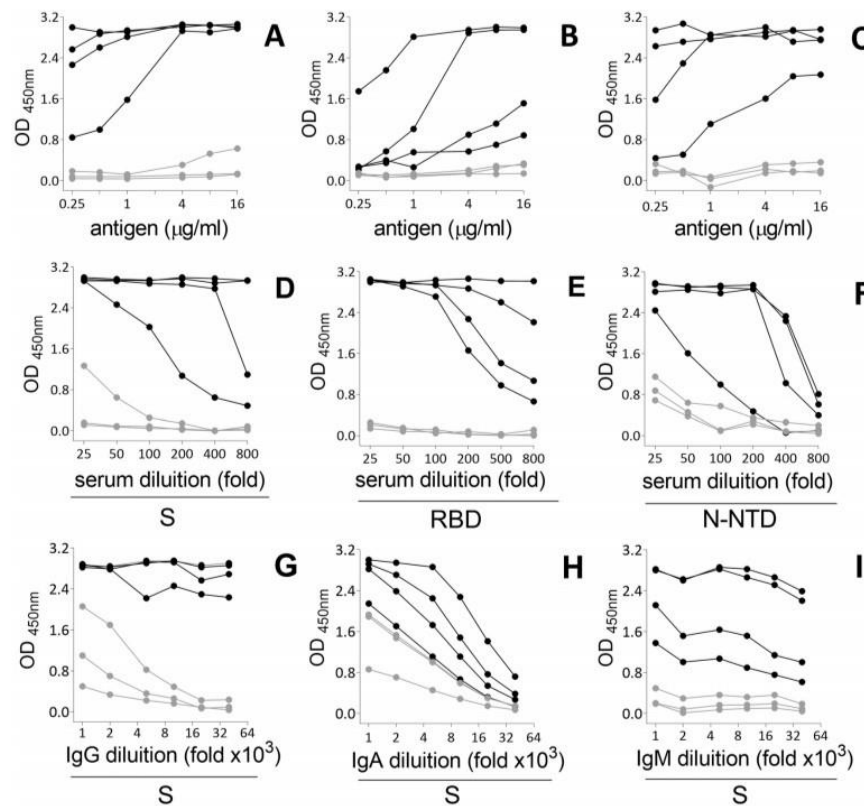


Figure 2. Sera reactivity to SARS-CoV-2 antigens in different assay conditions. (A–C) Effect of antigen density: SARS-CoV-2 antigens S (A), RBD (B), or N-NTD (C) were serially diluted in PBS and used as antigens to coat ELISA plates in assays in which sera were used at a 1:50 dilution. (D–F) Effect of sera concentration: sera samples were serially diluted in a 1% BSA solution in PBS-T and assay was conducted using plates previously coated with 4 µg/ml of S (D), RBD (E) or N-NTD (F). (G–I) Effect of secondary antibody dilution: reactivity of serum IgG (G), IgA (H) or IgM (I) to S protein was accessed using the respective detection antibody serially diluted in a 1% BSA solution in PBS-T, in a plate previously coated with 4 µg/ml S, incubated with the sera samples at a 1:50 dilution. For all the conditions tested, the plates were incubated with the antigens overnight, at 4 °C, blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T and incubated for 2 h with 3 sera collected before pandemic (grey symbols) or 4 sera from PCR+ individuals (black symbols). Sera reactivity was quantified spectrophotometrically after incubation with the respective detection antibody for 1 h followed by the addition of the chromogenic substrate.

that reactive samples may show very different antibody titers (Fig. 3). Calculations of the area under the curves (AUC) showed that sera from vaccinated individuals who tested positive before vaccination presented significantly higher titers when compared to sera from vaccinated individuals who were non-reactive when receiving the first vaccine dose. It is also clear the high antibody titer variability among the pre-vaccination PCR+ sera (Fig. 3A,C). This variability would be explained by the timing, severity of symptoms and longevity of the humoral response against SARS-CoV-2, as those sera were collected in different time points after individuals were infected, or by differences in the response intensity within a population. Additionally, individuals with lower titers before vaccination had significantly greater increases in antibody titers when compared to individuals with high titers before vaccination (Fig. 3C, colored symbols). Altogether, the results show the importance of sample dilution for quantitative analysis, highlighting that dilutions between 1:50 and 1:100 were suitable for differentiating negative and positive samples without background increase and false positives.

Dilution of the detection antibodies. The dilution of the detection antibody must also be adjusted to avoid high backgrounds in the assay. Here we evaluated the best conditions for detection antibodies for three immunoglobulins, IgG, IgA and IgM, using S as antigen (Fig. 2G–I). Dilutions of less than 1:10,000 of anti-IgG or anti-

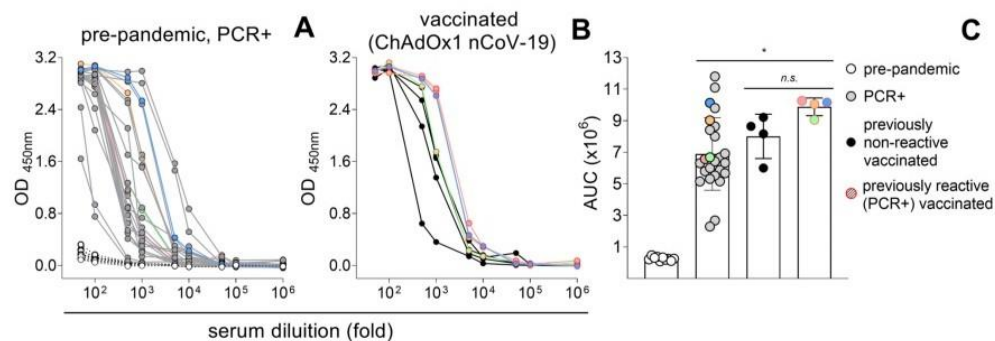


Figure 3. Titration of serum antibodies against SARS-CoV-2 S protein. Sera from 10 pre-pandemic (white symbols) and 23 PCR+ (grey symbols) individuals (A) or sera from individuals vaccinated with two doses of ChAdOx1 nCoV-19 who were reactive (PCR+) (colored symbols) or not (black symbols) before vaccination (B) were serially diluted in a 1% BSA solution in PBS-T and incubated for 2 h in plates previously coated with 50 μ l solution of S protein at 4 μ g/ml, overnight, at 4 $^{\circ}$ C, and blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T. IgG reactivity was quantified spectrophotometrically after incubation with the respective detection antibody for 1 h followed by the addition of the chromogenic substrate. The values for the area under the curves (AUC) obtained for each sample are represented in (C). * $p=0.004$, *n.s.* = non significant.

IgA resulted in high backgrounds, clearly observed for the pre-pandemic samples (Fig. 2G,H, respectively). On the other hand, dilutions above 1:20,000 impaired the detection IgA positive samples. IgM reactivity remained detected throughout the dilution range tested (Fig. 2I). Based on the results, we chose a 1:10,000 dilution for all three detection antibodies.

Incubation periods for each assay step. To optimize the time spent in the complete assay, we set the duration for each step of the protocol: incubation with the serum sample (Fig. 4A–C), detection antibody (Fig. 4D–F), and chromogenic substrate (Fig. 4G–I). Sera reactivity reached a plateau from 1 h of incubation under all conditions analyzed. However, differences amongst IgG positive samples were detected between 10 and 30 min of reaction. These differences were reduced or lost when the samples were incubated for 2 h, when the absorbance values exceeded the linearity limit of the assay (Fig. 4A–C). A similar profile was observed for the incubation with the detection antibody. For IgG and IgA, it was possible to differentiate positive from negative samples earlier than for IgM, for which 1 h was the most adequate incubation period for better separation between the negative and positive groups (Fig. 4D–F). Regarding the incubation time with the chromogenic substrate TMB, more pronounced differences were observed depending on the class of antibodies to be detected. For IgG, 4 min of reaction was enough to separate positive from negative samples, while for IgA and IgM, 8 min incubation was needed to obtain a proper separation of negative and positive groups (Fig. 4G–I).

We also set the conditions for plate blocking. Plate incubation for different time periods with 3% BSA solution revealed that a 10-min incubation was enough to completely reduce the background of the assay (Fig. S5A). A comparison between blocking with either 3% BSA or 3% milk powder solution showed no significant difference (Fig. S5B).

Pitfalls and troubleshooting. *Sample stability.* When sera samples potentially containing infectious agents are handled, heat inactivation at 56 $^{\circ}$ C for 30 min is recommended to minimise risk of infection. Thus, to ensure assay reproducibility, it is important to evaluate temperature stability of the serum antibodies. In addition, sample collection can often be frozen and thawed for many tests. To assess serum antibodies stability to temperature variations, we performed the assay using non-inactivated and inactivated samples (Fig. S6A), as well as comparing the results obtained using fresh samples or samples subjected to 10 freeze and thaw cycles (Fig. S6B). We observed no significant differences between the reactivity of samples tested, suggesting that the antibodies present in the serum are stable under these conditions.

Reproducibility. The pH of the solutions used in the assay is an important factor to ensure reproducibility. To assess the effect of pH variation, we quantified the reactivity of IgG against S protein at pH 6.6, 7.4 and 8.0 (Fig. S6C). We found that at mild acidic pH (pH 6.6), 11 of 12 positive sample tested negative, with a drastic reduction in their absorbance. At weak basic pH (pH 8.0), only 1 of 12 positive sample tested negative, although the remaining 11 showed an important reduction in their absorbance. Therefore, it is crucial to carefully adjust the antigen dilution buffer to the optimal pH for the assays (pH 7.4).

The use of non-sterile buffer solutions is one of the main causes of background increase due to proteolysis of blocking solution or antigens. Therefore, the utilization of plates coated for more than 24 h should be avoided. In addition, it is recommended that all reagents are at room temperature before starting the test. Non-uniform

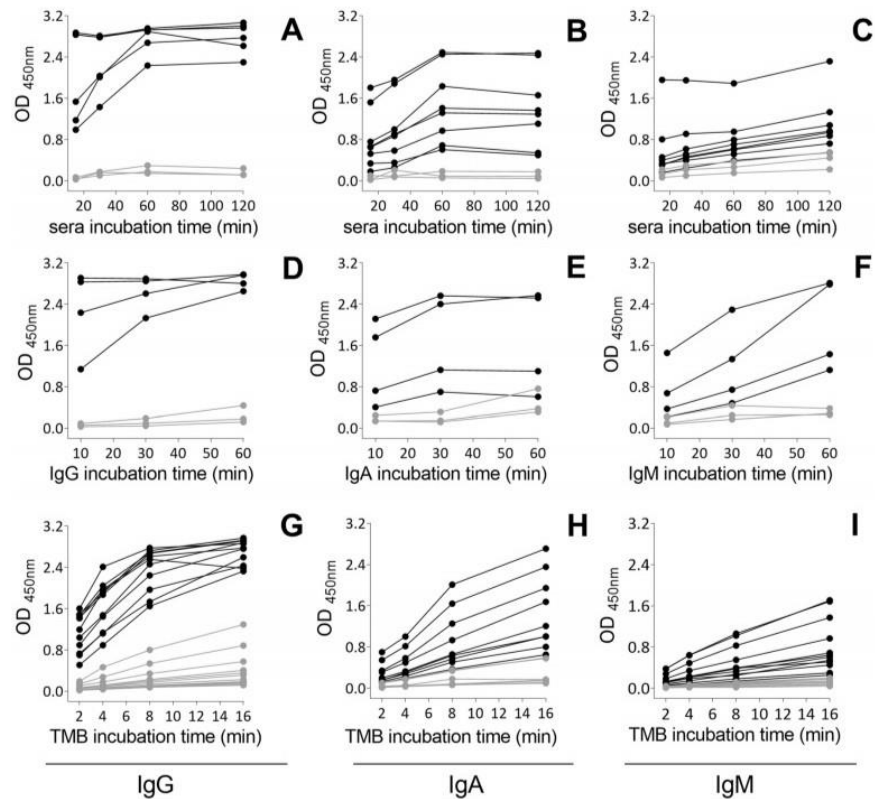


Figure 4. Setting the incubation time for each step of the protocol. ELISA plates were coated with 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ S and the reactivity to sera in PCR+ (black symbols) and pre-pandemic sera (grey symbols) was followed at different periods of sera incubation (A–C), detection antibody incubation (D–F) and TMB incubation (G–I) to IgG, IgA and IgM, respectively. The plates were incubated with the antigens overnight, at 4 $^{\circ}\text{C}$, blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T and incubated with the sera at a 1:50 dilution. Reactivity was quantified spectrophotometrically after incubation with each detection antibody by the addition of the chromogenic substrate.

spread of the antigen on the well during the plate coating may also contribute to large variation between replicate samples. This can be avoided by gently tapping the plate with the fingers to ensure that the entire well is covered with the coating solution. Complete removal of the blocking solution (for instance tapping the plate on a paper stack) is also important to avoid non-reproducible results. Bubbles formed during sample dilution should be removed from the assay, as they can interfere with the binding of the sample to the antigen.

Cut-off determination and assay performance. Determination of the cut-off values is an important step to be taken when the assay is used for diagnosis purposes. Here, we first determined the sensitivity (true positive rate) and specificity (true negative rate) of the assays using as the negative group 42 sera samples collected before 2019 (pre-pandemic sera) and as the positive group, 23 sera collected from individuals who tested positive for SARS-CoV-2 infection between June 2020 and April 2021 (PCR+ sera). Two different approaches were used to establish the cut-off value (Figs. 5, S7). In the first approach, it was used the three standard deviations from the mean, which is a common cut-off in practice for identifying outliers in a Gaussian or Gaussian-like distribution of ELISA results based on OD ranges¹⁷. In this heuristic approach, the cut-off was calculated as the mean + 3 SD of the absorbance values of the 42 sera pre-pandemic samples. Thus, PCR+ samples with an OD higher than the mean of the negative controls + 3 SD were considered true positive and inversely, pre-pandemic samples with an OD higher than the mean of the negative controls + 3 SD were considered true false positive. Using this method, we identified 2 false positive samples for IgG reactivity to S and for IgA reactivity to N-NTD, corresponding to a specificity of 95.2% for the reactivity of both immunoglobulins. For IgM reactivity to the 3 antigens and for IgA reactivity to RBD, we identified 1 false positive, corresponding to a specificity of 97.6%. For

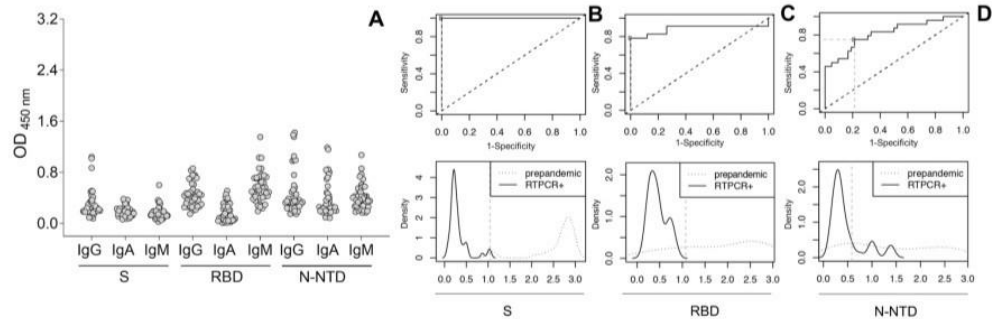


Figure 5. Cut-off determination in the optimized in-house ELISA. (A) Reactivity of IgG, IgA and IgM in 42 pre-pandemic sera to S, RBD and N-NTD. (B, C, D) Receiver operating characteristics (ROC) analysis of the optimized in-house ELISA for IgG reactivity to S (B), RBD (C) or N-NTD (D). Forty-two pre-pandemic sera (grey symbol) and 23 PCR+ sera were diluted 1:50 in a 1% BSA solution in PBS-T and incubated for 2 h in plates previously coated with 50 μ l solution of antigens at 4 μ g/ml, overnight, at 4 $^{\circ}$ C, and blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T. For each antigen, IgG, IgA or IgM reactivity was quantified spectrophotometrically after incubation with the respective detection antibody for 1 h followed by the addition of the chromogenic substrate. AUC represents the area under the curve. In the top panels, the dotted diagonal lines represent the theoretical performance of a test with no discriminatory ability, corresponding to an AUC of 0.5. Horizontal and vertical dotted lines correspond to the sensitivity and 1-specificity, respectively, which indicates the optimal cut point value for each ELISA test, as defined by the Youden index (J) (crossed out square). In the distribution graphs (bottom panels), solid and dotted lines correspond, respectively, to PCR-positive and pre-pandemic serum samples, the vertical dotted lines indicate the optimal cut-off for each ELISA test determined by ROC analysis calculated by Youden method (Table 2).

Performance measures	In house ELISA assays		
	IgG S	IgG RBD	IgG N
Performance of the in-house ELISA using the average OD + 3 SD of the pre-pandemic samples			
Cut-off	0.940	1.033	1.51
Sensitivity (95% CI)	1 (0.851–NaN)	0.791 (0.578–0.928)	0.458 (0.255–0.671)
Specificity (95% CI)	0.952 (0.838–0.942)	1 (0.915–NaN)	1 (0.915–NaN)
Positive Predictive Value	0.997 (0.990–0.999)	Inf (Inf–NaN)	Inf (Inf–NaN)
Negative Predictive Value	1 (0.999–NaN)	0.201 (0.103–0.355)	0.086 (0.063–0.123)
Positive Likelihood Ratio	0.210 (0.054–0.812)	0 (0–NaN)	0 (0–NaN)
Negative Likelihood Ratio	0 (0–NaN)	0.211 (0.103–0.456)	0.541 (0.373–0.781)
Performance of the in-house ELISA using the ROC analysis			
AUC (95% CI)	1 (1–1)	0.885 (0.765–1)	0.818 (0.707–0.930)
AUC standard error	0	0.060	0.056
Optimal cut-off (Youden)	1.042	1.073	0.583
Sensitivity (95% CI)	1 (0.858–NaN)	0.783 (0.563–0.925)	0.750 (0.533–0.902)
Specificity (95% CI)	1 (0.916–NaN)	1 (0.916–NaN)	0.786 (0.632–0.897)
Positive Predictive Value	1 (0.862–NaN)	1 (0.824–1)	0.667 (0.484–0.860)
Negative Predictive Value	1 (0.913–NaN)	0.894 (0.750–NaN)	0.846 (0.677–0.929)
Positive Likelihood Ratio	Inf (Inf–NaN)	Inf (Inf–NaN)	3.50 (1.876–6.529)
Negative Likelihood Ratio	0 (0–NaN)	0.217 (0.100–0.472)	0.318 (0.156–0.648)

Table 2. Performance of the in-house ELISA using different methods of cut-off calculation. *CI* confidence interval; *NaN* not a number; *Inf* infinity; *AUC* area under curve.

IgA reactivity to S and IgG reactivity to N and RBD, no false positives were found, corresponding to a specificity of 100%.

To determine the assay accuracy, ROC analysis was performed using OD data of all ELISA assays (Fig. 5, Table 2, and suppl. Fig S7). Figure 5B–D shows the ROC analysis of the optimized assay for IgG reactivity to S, RBD, or N-NTD. The area under the curve (AUC) graphs were generated to graphically represent the performance of the assays, and the distribution graphs represent the dispersion of the PCR-positive and pre-pandemic

serum samples relatively to the optimal cut-off for each ELISA. AUC values were high for all three assays, with highest value for the S-IgG ELISA (range 1–1). The Youden method that integrates both sensitivity and specificity of the test allows selecting the best cut-off values, which were estimated in a range of 0.583 to 1.073 units of absorbance (Table 2). These calculated cut-off values determined the classification of the samples (positive and negative predicted values and likelihood ratios) for subsequent analyses (Table 2). While the cut-off values calculated based on two different approaches were very similar for IgG reactivity to S and RBD, they were very different regarding N-NTD (0.53 and 1.51 units of absorbance for ROC and mean + 3 SD analyses, respectively). This apparent discrepancy is mainly due to the high dispersion of the pre-pandemic results for IgG reactivity to N-NTD (two small peaks in the distribution plot in Fig. 5D), which very likely results from false positive samples (non-specific reactivity and/or cross-reactivity to N-NTD). In addition, the low sensitivity results obtained for N-NTD, especially in the approach using the mean + 3 SD, may be explained by the absence of antibodies against this protein in the PCR+ samples used in the assay. Similar results of high sensitivity and specificity were obtained for IgA reactivity to S and RBD, while poor specificity and sensitivity was observed against N-NTD (Fig. S7). Finally, IgM reactivity to S was found to be very sensitive and specific, in contrast to reactivity to RBD, which was neither specific nor sensitive (Fig. S7).

Validation of the in-house ELISA assays. In order to validate our in-house ELISA, we applied the complete assay to 3 different groups of samples: (i) sera collected from 23 individuals who tested positive in a PCR test for diagnosis of SARS-CoV-2 infection (*PCR+ samples*); (ii) 206 sera samples collected from 103 individuals (2 samples from each individual, collected in October–November 2020 and February–April 2021) who were not diagnosed for SARS-CoV-2 infection and before receiving any type of vaccine for SARS-CoV-2 (*Non-diagnosed individuals*); and (iii) 26 sera samples collected from 13 individuals vaccinated against SARS-CoV-2 (*Vaccinated individuals*), being 2 samples from each individual, the first before vaccination and the second 20 days after the first dose of ChAdOx-1 nCoV-19 (7 individuals) or CoronaVac (6 individuals) vaccines (Table 1). Among these 13 individuals, 8 were not reactive for SARS-CoV-2 antibodies and 5 tested positive in a PCR test for diagnosis of SARS-CoV-2 infection before vaccination. All results obtained were grouped as a heatmap graph (Fig. 6).

PCR+ samples. Applying the test to the PCR+ samples, we found 100% IgG reactivity to S, 78% to RBD and 52% to N-NTD (Fig. 6A). The detection of IgG against the 3 antigens was observed in 47% of the samples. The 4 sera that were negative for IgG against RBD had the lowest IgG titer against S, highlighting the importance of RBD epitopes to the serological reactivity to S. IgA and IgM reactivity to S were found in 80 and 60% of the samples, respectively. Among the samples reactive to RBD, 72% were positive for IgA and 44% for IgM, while for N-NTD, 58% of the reactive samples were positive for IgA and only 8% for IgM.

Non-diagnosed individuals. The analysis of the serological response of the first sample collected (November 2020) of all the non-diagnosed individuals showed that 12.6% of them were positive for S IgG, 11.6% for RBD and 11.6% for N-NTD IgG. Only 4.8% of the samples were positive for all antigens (Fig. 6C). Demographic analysis of these individuals revealed that 39% (40 out of 103 individuals) reported some flu-like symptoms before November 2020 (Table 1). From this sub-group, 17% showed IgG reactivity to S and N-NTD and 11% to RBD (Fig. 6C). Among the other 63 asymptomatic individuals, only 8% showed IgG reactivity to S and RBD, while 14% were positive to N-NTD. In addition, it is important to note that 7 individuals (4 from the 63 asymptomatic individuals—9.3%—and 3 from the 40 symptomatic—5%) showed serologic response only to N-NTD IgG, which can be interpreted as a non-specific reactivity and/or a cross-reaction to N-NTD of other coronaviruses or even to proteins from other viruses that are endemic in Brazil¹⁸. Analyses of samples collected from those individuals (non-diagnosed in November 2020; Fig. 6E) until 5 months later, to April 2021, revealed an important seroconversion, with a 100% increase in S and RBD IgG incidence and a 16% increase in N-NTD IgG detection (Fig. 6D). Differently from the PCR+ samples, only 30% of the positive sera for IgG against any of the 3 antigens were also positive for IgA, and only 20% for S IgM and 8% for RBD and N-NTD IgM. Very few samples showed only IgA or IgM reactivity.

Vaccinated individuals. As the vaccination progress, seroconversion from SARS-CoV-2 infection overlaps with the serological response to vaccines. To illustrate the potential differences that can be detected by assessing serological responses at a time when a substantial part of the population is vaccinated, we performed our in-house using serum samples collected from individuals who tested positive for SARS-CoV-2 infection or from non-reactive individuals before and after receiving the first dose of CoronaVac or ChAdOx-1 nCoV-19 vaccines (Fig. 6B). CoronaVac is an inactivated virus vaccine, so that the individual is immunized by the contact with all the viral proteins¹⁹. In contrast, ChAdOx-1 nCoV-19 vaccine consists of an adenoviral vector containing the full-length SARS-CoV-2 S protein²⁰. As expected, all sera from vaccinated individuals were positive for S IgG, but, for these analyzed samples, IgG reactivity to RBD was more evident in PCR+ individuals after immunization for both vaccines. Despite containing N protein, CoronaVac did not induce a significant N-NTD IgG response in the tested samples. ChAdOx-1 nCoV-19, but not CoronaVac, increased the S IgA titer in the subjects previously diagnosed with SARS-CoV-2 infection and induced this response in individuals who were previously not-reactive. Only 1 PCR+ individual showed IgA reactivity to RBD after receiving ChAdOx-1 nCoV-19. No induction of IgM response was seen for any of the three antigens after immunization with any of the vaccines.

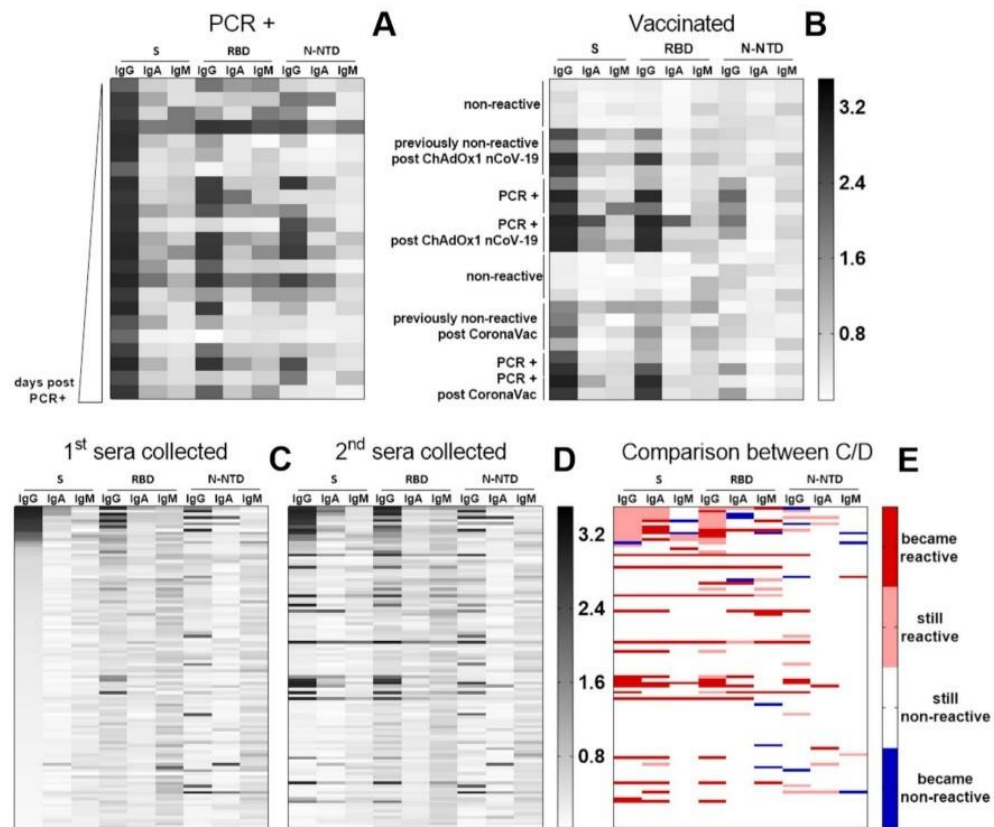


Figure 6. In-house ELISA application in different groups of samples. Reactivity of sera IgG, IgA and IgM against S, RBD and N-NTD. (A) Sera from individuals who tested positive for SARS-CoV-2 infection (PCR+ samples) shown in ascending order of days post confirmed PCR; (B) Vaccinated individuals; (C) First sera collected in November 2020 from individuals without diagnosis for SARS-CoV-2 infection shown in ascending order of S IgG OD value and (D) second sera collected in April 2021; (E) Comparison between the results of samples analysis shown in (C) and (D). Sera were diluted 1:50 in a 1% BSA solution in PBS-T and incubated for 2 h in plates previously coated with 50 μ l solution of antigens at 4 μ g/ml, overnight, at 4 $^{\circ}$ C, and blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T. For each antigen, IgG, IgA or IgM reactivity was quantified spectrophotometrically after incubation with the respective detection antibody for 1 h followed by the addition of the chromogenic substrate.

Discussion

In this study we developed a serological test with high sensitivity and specificity to assess the presence of the three main immunoglobulin isotypes targeted against the main antigens routinely used in Covid-19 diagnosis. Serological tests may represent important tools not only for serosurveillance but also for monitoring vaccination coverage and the duration of immune response to the vaccine²¹, being especially interesting in a country such as Brazil, which shows the highest number of confirmed cases of Covid-19 in Latin America although it has started mass vaccination of its population against Covid-19 since January 2021. One advantage of the present test is that it can be customized in different stages according to its application, enabling the user to save time, reagents, and/or samples, as well as to use it for the analysis of different cohorts. This flexibility is useful since multiplexing the test increases its efficiency and facilitates antigen substitution (e. g. by including mutations present in circulating variants). Furthermore, the overall cost compared to those of commercial kits is considerably reduced.

Several studies have shown the importance of combining more than one antigen to increase the efficiency of serological assays^{13,22}. Here, we selected the antigens considering the strong immune response to N-NTD²³ and the high specificity of the response to S²⁴ and RBD²⁵. Moreover, the level of antibodies directed to RBD strongly correlates with a neutralizing response^{14,26,27}, providing useful information when handling the viral particle is not

possible. Furthermore, the combination of three antibody isotypes (IgG, IgA and IgM) improves the efficiency of using the test for diagnostic purposes²⁸. While IgM may represent a recent infection complementing the molecular diagnosis for SARS-CoV-2²⁹, a recent study showed a high incidence of IgA response in PCR+ samples, even when they did not show IgM reactivity³⁰.

One of the main obstacles in the development of an in-house serological test for SARS-CoV-2 is to evaluate the diagnostic performance and cut-off value of the assay, as reliable positive (PCR+) and negative (pre-pandemic) samples are required. Since the emergence of the virus is quite recent and the appearance of new variants is frequent and unpredictable, the details of the humoral immune response to its antigens are still unknown. In continuous diagnostic clinical testing, establishing and maintaining a reliable threshold is crucial to discriminate between infected (true positive) and uninfected (true negative) subjects. Particularly for in-house ELISAs, the cut-off value may be defined as the average + 3 SD of the absorbance values obtained for the negative samples, a common approach used in many studies^{24,31}. On the other hand, threshold value calculation using ROC curves represents the ad hoc methodology used in most diagnostic tests, allowing to assess test performance and robustness³². The difficulty in determining cut-off values for the SARS-CoV-2 serological tests can be clearly illustrated by the analysis of our pre-pandemic samples. We observed a high reactivity for IgG and IgM against RBD in a substantial number of samples. Conversely, a previous report showed high specificity for the serological response against RBD²⁵, suggesting that negative samples' particularities may generate different results. This discrepancy reinforces how we are still far from a complete understanding of the immune response against SARS-CoV-2. We also detected non-specific reactivity to the three antibody isotypes against N-NTD in the pre-pandemic samples. Accordingly, other studies have reported cross-reactivity between SARS-CoV-2 and other coronaviruses' N proteins, including SARS-CoV³³ and MERS-CoV³⁴. This is expected given the high homology between the amino acid sequence of these proteins, which is 90.5% and 46.1%, respectively³³. Additionally, cross-reactivity among SARS-CoV-2 and the alpha-coronaviruses HCoV-NL63 and HCoV-229E N proteins has also been reported. Since amino acid sequence homology is much lower in this case, it is possible that cross-reactivity may also result from protein similarities at the conformational level³⁵. It should also be considered that Brazil is a country where dengue virus (DENV) is endemic and a possible cross-reactivity between DENV and SARS-CoV-2 antibodies has already been reported³⁶. In addition, infection by other arboviruses, such as the Zika virus, may contribute to false positive results, as reported for the application of a commercial SARS-CoV-2 ELISA test in patients with acute Zika virus infection¹⁸. Therefore, further analysis of the impact of arbovirus infections on SARS-CoV-2 serological tests is needed. Interestingly, false negative results were observed in PCR-positive samples, which was particularly the case of IgM and IgG reactivity against N-NTD in our test. This undetected reactivity could be explained by late sampling of these immunoglobulin isotypes, which are detected very early after the onset of symptoms³³.

The validation of the assay presented here was performed using 23 sera from PCR+ individuals, with 100% of the samples positive for IgG against S and 78% against RBD. Interestingly, samples that did not show IgG response against RBD presented low S IgG titers. Regarding the response to N-NTD, 52% of our PCR+ samples were classified as reagent for N-NTD IgG. This relatively low reactivity for N-NTD would be explained by the fact that serological response to N protein tends to occur earlier^{27,38}, and our PCR+ cohort is composed of samples collected in a range from 20 to 157 days after PCR confirmation. In the case of IgM response, we found a low incidence for samples positive for S and RBD, and an even rarer reactivity for N protein. Indeed, the incidence of IgM against protein N seems to be lower than for other antigens²⁹, so that the analysis of this response in samples collected at the onset of the symptoms should be considered. It is also important to consider that here we analyzed samples from individuals who presented mild symptoms and were fully recovered, which may explain the lower incidence observed for some immunoglobulin isotypes, as antibody titers strongly correlates with disease severity³⁹⁻⁴¹. Indeed, studies performed with hospitalized patients have reported up to 94% seroconversion of against N protein⁴²⁻⁴⁴.

Among the participants of the present study, 63 were asymptomatic individuals, from whom the samples of 8% were identified as positive for IgG reactivity to S and RBD. Furthermore, in the symptomatic non-diagnosed group of our cohort, 17% of the individuals who seroconverted reported only mild symptoms. This result reinforces the robustness of the test, especially in this type of cohorts, since some studies have not detected SARS-CoV-2 antibodies in asymptomatic individuals or individuals with mild and short duration symptoms^{45,46}. Interestingly, for the group of individuals who were not diagnosed for SARS-CoV-2, we investigated samples collected at two time points before vaccination (November 2020 and April 2021). We found a twofold increase in the incidence of positive cases in the second sample when compared to the first sample. These data are consistent with the increased incidence of new daily cases observed in the state of Rio de Janeiro (Brazil) during this period. In November 2020, an incidence of up to 1500 new cases per day was reported, while in April 2021, 3000 new daily cases were reported⁴⁷.

There are currently different types of vaccines in clinical use. In the current pandemic phase, seroconversion can result either from contact with the virus or from vaccinal immunization. Here we applied our assay to sera from individuals with or without a previous SARS-CoV-2 infection, who were vaccinated with CoronaVac (a purified inactivated SARS-CoV-2 vaccine)¹⁹, or ChAdOx1 nCoV-19 (the adenovirus-vectored vaccine encoding SARS-CoV-2 spike protein)²⁰. Due to the contact with all the viral proteins in vaccination with CoronaVac, a serological response to protein N is expected and detected in other studies^{19,48}, although we did not observe this result in the tested samples. On the other hand, the response against N-NTD can be useful to identify pre-vaccination infections.

Finally, despite the very satisfactory effectiveness of vaccines to reduce the worsening of symptoms and the number of deaths associated with Covid-19, it is also believed that a high percentage of immunization in the world's population will be necessary to prevent the chain of virus transmission and avoid the appearance of new variants. As we currently face the extension of the pandemic, health agencies are recommending booster doses

for the population. Heterologous immunization (the same individual receiving different immunizations at different doses) seems to represent an important tool to increase effectiveness of immunization⁴⁹. In this context, the serological test developed here allows the identification of diverse immune responses to various vaccine antigens, enabling a more precise understanding of the different immunization regimens across more specific populations (age, sex, comorbidities and so on). It is known that antigen polymorphism of pathogens has the potential to reduce the performance of the serological diagnostic tests. The emergence of new variants, as the recent Omicron variant, accumulating a high level of mutations in both spike and RBD could impair the sensibility of serodiagnosis tests of SARS-CoV-2. Omicron RBD, which contains 15 mutations in the RBD, shows a significantly weaker binding to antibodies of human serum from SARS-CoV-2 vaccinated and Covid-19 patients (alpha variant) in comparison to the RBD of the original Wuhan strain⁵⁰. Thus, the use of a diagnostic test with a multiplex strategy using different antigens with different selective pressure has a clear advantage over tests using only RBD as antigen. Therefore, we believe that our multiplex ELISA test represents a valuable tool for defining more effective public health policies to fight this deadly contagious disease, thus contributing to the definition of vaccine strategies to be used in the future.

Limitations

In this article we present a customizable ELISA-based test to detect IgG, IgA and IgM against three SARS-CoV-2 proteins: trimeric S, RBD and N-NTD. This assay allows the user to analyze different cohorts, saving time, reagents, and samples. One of the main limitations of this assay is the need of a cohort of pre-pandemic samples to establish reliable cut-offs. Although the assay allows to easily distinguish between positive and negative samples, even when the positive samples have lower antibodies' titers, sera titration experiments may be required to access differences between samples with higher antibodies' concentrations. The correlation between the reactivity against N protein and the actual contact with SARS-CoV-2 (or its components, in the case of whole virus vaccines) is still controversial and consists in a major limitation. In some cases, individuals previously infected with SARS-CoV-2 do not show a detectable response against N protein. Therefore, it is possible that some samples classified as N protein-reactive are resultant of serum cross-reactivity to proteins from other coronaviruses or even from viruses of other families.

Methods

Antigens' expression and purification. *S protein.* The trimeric S protein produced in HEK293-3F6 cells, was kindly provided by Dr. Leda Castilho, COPPE, UFRJ²⁴.

Receptor-binding domain (RBD). RBD expression was adapted from a previously described protocol⁵¹. HEK293T cells were transfected with pcDNA3.1(+) vector (GenScript, New Jersey, USA) containing residues 319 to 541 of SARS-CoV-2 S protein using PEI MAX 40 K (Polysciences, Warrington, USA) in a 3:1 ratio of PEI to DNA. The day before transfection, cells were seeded on 100 mm dishes at a density of 4.0×10^6 cells with viability greater than 95%. The cells were maintained in Opti-MEM medium (Gibco, Massachusetts, USA) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Massachusetts, USA) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco), in a CO₂ humid incubation chamber, at 37 °C. Next day, PEI:DNA complexes were prepared with 16 µg of plasmid DNA for each cell dish in serum-free Opti-MEM, incubated for 20 min at room temperature (RT) and added to the cell culture. Cells were maintained in a CO₂ humid incubation chamber, at 37 °C, overnight. Then, the culture medium was removed, the cells were washed gently with phosphate-buffered saline (PBS) to remove residual FBS and the medium was replaced with a serum-free Opti-MEM supplemented with 4 mM L-glutamine (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) and 1 mM sodium pyruvate (Gibco). The supernatant containing the expressed proteins was collected 72 h after transfection, centrifuged for 20 min at 4,000 g, 4 °C and filtered through a 0.22 µm filter to remove cells and debris. Phenylmethylsulfonyl fluoride protease inhibitor (PMSF; Sigma-Aldrich) has been added to prevent protein degradation. The supernatant was purified on a HisTrap FF column (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) using IMAC equilibration buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol) and IMAC elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10% glycerol). The protein was eluted with a linear 20–500 mM imidazole gradient. For buffer exchange and protein concentration, the eluate was placed in a Amicon Ultra-4 3 K Centrifugal Filter Device (Merck Millipore, Massachusetts, USA). The device was loaded with a RBD:PBS 1:3 v/v ratio and centrifuged at 4,500 g at 4 °C until only 500 µl remained in the unit. This step was repeated twice. Sample purity was confirmed by 15% SDS-PAGE gels. The expression, purification and protein analysis can be found in supplementary material.

N protein N-terminal domain (NTD). *Escherichia coli* BL21 (DE3) was transformed with a pET28a His-tagged construct (GenScript New Jersey, USA) encoding for the amino acid residues 44 to 180 of the N-terminal RNA-binding globular domain of the Nucleocapsid protein, N (N-NTD)⁵². Bacteria were grown in LB medium with 50 µg/ml kanamycin. Protein expression was induced with 0.2 mM IPTG when optical density (OD) reached 0.6–0.8 at 600 nm. After 16 h of induction at 16 °C, cells were centrifuged, pelleted resuspended and disrupted by ultrasonication in lysis buffer: 50 mM Tris-HCl (pH 8), 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol, and 43 mg/L of protease inhibitor cocktail (P8465—Sigma-Aldrich, Burlington, MA, USA). The lysate was centrifuged at 12,000 g for 60 min at 4 °C. The supernatant was filtered and applied to an HisTrap FF affinity column (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA). N-NTD recombinant protein was purified by IMAC as described previously for RBD. For the preparation of the sample used in this study, His-tag was removed by an overnight cleavage with TEV protease (TEV:protein 1:10 molar ratio) during dialysis against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 8, containing 500 mM NaCl and 1 mM DTT, followed a reverse IMAC at a flow rate of 1 ml/min.

However, to the best of our knowledge, we are unaware of evidence indicating that the His-tag tail interfere with the assay. At the end of the purification, 500 μM PMSF, 3 mM sodium azide, and 3 mM EDTA were added to pooled fractions containing the protein. The purity of the samples was confirmed by 18% SDS–PAGE gels.

Sera samples. A total of 240 blood samples were collected from 126 individuals in the Laboratory of Clinical Analysis of the School of Pharmacy at Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). All participants completed a written informed consent and answered a survey providing data on demographics, medical history, symptoms, and history of travel abroad before enrolled in the study, which was approved by the local ethics committee (CEP HUCFF/UFRJ approval #35,303,120.5.0000.5257). The cohort was divided into two groups: (i) samples collected from 23 individuals who tested positive in a PCR assay for SARS-CoV-2, between April 2020 and January 2021, before enrolling in the study (PCR+); and (ii) samples collected from 103 individuals without confirmed diagnosis for SARS-CoV-2 infection, from whom samples were collected twice, firstly between October and November 2020 and then between February and April 2021. From these two groups, 7 individuals from the PCR+ group and 11 individuals from the undiagnosed group were selected for blood collection 20 days after they received the first dose of ChAdOx1 nCoV-19 or CoronaVac vaccines. All the sera samples were aliquoted, heat inactivated at 56 °C for 30 min and stored in –80 °C until further analysis. Additionally, pre-pandemic samples collected from 42 individuals before 2019 used as negative controls.

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The assay presented here was adapted from a previously reported protocol¹⁶. Reactivity of types of sera antibodies—IgG, IgA, and IgM—against three SARS-CoV-2 antigens—trimeric Spike (S), RBD and N-NTD was analyzed. Briefly, each 96-well plate (Corning® Costar®, Life Science, New York, USA) was coated with 50 μl per well of one of the antigens and incubated at 4 °C overnight. After blocking, 80 μl serum samples (heat-inactivated at 56 °C for 30 min) were added per well. The presence of reactive IgG, IgA or IgM in sera samples was detected using mouse anti-human IgG (Fc specific), goat anti-human IgA (α -chain specific), or goat anti-human IgM (μ -chain specific), respectively, conjugated with HRP (Sigma-Aldrich, Missouri, USA). Sera reactivity was developed using the chromogenic reagent 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine dihydrochloride (TMB substrate solution, Thermo Fisher, Massachusetts, USA). Absorbance values at 450 nm were determined on a VICTOR Multilabel plate reader (PerkinElmer).

Cut-off calculations. The cut-off values for each antigen and each detection antibody were first determined using the average OD plus 3 standard deviations (SD) of the 42 pre-pandemic samples. The evaluation of the performance of the tests was assessed by calculating sensitivity, specificity, positive and negative predicted values with their 95% confidence intervals using Prism v8 (GraphPad, USA). Alternatively, the receiver-operating characteristic (ROC) curve was generated for each test to define the optimal threshold cutoff value that distinguishes positive from negative samples. The area under the curve (AUC), sensitivity and specificity for all thresholds were determined using the online calculator easyROC⁵³. Then, the optimal cutoff point was selected based on the point with the highest Youden index J ($J = \text{sensitivity} + \text{specificity} - 1$). This is the point on the curve where the distance to the diagonal line (line of equality) is maximum.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using Prism v8 (GraphPad, USA) and easyROC online web-tool for ROC curve analysis (ver. 1.3.1)⁵³.

Ethics approval. This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki under approval by the local ethics committee CONEP/CEP HUCFF/UFRJ #35303120.5.0000.5257.

Consent to participate. Informed consent was obtained from each participant included in this study.

Data availability

The original datasets and analyses of this study are available in the figshare repository <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.19203893>.

Received: 7 February 2022; Accepted: 3 June 2022

Published online: 20 June 2022

References

1. Wu, F. *et al.* A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269 (2020).
2. Zhu, N. *et al.* A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* **382**, 727–733 (2020).
3. Hoffmann, M. *et al.* SARS-CoV-2 cell entry depends on ACE2 and TMPRSS2 and is blocked by a clinically proven protease inhibitor. *Cell* **181**, 271–280 (2020).
4. WHO. *WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard*. <https://covid19.who.int/>
5. Lewnard, J. A. & Lo, N. C. Scientific and ethical basis for social-distancing interventions against COVID-19. *Lancet Infect. Dis.* **20**, 631–633 (2020).
6. Song, F. & Bachmann, M. O. Vaccination against COVID-19 and society's return to normality in England: A modelling study of impacts of different types of naturally acquired and vaccine-induced immunity. *BMJ Open* **11**, e053507. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2021-053507> (2021).
7. Landsberg, H. E. *et al.* Efficacy of Pfizer-BioNTech in SARS-CoV-2 Delta cluster. *Int. J. Infect. Dis.* **114**, 62–64 (2021).
8. Theel, E. S. *et al.* The role of antibody testing for SARS-CoV-2: Is there one?. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e00797–e820. <https://doi.org/10.1128/JCM.00797-20> (2020).

9. Van Egeren, D. *et al.* Controlling long-term SARS-CoV-2 infections can slow viral evolution and reduce the risk of treatment failure. *Sci. Rep.* **11**, 22630. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-02148-8> (2021).
10. CDC (2021) *Interim Guidelines for COVID-19 Antibody Testing in Clinical and Public Health Settings*. <https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/lab/resources/antibody-tests-guidelines.html>
11. Machado, B. A. S., Hodel, K. V. S., Barbosa-Júnior, V. G., Soares, M. B. P. & Badaró, R. The main molecular and serological methods for diagnosing COVID-19: An overview based on the literature. *Viruses* **13**, 40. <https://doi.org/10.3390/v13010040> (2020).
12. Shrock, E. *et al.* Viral epitope profiling of COVID-19 patients reveals cross-reactivity and correlates of severity. *Science* **370**, eabd4250. <https://doi.org/10.1126/science.abd4250> (2020).
13. Becker, M. *et al.* Exploring beyond clinical routine SARS-CoV-2 serology using MultiCoV-Ab to evaluate endemic coronavirus cross-reactivity. *Nat. Commun.* **12**, 1152. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20973-3> (2021).
14. Piccoli, L. *et al.* Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology. *Cell* **183**, 1024–1042 (2020).
15. Iyer, A. S. *et al.* Persistence and decay of human antibody responses to the receptor binding domain of SARS-CoV-2 spike protein in COVID-19 patients. *Sci. Immunol.* **5**, eabe0367. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe0367> (2020).
16. Stadlbauer, D. *et al.* SARS-CoV-2 seroconversion in humans: A Detailed protocol for a serological assay, antigen production, and test setup. *Curr. Protoc. Microbiol.* **57**, e100. <https://doi.org/10.1002/cpmc.100> (2020).
17. Saraswati, K., Phanichkravakosil, M. & Day, N. P. J. Blacksell SD The validity of diagnostic cut-offs for commercial and in-house scrub typhus IgM and IgG ELISAs: A review of the evidence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0007158. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007158> (2019).
18. Faccini-Martínez, Á. A. *et al.* Serological cross-reactivity using a SARS-CoV-2 ELISA test in acute Zika virus infection, Colombia. *Int. J. Infect. Dis.* **101**, 191–193 (2020).
19. Gao, Q. *et al.* Development of an inactivated vaccine candidate for SARS-CoV-2. *Science* **369**, 77–81 (2020).
20. van Doremalen, N. *et al.* (2020) ChAdOx1 nCoV-19 vaccine prevents SARS-CoV-2 pneumonia in rhesus macaques. *Nature* **586**, 578–582 (2020).
21. Krammer, F. Simon V Serology assays to manage COVID-19. *Science* **1227**, 1–5 (2020).
22. Marién, J. *et al.* Evaluating SARS-CoV-2 spike and nucleocapsid proteins as targets for antibody detection in severe and mild COVID-19 cases using a Luminex bead-based assay. *J. Virol. Methods* **288**, 114025. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.114025> (2020).
23. Phan, I. Q. *et al.* In silico detection of SARS-CoV-2 specific B-cell epitopes and validation in ELISA for serological diagnosis of COVID-19. *Sci. Rep.* **11**, 4290. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-83730-y> (2021).
24. Alvim, R. G. F., Lima, T. M., Rodrigues, D. A. S., Marsili, F. F., Bozza, V. B. T., Vale, A. M. Development and large-scale validation of a highly accurate SARS-CoV-2 serological test using regular test strips for autonomous and affordable finger-prick sample collection, transportation, and storage. Preprint at medRxiv <https://doi.org/10.1101/2020.07.13.20152884> (2021).
25. Premkumar, L. *et al.* The receptor binding domain of the viral spike protein is an immunodominant and highly specific target of antibodies in SARS-CoV-2 patients. *Sci. Immunol.* **5**, eabc8413. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abc8413> (2020).
26. Robbiani, D. F. *et al.* Convergent antibody responses to SARS-CoV-2 in convalescent individuals. *Nature* **584**, 437–442 (2020).
27. Peterhoff, D. *et al.* A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization. *Infection* **49**, 75–82 (2021).
28. Yuen, R. R. *et al.* Novel ELISA protocol links pre-existing SARS-CoV-2 reactive antibodies with endemic coronavirus immunity and age and reveals improved serologic identification of acute COVID-19 via multi-parameter detection. *Front Immunol.* **12**, 614676. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.614676> (2021).
29. Ha, B. *et al.* Evaluation of a SARS-CoV-2 capture IgM antibody assay in convalescent Sera. *Microbiol Spectr* **9**, e0045821. <https://doi.org/10.1128/Spectrum.00458-21> (2021).
30. Infantino, M. *et al.* Closing the serological gap in the diagnostic testing for COVID-19: The value of anti-SARS-CoV-2 IgA antibodies. *J. Med. Virol.* **93**, 1436–1442 (2021).
31. Sil, B. K. *et al.* Development and performance evaluation of a rapid in-house ELISA for retrospective serosurveillance of SARS-CoV-2. *PLoS ONE* **16**, e0246346. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0246346> (2021).
32. Lopez-Raton, M., Rodriguez-Alvarez, M. X., Cadarso-Suarez, C. & Gude-Sampedro, F. OptimalCutpoints: An R package for selecting optimal cutpoints in diagnostic tests. *J. Stat. Soft.* **61**, 1–36 (2014).
33. Guo, L. *et al.* Profiling early humoral response to diagnose novel coronavirus disease (COVID-19). *Clin. Infect. Dis.* **71**, 778–785 (2020).
34. Bates, T. A. *et al.* Cross-reactivity of SARS-CoV structural protein antibodies against SARS-CoV-2. *Cell Rep.* **34**, 108737. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108737> (2021).
35. Dobaño, C. *et al.* Immunogenicity and crossreactivity of antibodies to the nucleocapsid protein of SARS-CoV-2: utility and limitations in seroprevalence and immunity studies. *Transl. Res.* **232**, 60–74 (2021).
36. Masenyi, S. *et al.* Serological cross-reaction and coinfection of dengue and COVID-19 in Asia: Experience from Indonesia. *Int. J. Infect. Dis.* **102**, 152–154 (2021).
37. Burbelo, P. D. *et al.* Sensitivity in detection of antibodies to nucleocapsid and spike proteins of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 in patients with coronavirus disease 2019. *J. Infect. Dis.* **222**, 206–213 (2020).
38. Murrell, I. *et al.* Temporal development and neutralising potential of antibodies against SARS-CoV-2 in hospitalised COVID-19 patients: An observational cohort study. *PLoS ONE* **16**, e0245382. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245382> (2021).
39. Röltgen, K. *et al.* Defining the features and duration of antibody responses to SARS-CoV-2 infection associated with disease severity and outcome. *Sci. Immunol.* **5**, 0240. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abe0240> (2020).
40. Garcia-Beltran, W. F. *et al.* COVID-19-neutralizing antibodies predict disease severity and survival. *Cell* **184**, 476–488. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.12.015> (2021).
41. Dan, J. M. *et al.* Immunological memory to SARS-CoV-2 assessed for up to 8 months after infection. *Science* **371**, eabf4063. <https://doi.org/10.1126/science.abf4063> (2021).
42. Liu, W. *et al.* Evaluation of nucleocapsid and spike protein-based enzyme-linked immunosorbent assays for detecting antibodies against SARS-CoV-2. *J. Clin. Microbiol.* **58**, e00461. <https://doi.org/10.1128/JCM.00461-20> (2020).
43. McAndrews, K. M. *et al.* Heterogeneous antibodies against SARS-CoV-2 spike receptor binding domain and nucleocapsid with implications for COVID-19 immunity. *JCI Insight* **5**, e142386. <https://doi.org/10.1172/jci.insight.142386> (2020).
44. Garritsen, A. *et al.* Two-tiered SARS-CoV-2 seroconversion screening in the Netherlands and stability of nucleocapsid, spike protein domain 1 and neutralizing antibodies. *Infect. Dis. (Lond.)* **53**, 498–512 (2021).
45. Long, Q. X. *et al.* Clinical and immunological assessment of asymptomatic SARS-CoV-2 infections. *Nat. Med.* **26**, 1200–1204 (2020).
46. Xiao, T. *et al.* Early viral clearance and antibody kinetics of COVID-19 among asymptomatic carriers. *Front. Med. (Lausanne)* **8**, 595773. <https://doi.org/10.3389/fmed.2021.595773> (2021).
47. Dong, E., Du, H. & Gardner, L. An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *Lancet Inf. Dis.* **20**, 533–534 (2020).
48. Bochnia-Bueno, L. *et al.* Dynamic of humoral response to SARS-CoV-2 anti-Nucleocapsid and Spike proteins after CoronaVac vaccination. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **102**, 115597. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2021.115597> (2021).

49. Shaw, R. H. *et al.* Heterologous prime-boost COVID-19 vaccination: initial reactogenicity data. *Lancet* **397**, 2043–2046 (2021).
50. Schubert, M., Bertoglio, F., Steinke, S. *et al.* Human serum from SARS-CoV-2 vaccinated and COVID-19 patients shows reduced binding to the RBD of SARS-CoV-2 Omicron variant in comparison to the original Wuhan strain and the Beta and Delta variants. Preprint at medRxiv. <https://doi.org/10.1101/2021.12.10.21267523> (2021)
51. Tai, W. *et al.* Characterization of the receptor-binding domain (RBD) of 2019 novel coronavirus: Implication for development of RBD protein as a viral attachment inhibitor and vaccine. *Cell Mol. Immunol.* **17**, 613–620 (2020).
52. Altincekic, N. *et al.* Large-scale recombinant production of the SARS-CoV-2 proteome for high-throughput and structural biology applications. *Front. Mol. Biosci.* **8**, 89. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.653148> (2021).
53. Goksuluk, D., Korkmaz, S., Zararsiz, G. & Karaagaoglu, A. E. easyroc: An interactive web-tool for roc curve analysis using r language environment. *R. J.* **8**, 213–230 (2016).

Acknowledgements

We thank Dr. Marcos Fleury and all the members of Laboratory of Clinical Analysis of the School of Pharmacy (LACFar, UFRJ, Brazil) for performing blood collections and sample preparation; Dr. Orlando Ferreira, Dr. Amílcar Tanuri and the Laboratory of Molecular Virology (UFRJ, Brazil) for providing the pre-pandemic sera; and Dr. Leda Castilho (COPPE, UFRJ, Brazil) for providing the S protein. We kindly thank the fundamental administrative and financial support received from our colleagues of the Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, UFRJ.

Author contributions

Conceptualization and design: all authors contributed to the study conception and design; Methodology: ELISA was performed by L.O.F.S., F.A.P.F.; Antigen expression and purification was performed by F.A.P.F., B.G.S., N.C.M.A., T.C.N.M.; Formal analysis and investigation: L.O.F.S., F.A.P.F., D.S.; Writing—original draft preparation: L.O.F.S., F.A.P.F., D.S., G.C.F., A.T.P.; Writing—review and editing: L.O.F.S., F.A.P.F., D.S., A.T.P., L.S.W., G.C.F.; Funding acquisition: A.T.P.; Resources: A.T.P., G.C.F., F.C.L.A.; Supervision: A.T.P.

Funding

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil, grant numbers E-26/201.173/2021, E-26/211.128/2021; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, grant number 312650/2021–3.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14294-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to A.T.P.

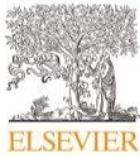
Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Clinical Virology Plus

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jcvp



Short communication

IgA quantification as a good predictor of the neutralizing antibodies levels after vaccination against SARS-CoV-2



Lorena O. Fernandes-Siqueira^a, Bruna G. Sousa^a, Carlos E. Cleto^a, Luciana S. Wermelinger^b, Beatriz L.L. Caetano^c, Agatha R. Pacheco^c, Simone M. Costa^c, Fabio C.L. Almeida^a, Gustavo C. Ferreira^a, Didier Salmon^a, Ada M.B. Alves^c, Andrea T. Da Poian^{a,*}

^aInstituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

^bFaculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 21941-902, Brazil

^cLaboratório de Biotecnologia e Fisiologia das Infecções Virais, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2

Vaccination

IgG

IgA

Neutralizing antibodies

ABSTRACT

Background: Vaccination against COVID-19 was implemented very quickly, but the emergence of new variants that can evade the previous acquired immunological protection highlights the importance of understanding the mechanisms involved in the immune response generated after SARS-CoV-2 infection or vaccination.

Objectives: Since most of our knowledge on the humoral immunity generated against SARS-CoV-2 has been obtained from studies with infected patients before vaccination, our goal here was to evaluate seroconversion and its correlation with the titers of neutralizing antibodies (NABs) in individuals who received the complete initial recommended vaccination schedule with three different vaccines.

Study design: We analyzed serum IgG, IgA and total NABs against the trimeric SARS-CoV-2 Spike (S) protein or its receptor binding domain (RBD) in blood samples collected from 118 healthy individuals without known previous infection, before and after receiving the first and the second dose of CoronaVac ($n = 18$), ChAdOx-1 ($n = 68$) or BNT162b2 ($n = 32$) vaccines.

Results: We found that although IgG titers were high in all sera collected after the two doses of these vaccines, NABs amounts varies among the groups. In contrast, serum NABs concentrations were much more comparable to the IgA levels, indicating that these antibodies would have a major neutralizing capacity against SARS-CoV-2.

Conclusions: Altogether our data suggest that quantification of serum anti-S or anti-RBD IgA, rather than IgG, may be a valuable tool to screen NABs and may be considered for surveillance of vaccine coverage.

1. Background

The lack of effective treatments for COVID-19 control led to the rapid development of several types of immunizing agents against SARS-CoV-2 early in the pandemic [1]. In April 2022, ten different vaccines were approved for large scale immunization worldwide [2] and currently 199 vaccine candidates are in the preclinical phase and 172 in clinical development [3]. Presently, about 68% of the world's population received at least one vaccine dose [4], but there are still many challenges to achieve a full protection against the disease and/or infection, including the development of strategies to induce long-term immunization and protection against new variants [5,6].

The quantification of serum antibodies (Abs), usually IgG, is an important tool for monitoring infection [7] and vaccination coverage [8], but not all Abs induced by the immunizing agent are neutralizing antibodies (NABs) [9]. Thus, NABs' quantification represents the most ap-

propriate way to verify the humoral protection against infection [10], but the assay costs make them inconvenient for serological surveillance.

2. Study design

We analyzed NABs and IgG and IgA responses against SARS-CoV-2 Spike (S) protein or its receptor binding domain (RBD) in a cohort of 118 healthy individuals before and after receiving the first and the second doses of either CoronaVac ($n = 18$), ChAdOx-1 ($n = 68$) or BNT162b2 ($n = 32$) vaccines. A total of 250 blood samples were collected 15 to 30 days before vaccination (T0), 15 to 20 days after the first dose (T1), and/or 15 to 60 days after the second dose (T2) of each vaccine, according to the scheme represented in Fig. 1. The participants completed an informed consent form and answered a survey providing data on demographics, medical history, and vaccine information, approved by the local ethics committees (CEP approvals HUCFF/UFRJ #35,303,120.5.0000.5257 and IOC/Fiocruz

* Corresponding author.

E-mail address: dapoian@bioqmed.ufrj.br (A.T. Da Poian).

<https://doi.org/10.1016/j.jcvp.2022.100121>

Received 29 July 2022; Received in revised form 28 September 2022; Accepted 3 November 2022

2667-0380/© 2022 The Authors. Published by Elsevier Ltd. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license

(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

Abbreviations

S	Spike protein;
RBD	receptor binding domain;
Abs	antibodies;
NAbs	neutralizing antibodies;
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

CAAE #56246022.1.0000.5248). Participants with previous SARS-CoV-2 infection were excluded.

We quantified IgG and IgA antibodies against the S and RBD proteins (Wuhan strain) in all sera samples at T0, T1 and T2, using an in-house ELISA assay previously developed and validated by our group [11], and NAbs concentration in T2 using the immunoenzymatic GenScript cPass™ SARS-CoV-2 assay. Demographic information of the participants is shown in Table 1.

3. Results

After the complete initial recommended vaccination schedule (two doses; T2), the three vaccines induced high anti-S (Fig. 2A,F,K) and anti-RBD (Fig. 2B,G,L) IgG titers. Individuals vaccinated with ChAdOx-1 and BNT162b2 also presented high levels of anti-S IgG after the first dose

(T1) (Fig. 2F,K). Regarding IgA response, we observed that CoronaVac did not induce a significant increase in either anti-S or anti-RBD IgA, even after the second dose (Fig. 2C,D), while some of participants vaccinated with ChAdOx-1 presented anti-S and anti-RBD IgA reactivity in T2 (Fig. 2H,I). BNT162b2 vaccine induced high anti-S IgA titers even in the T1, with a remarkable increase after the second dose (T2). In this case the anti-S IgA, the titers were slightly higher than those of anti-RBD IgA (Fig. 2M,N). Variations in our sample regarding the time span upon vaccination (15 to 60 days after T2), the age range of the participants (from 18 to 60 years) or the difference in the ratio of females and males for the three vaccination regimens did not affect the serum Abs profile. (Suppl. Fig. 1).

To better understand whether the different antibody responses generated by the vaccines could be associated with the protection they provide, we evaluated the percentage of NAbs in T2. On average, high NAbs' levels were found in participants who received the BNT162b2 (1086.4 UI/ml), while lower levels were observed in individuals who received ChAdOx-1 (439.5 UI/ml) and even lower for CoronaVac (162.2 UI/ml) (Fig. 2E,J,O). NAbs levels were not affected by demographic aspects such as sex, age and presence of previous comorbidities (Suppl. Fig. 2).

Although the three vaccines induced high levels of IgG, serum NAbs concentrations were much more comparable to the IgA levels (Suppl. Fig. 3). When the individuals showing high IgG titers were grouped according to their NAbs levels, they appear equally distributed among the groups. In contrast, most of the individuals with high IgA titers exhib-

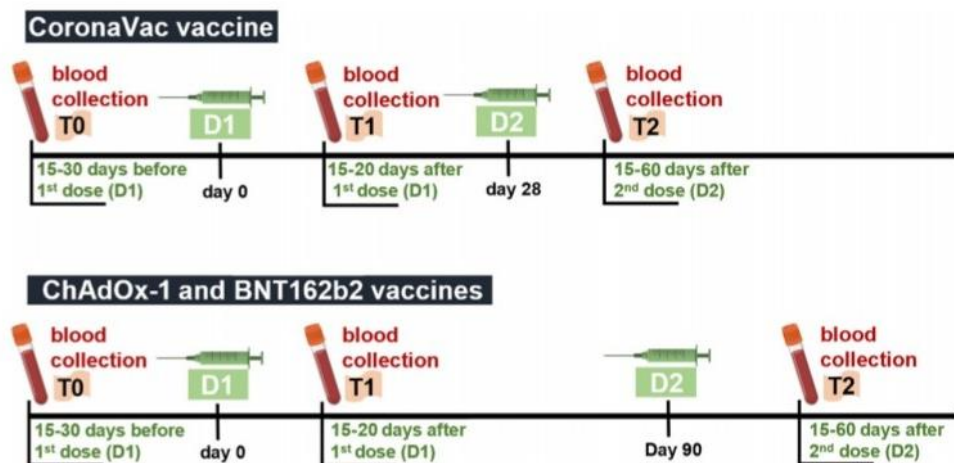


Fig. 1. Diagram representing the blood collection scheme. A total of 250 blood samples were collected from 118 healthy individuals 15 to 30 days before vaccination (T0), 15 to 20 days after receiving the first dose (T1), and/or 15 to 60 days after receiving the second dose (T2) of either CoronaVac ($n = 18$), ChAdOx-1 ($n = 68$) or BNT162b2 ($n = 32$) vaccines. It is important to consider that not all participants underwent the three blood collections. We highlight that the participants vaccinated with CoronaVac received the second dose 28 days after receiving the first dose, while those vaccinated with ChAdOx-1 or BNT162b2 received the second dose 90 days after the first dose, according to the immunization protocols adopted by the Brazilian Ministry of Health. Blood samples were collected from 2020 to 2022 in the Laboratório de Análises Clínicas of the Faculdade de Farmácia at the Universidade Federal do Rio de Janeiro and in the Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia das Infecções Virais of the Instituto Oswaldo Cruz. All samples were heat-inactivated at 56 °C for 30 min, aliquoted, and stored at -80 °C until further analysis.

Table 1
Subject demographics and clinical characteristics.

Characteristics	CoronaVac ($n = 18$)	ChAdOx-1 ($n = 68$)	BNT162b2 ($n = 32$)
Age, average (range)	38 (22 - 60)	34 (22-58)	39 (21 - 60)
Sex,% (n)			
Female	89 (16)	72 (49)	56 (18)
Male	11 (2)	28 (19)	44 (14)
Comorbidities,% (n)			
Diabetes mellitus	0	4.4 (3)	3.1 (1)
Hypertension	5.5 (1)	8.8 (6)	12.5 (4)
Lung diseases	0	4.4 (3)	3.1 (1)
Autoimmune disease	0	5.8 (4)	0
Other comorbidities	5.5 (1)	2.9 (2)	3.1 (1)

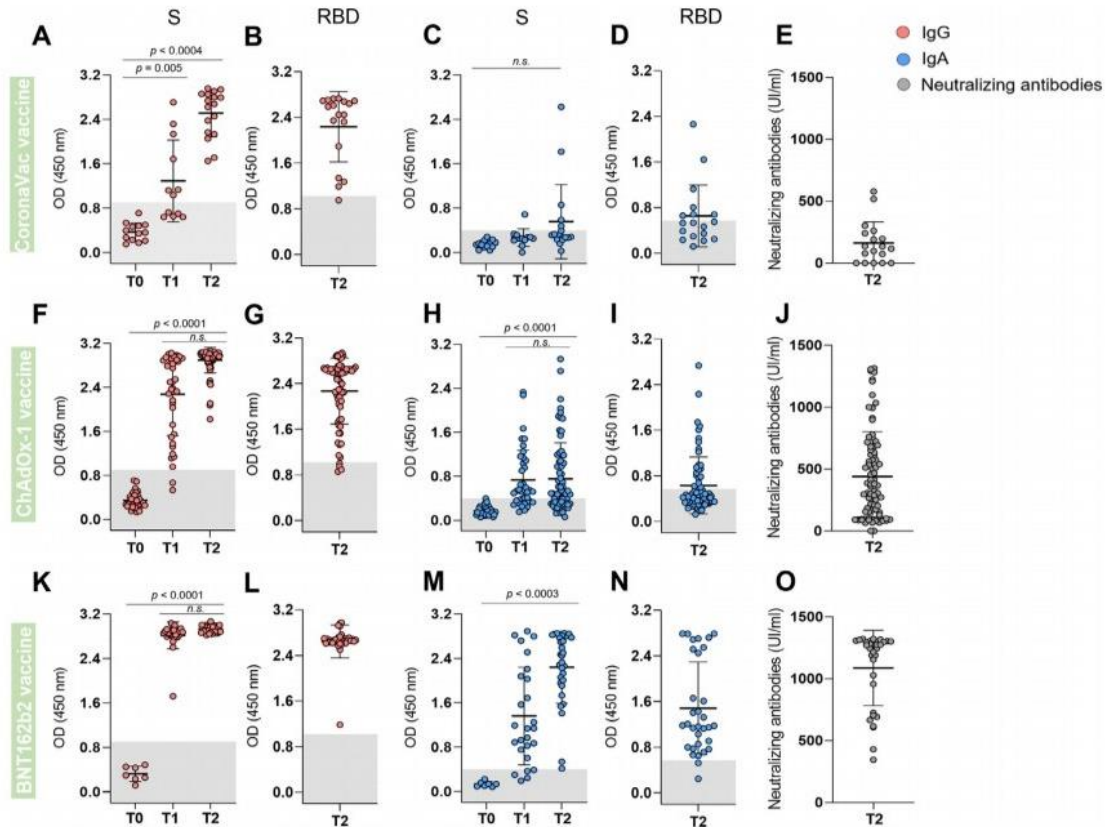


Fig. 2. Serum antibody levels before and after vaccination. Serum samples from subjects who received CoronaVac (A-E), ChAdOx-1 (F-J), or BNT162b2 (K-O) vaccines were analyzed 15 to 30 days before vaccination (T0); 15 to 20 days after receiving the first dose of one vaccine (T1); and 15 to 60 days after receiving the second vaccine dose (T2). Reactivity of IgG (A, B, F, G, K, L – red symbols) or IgA (C, D, H, I, M, N – blue symbols) against S (A, C, F, H, K, M) and RBD (B, D, G, I, L, N) of SARS-CoV-2 (Wuhan strain) was analyzed by ELISA. Briefly, sera samples diluted 1:50 in a 1% BSA solution in PBS-T were incubated for 2 h in 96 well-plates previously coated overnight, at 4 °C, with each of the antigens (50 µl of a 4 µg/ml solution), and blocked for 1 h with 3% BSA in PBS-T. The samples were incubated for 1 h with the detection antibodies (pan anti-IgG or pan anti-IgA, which recognizes all Ig isotypes) and reactivity was quantified spectrophotometrically at 450 nm after the addition of the chromogenic substrate (3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, TMB). The gray band in the graphs represents the cut-off of each analysis, calculated as the mean + 3 SD of the absorbance values of 42 pre-pandemic sera. Semi-quantification of NABs (E, J, O – dark gray symbols) was conducted using the cPass™ kit (GenScript). The NABs titers were determined using a calibrator based on a standard neutralizing curve (WHO-GenScript). The inhibition rate of RBD binding to the ACE2 was the product of the interpolated titer from the standard curve and the sample dilution factor required to achieve the OD₄₅₀ value that falls within the linear range. NABs' titers were significantly different between CoronaVac x ChAdOx-1 ($p = 0.0026$), CoronaVac x BNT162b2 ($p < 0.0001$) or ChAdOx-1 x BNT162b2 ($p < 0.0001$). Data were analyzed using ANOVA test followed by Sidak test using the GraphPad Prism V.8 program.

ited high (60%) NABs levels, while 32% presented medium and only a marginal group (8%) presented low NABs levels. In the IgA negative group, in turn, only 5% individuals presented high NABs levels. These results suggest that individuals having high IgA levels are more likely to have also more NABs.

4. Discussion

Vaccination against SARS-CoV-2 was implemented very quickly, but most of our knowledge on the humoral immunity against the virus has been obtained with infected patients before vaccination. These studies showed that the post-infection levels of IgG and IgM produced against S and N (nucleocapsid) proteins waned in a few months [12–15]. On the other hand, the dynamics of serum IgA against SARS-CoV-2 proteins are still poorly understood. Some studies showed a long-term decay of IgA titers [16,17], but more recent studies with vaccinated individuals showed that both serum IgA and IgG waned in a short period [18–20].

As IgA is the predominant serum immunoglobulin at the onset of disease and its titers correlated with the disease severity [21], it is reasonable to hypothesize that it plays a role in the infection control. Furthermore, IgAs produced in the mucosa are potent NABs that efficiently stop SARS-CoV-2 infection [22].

NABs produced after infection or vaccination are essential for protection against new infections [23,9]. During SARS-CoV-2 infection, the majority neutralizing antibodies are produced against RBD [24], suggesting these antibodies as the choice for serological surveillance [25]. However, a recent study showed that plasma IgA from >60% of a cohort of early convalescent COVID-19 subjects inhibited the interaction between RBD and ACE2 [26]. Therefore, monitoring the serum IgA response in the context of vaccination is critical to address its protective role in the polyclonal antibody response. Accordingly, our study shows a high correspondence between NABs levels and the IgA response after two doses of SARS-CoV-2 vaccines, particularly ChAdOx-1 or BNT162b2. CoronaVac did not induce anti-S or anti-RBD IgA and

generated low NAb titers. However, the importance of the cellular immune response should also be considered [27,28], as data from subjects vaccinated with CoronaVac confirmed its safety and efficacy [29]. Indeed, its use in the pandemic early stages offered good protection against reinfection, even before the booster dose [30,31]. Moreover, the high level of serum IgG generated by CoronaVac could mediate the antibody-dependent phagocytosis, contributing to the virus clearance [26].

The immune response generated by ChAdOx-1 [32] and especially by BNT162b2 [33] has been shown to be quite effective in producing NAb, corroborating the data presented here. Moreover, we showed that despite the high S and RBD-specific IgG production induced for all three vaccines, the levels of this immunoglobulin did not correlate to the NAb. Nonetheless, it is important to note that we used here a high sensitivity ELISA, which allows most samples to be classified far above the cutoff. In addition, the cPass kit does not quantify all neutralizing antibodies, only those capable of binding and inhibit the interaction between RBD and ACE2.

In summary, our data showed that the serum IgA profile in vaccinated subjects is very similar to that of NAb, which agrees with findings highlighting the robust IgA neutralizing capacity after infection by SARS-CoV-2 [34,35]. In conclusion, we suggest that quantification of serum anti-S or anti-RBD IgA, rather than IgG, may be a valuable tool to screen NAb and may be considered for surveillance of vaccine coverage.

Funding

This work was supported by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Brazil [grant number E-26/211.128/2021, E-26/201.173/2021, E-26/211.134/2021, E-26/210.784/2021]; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil [grant number 312650/2021-3; 310361/2019-2]; National Institute of Science and Technology in Vaccines (INCTV), Brazil [grant number 465293/2014-0].

Ethics approval

This study was performed according to the principles of the Declaration of Helsinki under approval by the local ethics committee CONEP/CEP HUCFF/UFRJ #35303120.5.0000.5257 and IOC/Fiocruz CAAE #56246022.1.0000.5248.

Consent to participate

Informed consent was obtained from each participant included in this study.

CRedit author statement

Lorena O. Fernandes-Siqueira: conceptualization; design; methodology; ELISA; data curation; formal analysis; investigation; writing: original draft preparation, review and editing. **Bruna G. Sousa:** methodology; antigen expression and purification. **Carlos E. Cleto:** data curation; formal analysis. **Luciana S. Wermelinger:** conceptualization; design; sample preparation; writing: review and editing. **Beatriz L. L. Caetano:** methodology; Nabs quantification; formal analysis. **Agatha R. Pacheco:** methodology; Nabs quantification; formal analysis. **Simone M. Costa:** methodology; Nabs quantification; formal analysis. **Fabio C. L. Almeida:** conceptualization; design; resources. **Gustavo C. Ferreira:** conceptualization; design; writing: review and editing. **Didier Salmon:** conceptualization; design; writing: review and editing. **Ada M. B. Alves:** design; formal analysis; writing: review and editing; resources; funding acquisition. **Andrea T. Da Poian:** conceptualization; design; writing: review and editing; resources; funding acquisition; supervision.

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Marcos Fleury and all the members of Laboratório de Análises Clínicas, Faculdade de Farmácia (LACFar, UFRJ, Brazil), and Thiago Rodrigues Machado from the Laboratório de Biotecnologia e Fisiologia das Infecções Virais (IOC/Fiocruz), for performing the blood collections and sample preparation. We also thank Dr. Leda Castilho (COPPE, UFRJ, Brazil) for kindly providing the recombinant S protein.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jcvp.2022.100121.

References

- [1] N. Lurie, M. Savielle, R. Hatchett, J. Halton, Developing Covid-19 vaccines at pandemic speed, *N. Engl. J. Med.* 382 (2020) 1969–1973, doi:10.1056/NEJMp2005630.
- [2] WHO, <https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/covid-19-vaccines/advice>, 2022 (Accessed 26 September 2022).
- [3] WHO, <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>, 2022 (Accessed 26 September 2022).
- [4] H. Ritchie, E. Mathieu, L. Rodés-Guirao, C. Appel, C. Giattino, E. Ortiz-Ospina, J. Hasell, B. Macdonald, D. Beltekian, M. Roser, "Coronavirus Pandemic (COVID-19)", <https://ourworldindata.org/coronavirus>, 2020 (Accessed 26 September 2022).
- [5] J.S. Tregoning, K.E. Flight, S.L. Higham, Z. Wang, B.F. Pierce, Progress of the COVID-19 vaccine effort: viruses, vaccines and variants versus efficacy, effectiveness and escape, *Nat. Rev. Immunol.* 21 (10) (2021) 626–636, doi:10.1038/s41577-021-00592-1.
- [6] J.Y. Chung, M.N. Thone, Y.J. Kwon, COVID-19 vaccines: the status and perspectives in delivery points of view, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 170 (2021) 1–25, doi:10.1016/j.addr.2020.12.011.
- [7] C. Gaebler, Z. Wang, J.C.C. Lorenzi, et al., Evolution of antibody immunity to SARS-CoV-2, *Nature* 591 (7851) (2021) 639–644, doi:10.1038/s41586-021-03207-w.
- [8] R. Lozano-Rodríguez, J. Valentín-Quiroga, J. Avendaño-Ortiz, et al., Cellular and humoral functional responses after BNT162b2 mRNA vaccination differ longitudinally between naive and subjects recovered from COVID-19, *Cell Rep.* 38 (2) (2022) 110235, doi:10.1016/j.celrep.2021.110235.
- [9] C. Lucas, J. Klein, M.E. Sundaram, et al., Delayed production of neutralizing antibodies correlates with fatal COVID-19, *Nat. Med.* 27 (2021) 1178–1186, doi:10.1038/s41591-021-01355-0.
- [10] M. Jeyanathan, S. Afkhami, F. Smail, et al., Immunological considerations for COVID-19 vaccine strategies, *Nat. Rev. Immunol.* 20 (2020) 615–632, doi:10.1038/s41577-020-00434-6.
- [11] L.O. Fernandes-Siqueira, F.A.P. Ferreira, ... A. Da Poian, et al., On the caveats of a multiplex test for SARS-CoV-2 to detect seroconversion after infection or vaccination, *Sci. Rep.* 12 (2022) 10366, doi:10.1038/s41598-022-14294-8.
- [12] A.K. Wheatley, J.A. Juno, J.J. Wang, et al., Evolution of immune responses to SARS-CoV-2 in mild-moderate COVID-19, *Nat. Commun.* 12 (1) (2021) 1162, doi:10.1038/s41467-021-21444-5.
- [13] S.F. Lumley, J. Wei, D. O'Donnell, et al., The duration, dynamics, and determinants of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) antibody responses in individual healthcare workers, *Clin. Infect. Dis.* 73 (3) (2021) e699–e709, doi:10.1093/cid/ciab004.
- [14] J. De Greef, A. Scohy, F. Zech, et al., Determinants of IgG antibodies kinetics after severe and critical COVID-19, *J. Med. Virol.* 93 (9) (2021) 5416–5424, doi:10.1002/jmv.27059.
- [15] S. Efrati, M. Catalogna, R.A. Hamed, et al., Early and long term antibody kinetics of asymptomatic and mild disease COVID-19 patients, *Sci. Rep.* 11 (1) (2021) 13780, doi:10.1038/s41598-021-93175-y.
- [16] J. Plíme, A. Galvanovskis, S. Šmite, et al., Early and strong antibody responses to SARS-CoV-2 predict disease severity in COVID-19 patients, *J. Transl. Med.* 20 (2022) 176, doi:10.1186/s12967-022-03382-y.
- [17] V.V. Rangel-Ramírez, K.A. Macías-Piña, R.R.S. Garrido, D.R. de Alba-Aguayo, L. Moreno-Fierros, N. Rubio-Infante, A systematic review and meta-analysis of the IgA seroprevalence in COVID-19 patients; is there a role for IgA in COVID-19 diagnosis or severity? *Microbiol. Res.* (2022) 127105, doi:10.1016/j.micres.2022.127105.
- [18] S. Zurac, C. Vliadan, O. Dinca, C. Constantin, M. Neagu, Immunogenicity evaluation after BNT162b2 booster vaccination in healthcare workers, *Sci. Rep.* 12 (2022) 12716, doi:10.1038/s41598-022-16759-2.
- [19] J.S. Takeuchi, A. Fukunaga, S. Yamamoto, et al., SARS-CoV-2 specific T cell and humoral immune responses upon vaccination with BNT162b2: a 9 months longitudinal study, *Sci. Rep.* 12 (2022) 15447, doi:10.1038/s41598-022-19581-y.

- [20] F. Rammauro, F. Carrión, N. Olivero-Deibe, M. Fló, A. Ferreira, O. Pritsch, S. Bianchi, Humoral immune response characterization of heterologous prime-boost vaccination with CoronaVac and BNT162b2, *Vaccine* 40 (2022) 5189–5196, doi:10.1016/j.vaccine.2022.07.023.
- [21] F.N. Zervou, P. Louie, A. Stachel, I.M. Zacharioudakis, Y. Ortiz-Mendez, K. Thomas, M.E. Agüero-Rosenfeld, SARS-CoV-2 antibodies: IgA correlates with severity of disease in early COVID-19 infection, *J. Med. Virol.* 93 (9) (2021) 5409–5415, doi:10.1002/jmv.27058.
- [22] C. Planchais, I. Fernández, T. Bruel, G.D. de Melo, et al., Potent human broadly SARS-CoV-2-neutralizing IgA and IgG antibodies effective against Omicron BA.1 and BA.2, *J. Exp. Med.* 4 (7) (2022) 219, doi:10.1084/jem.20220638.
- [23] D.S. Khoury, D. Cromer, A. Reynaldi, et al., Neutralizing antibody levels are highly predictive of immune protection from symptomatic SARS-CoV-2 infection, *Nat. Med.* 27 (2021) 1205–1211, doi:10.1038/s41591-021-01377-8.
- [24] L. Piccoli, et al., Mapping neutralizing and immunodominant sites on the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain by structure-guided high-resolution serology, *Cell* 183 (2020) 1024–1042, doi:10.1016/j.cell.2020.09.037.
- [25] D. Peterhoff, V. Glück, M. Vogel, et al., A highly specific and sensitive serological assay detects SARS-CoV-2 antibody levels in COVID-19 patients that correlate with neutralization, *Infection* 49 (1) (2021) 75–82, doi:10.1007/s15010-020-01503-7.
- [26] S.K. Davis, K.J. Selva, E. Lopez, et al., Heterologous SARS-CoV-2 IgA neutralising antibody responses in convalescent plasma (preprint), *MedRxiv* (2022), doi:10.1101/2022.02.06.22270359.
- [27] M. Sadarangani, A. Marchant, T.R. Kollmann, Immunological mechanisms of vaccine-induced protection against COVID-19 in humans, *Nat. Rev. Immunol.* 21 (8) (2021) 475–484, doi:10.1038/s41577-021-00578-z.
- [28] A. Escobar, F.E. Reyes-López, M.L. Acevedo, L. Alonso-Palomares, F. Valiente-Echeverría, et al., Evaluation of the immune response induced by coronaVac 28-day schedule vaccination in a healthy population group, *Front. Immunol.* 12 (2022) 766278, doi:10.3389/fimmu.2021.766278.
- [29] M.D. Tanriover, H.L. Doğanay, M. Akova, et al., Efficacy and safety of an inactivated whole-virion SARS-CoV-2 vaccine (CoronaVac): interim results of a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial in Turkey, *Lancet* 398 (10296) (2021) 213–222, doi:10.1016/S0140-6736(21)01429-X.
- [30] O.T. Ranzani, M.D.T. Hitchings, M. Dorion, T.L. Agostini, R.C. de Paula, P.F. O. de Paula, et al., Effectiveness of the CoronaVac vaccine in older adults during a gamma variant associated epidemic of covid-19 in Brazil: test negative case-control study, *BMJ* 374 (2021) n2015, doi:10.1136/bmj.n2015.
- [31] D.A. Villela, T.G. de Noronha, L.S. Bastos, A.G. Pacheco, O.G. Cruz, L.M. Carvalho, ... C.J. Struchiner, et al., Effectiveness of mass vaccination in Brazil against severe COVID-19 cases, *MedRxiv* (2021), doi:10.1101/2021.09.10.21263084.
- [32] S.A. Madhi, V. Baillie, C.L. Cutland, et al., Efficacy of the ChAdOx1 nCoV-19 Covid-19 Vaccine against the B.1.351 Variant, *N. Engl. J. Med.* 384 (20) (2021) 1885–1898, doi:10.1056/NEJMoa2102214.
- [33] J. Favresse, C. Gillot, L. Di Chiaro, et al., Neutralizing antibodies in COVID-19 patients and vaccine recipients after two doses of BNT162b2, *Viruses* 13 (7) (2021) 1364, doi:10.3390/v13071364.
- [34] D. Sterlin, A. Mathian, M. Miyara, A. Mohr, F. Anna, G. Gorochov, IgA dominates the early neutralizing antibody response to SARS-CoV-2, *Sci. Transl. Med.* 13 (2021) eabd2223, doi:10.1126/scitranslmed.abd2223.
- [35] Z. Wang, J.C.C. Lorenzi, F. Muecksch, et al., Enhanced SARS-CoV-2 neutralization by dimeric IgA, *Sci. Transl. Med.* 13 (2021) eabf1555, doi:10.1126/scitranslmed.abf1555.

Journal of Biological Chemistry

Dengue virus non-structural protein 3 (NS3) inhibits succinate-induced respiration by impairing specific cytochrome c pools in mitochondria

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Full Title:	Dengue virus non-structural protein 3 (NS3) inhibits succinate-induced respiration by impairing specific cytochrome c pools in mitochondria
Short Title:	DENV NS3 inhibits succinate-dependent respiration
Article Type:	Research Article
Section/Category:	Bioenergetics
Keywords:	Dengue virus (DENV); mitochondria; respiratory chain; bioenergetics; metabolism
Corresponding Author:	Andrea T Da Poian, Ph.D. Federal University of Rio de Janeiro Rio de Janeiro, RJ BRAZIL
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	Federal University of Rio de Janeiro
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Bruna G Sousa
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Bruna G Sousa Lorena O Fernandes-Siqueira Marjolly B Caruso Georgia N Saraiva Clara F Carvalho Thais C Neves-Martins Nathane C Mebus-Antunes Antonio Galina Russolina B Zingali Julianna D Zeidler Andrea T Da Poian, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Abstract:	Studies indicate a relationship between host cell metabolism and dengue virus (DENV) replication, including our previous observation that DENV infection affects mitochondrial function, but the mechanisms by which DENV modulates cellular metabolism are still poorly known. Using a proteomics approach, here we identified DENV non-structural protein 3 (NS3) in the mitochondrial fraction from infected cells, where we also found an at least 2-fold downregulation of several proteins belonging to the electron transport system (ETS). Thus, we investigated whether NS3 could modulate mitochondrial bioenergetics. Using a multi-substrate protocol, we observed decreased oxygen consumption rates in isolated liver mitochondria previously incubated with recombinant NS3 protease domain (NS3pro). This NS3-induced impairment in mitochondrial respiration happens without affecting mitochondria's capacity to maintain membrane potential, suggesting that NS3 does not deeply affect mitochondrial function. When assessing the utilization of different substrates

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

**Dengue virus non-structural protein 3 (NS3) inhibits succinate-induced
respiration by impairing specific cytochrome c pools in mitochondria**

Bruna G. Sousa^{1,2}, Lorena O. Fernandes-Siqueira², Marjolly B. Caruso², Georgia N. Saraiva^{1,2}, Clara
F. Carvalho², Thais C. Neves-Martins², Nathane C. Mebus-Antunes², Antonio A. Galina², Russolina
B. Zingali², Julianna D. Zeidler^{2*}, Andrea T. Da Poian^{2*}

¹Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro,
Brazil

²Instituto de Bioquímica Médica Leopoldo de Meis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio
de Janeiro, Brazil

*Corresponding authors

Running title

DENV NS3 inhibits succinate-dependent respiration

Keywords

Dengue virus (DENV), mitochondria, respiratory chain, bioenergetics, metabolism

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

Studies indicate a relationship between host cell metabolism and dengue virus (DENV) replication, including our previous observation that DENV infection affects mitochondrial function, but the mechanisms by which DENV modulates cellular metabolism are still poorly known. Using a proteomics approach, here we identified DENV non-structural protein 3 (NS3) in the mitochondrial fraction from infected cells, where we also found an at least 2-fold downregulation of several proteins belonging to the electron transport system (ETS). Thus, we investigated whether NS3 could modulate mitochondrial bioenergetics. Using a multi-substrate protocol, we observed decreased oxygen consumption rates in isolated liver mitochondria previously incubated with recombinant NS3 protease domain (NS3pro). This NS3-induced impairment in mitochondrial respiration happens without affecting mitochondria's capacity to maintain membrane potential, suggesting that NS3 does not deeply affect mitochondrial function. When assessing the utilization of different substrates individually, NS3pro decreased the respiratory rates associated with malate/pyruvate or succinate in different intensities. A catalytically inactive protease (NS3proS135A) impaired succinate-induced but not malate/pyruvate-induced oxygen consumption, indicating differential protease-dependent and independent mechanisms according to the substrate. Also, neither mitochondrial complex II nor IV activities were directly affected by NS3pro. Surprisingly, cytochrome c supplementation restored oxygen consumption to control levels when we used succinate, but not pyruvate/malate, as the respiratory substrate. The effects on succinate-dependent oxygen consumption were confirmed using the full-length NS3 both in isolated mitochondria and in NS3-transfected cells. Altogether, our data demonstrate that DENV NS3 can modulate mitochondrial bioenergetics, affecting succinate-dedicated cytochrome c pools in a protease-independent manner.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Introduction

As an obligatory intracellular parasite, viruses depend on the host machinery and often evolve to modulate cell metabolism. Dengue virus (DENV), for instance, induce lipophagy in the infected cells, leading to an increase in fatty acid β -oxidation, which sustain the cellular bioenergetics required for optimal production of viral particles (1-3). In this regard, we have previously demonstrated that DENV infection reduces glutamine oxidation in hepatocytes, while glucose is mobilized for anaplerosis, favoring mitochondria's capacity for oxidizing fatty acids (4). However, the viral molecular players mediating these metabolic switches in host cells remained elusive.

Dengue virus (DENV), a member of the *Flaviviridae* family, causes one of the most prevalent tropical infectious diseases worldwide. The viral genome is a single-stranded positive-sense RNA of 11.000 bp that codes for a polyprotein, which is subsequently processed into three structural proteins (C, prM, and E) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) by host and viral (NS3) proteases (5). Dengue virus non-structural proteins participate in multiple steps of DENV replication, the host immune system's scape, and host cell metabolism modulation (6).

DENV NS3 is multi-functional protein with approximately 70 kDa, formed by three structural domains comprising different enzymatic activities, namely the N-terminal trypsin-like serine protease domain (NS3pro), the nucleoside triphosphatase (NTPase) domain, and the C-terminal helicase and RNA 5'-triphosphatase domains (7-10). Thus, NS3 participates in the polyprotein processing, viral RNA replication (unwinding step), and RNA capping. In addition, NS3 also elicits metabolic alterations in mammalian cells. NS3 interacts and stimulates the activity of fatty acid synthase (FASN), redistributing FASN to sites of viral replication and increasing fatty acid synthesis locally (11,12). Therefore, NS3 plays multiple key roles in viral replication and is considered one of the most attractive targets for DENV antiviral therapy (13).

1
2
3
4 It was shown that DENV NS3 can be imported into the mitochondrial matrix, where it finds one
5 of its recently identified host cleavage targets, the protein GrpEL1, a mitochondrial Hsp70 co-
6 chaperon (14). However, it is still unknown whether the mitochondrially-localized NS3 impacts
7 the metabolic functions of this organelle. In a proteomic screening, here we found six viral
8 proteins associated to isolated mitochondria from DENV-infected cells, from which most of the
9 identified peptides belonged to NS3. By incubating recombinant DENV-NS3pro with isolated
10 mouse liver mitochondria, we found that NS3 impaired the mitochondrial electron transport
11 system (ETS) function in a substrate-specific manner. These findings highlight a potential role for
12 DENV NS3 in targeting mitochondrial metabolism in infected cells.
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24

25 **Results**

26 *DENV NS3 localizes in mitochondria of infected cells*

27
28
29 We and others have shown that DENV infection alters mitochondrial function in the host cells,
30 altering the preference of oxidation of energetic substrates in this organelle (4,6,15). To better
31 understand the viral molecular players that mediate these effects, we performed a proteomic
32 analysis of mitochondria isolated from DENV-infected Huh7 cells. In this screening, we were able
33 to identify peptides from six DENV proteins, namely NS3, NS1, NS2A, NS4A, NS5, and the
34 envelope protein (E) in the mitochondria preparation (Table 1), which could be either attached
35 to the mitochondrial surface, inside this organelle or attached to mitochondria-associated
36 membranes (MAM). Most of the viral peptides identified by mass spectrometry (44,4%) belonged
37 to NS3, which covered 46,60% of the whole protein, spanning all its domains (Fig. 1A-B). We also
38 noticed that about half of the proteins downregulated in the mitochondria of infected cells (at
39 least two-fold compared to mock control) were related to metabolism (Fig. 1C). Of these, one-
40 third belonged to the mitochondrial electron transport system (ETS) (Fig. 1C, Table S1). Thus, we
41 wondered whether NS3 could affect mitochondrial metabolism in the host cells.
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 *NS3 protease domain impairs mitochondrial respiration in isolated mitochondria*
5
6
7

8
9
10 Since the NS3 protease domain was shown to be imported into mitochondria more efficiently
11 than the full-length protein (14), we used a recombinant NS3 protease domain (NS3pro, residues
12 1-180) and a catalytically inactive protease domain (NS3proS135A) (Fig. 2A) to investigate
13 whether DENV NS3 directly interfere with the function of respiratory complexes in isolated
14 mitochondria. We incubated isolated mitochondria from mouse liver with recombinant NS3pro
15 or NS3proS135A for one hour on ice before performing functional studies by high-resolution
16 respirometry. Incubation of 200-300 nM NS3pro decreased by about 40% the oxygen
17 consumption rates (OCR) coupled to ATP synthesis (coupled respiration) in isolated mitochondria
18 when we used a multi-substrate protocol (Fig. 2B-C). The coupled respiration, which is calculated
19 by subtracting the state 2 respiration (OCR in the presence of the substrates malate, pyruvate,
20 and succinate, but not ADP) from the OCR in the phosphorylating state of mitochondrial
21 respiration (with all substrates, including ADP), is one of the most important parameters in
22 respirometry since it represents the OCR actually involved in ATP synthesis. At 300 nM
23 concentration, the catalytically inactive NS3proS135A had similar effects on coupled respiration
24 as NS3pro, suggesting that NS3pro affects mitochondria respiration independent of its protease
25 activity when in presence of multiple substrates (Fig. 2C). On the other hand, at 600 nM
26 concentration, NS3pro coupled respiration was deeply impaired (resulting in a decrease of about
27 86% on OCR), while the same concentration of the catalytically inactive NS3proS135A had a much
28 lower effect on coupled respiration (a decrease of 56% on average) (Fig. 2C). These data suggest
29 that at high concentrations (600 nM) NS3pro may impair mitochondrial function likely by
30 degrading mitochondrial proteins non-specifically. However, it also affects mitochondrial
31 respiration independent of its protease activity at lower concentrations (300 nM).
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52

53 A decrease in coupled respiration may represent either an increase in the leak respiration
54 (oxygen consumption that is maintained mainly to compensate proton leak) or an impairment in
55 the ETS efficiency. When we analyzed the leak respiration, here measured as a non-
56 phosphorylating resting state when reducing substrates but not ADP is provided (leak state
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 without adenylates), NS3pro decreased the leak OCR by 21% only at high concentrations (600
5 nM) in a protease-dependent manner – since incubation with NS3proS135A does not cause the
6 same effect (Fig. 2D). This result reinforces that 600 nM of NS3pro dramatically affects
7 mitochondrial function, perturbing even the non-phosphorylating resting state. In addition, since
8 there was no change in leak respiration after mitochondria incubation with 300 nM NS3pro, the
9 decrease in coupled respiration induced by 300 nM NS3pro seems to be due to some impairment
10 in the mitochondrial metabolism rather than an increase in the intrinsic mitochondrial
11 uncoupling or an extrinsic pathological dyscoupling (which could happen due to membrane
12 disruption or other mechanisms of proton leaking).
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22

23
24 The respiratory control ratio (RCR), which represents the ratio of coupled respiration to proton
25 leak respiration, reflects the capacity of mitochondria of phosphorylating ADP into ATP and is a
26 classic parameter to indicate changes in mitochondrial function (16). Since calculating RCR is a
27 way of normalizing the variances of the raw data, we adopted RCR as an indicator of
28 mitochondrial function in the following respirometry data. We observed that NS3pro impaired
29 RCR in a dose-dependent manner (Fig. 2E), reflecting a decrease in mitochondria's efficiency in
30 producing ATP.
31
32
33
34
35
36
37
38

39 To address whether NS3pro impairs mitochondrial function by disrupting the inner membrane
40 integrity, we measured the capacity of mitochondria to maintain membrane potential when
41 incubated with NS3pro. Neither 300 nM nor 600 nM NS3pro impaired mitochondria's capacity to
42 maintain membrane potential, suggesting NS3pro does not affect membrane integrity or deeply
43 damage this organelle even at higher concentrations (Fig. 2F). Also, we did not observe any
44 change in the assembly of respiratory complexes in mitochondria incubated with 300 nM or 600
45 nM NS3pro (Fig. 2G). Therefore, NS3pro seems to affect mitochondrial function via more specific
46 mechanisms rather than non-specific membrane disruption or by disassembling protein
47 complexes.
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 In the subsequent experiments on isolated mitochondria, we chose to explore the effects of 300
5 nM of NS3pro to avoid possible unspecific effects of its protease activity caused by high protein
6 loads.
7
8

9
10
11
12 *NS3pro inhibits pyruvate/malate and succinate utilization in different manners*
13

14
15
16 To address whether NS3pro targets the oxidation of specific substrates, we performed high-
17 resolution respirometry in mitochondria incubated with NS3pro in the presence of substrates
18 that feed the TCA cycle malate and pyruvate, or in the presence the complex II (CII) substrate
19 succinate together with the complex I (CI) inhibitor rotenone (Fig. 3A-C). Interestingly, NS3pro
20 seems to affect the utilization of these substrates in different manners. The RCR associated with
21 pyruvate/malate decreases by 40,6% in mitochondria incubated with NS3pro but not with
22 NS3proS135A, suggesting that NS3pro interferes with pyruvate/malate oxygen flux in a protease-
23 dependent manner (Fig. 3B). Notice that this protease-dependent effect of 300 nM NS3pro was
24 not evident in a multi-substrate protocol (Fig. 2B-E), probably due to the masking of protease-
25 independent effects on mitochondrial metabolism. Accordingly, both NS3pro and NS3proS135A
26 impact the succinate-dependent OCR, causing a 56,2% decrease in the RCR (Fig. 3C), indicating
27 that NS3pro interferes with succinate-induced oxygen consumption by a mechanism
28 independent of its protease activity.
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42

43 *NS3pro affects succinate-associated oxygen consumption by impairing cytochrome c function*
44

45
46
47 Next, we explored whether NS3pro interferes with ETS directly. Since respirometry assays
48 completely depend on the complex IV (CIV) activity, which is the oxygen-consuming complex, we
49 evaluated whether NS3pro directly interferes with CIV function by supplying TMPD and ascorbate
50 and measuring oxygen consumption. NS3pro incubation slightly affected CIV activity (average
51 decrease of 12,5% in OCR, $p=0.07$) (Fig. 4A). This effect on CIV may partially contribute but does
52 not explain the 56,2 % decrease in the RCR when succinate is the main substrate or the 40,6%
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 decrease in RCR when pyruvate/malate is supplied, suggesting that NS3pro does not act on CIV
5 directly.
6
7

8
9
10 To address whether NS3pro impairs the CII activity, we performed a biochemical assay to
11 measure directly CII activity in mitochondria incubated (or not) with NS3pro. In this assay, the
12 oxidation of the succinate (the electron donor) in presence of oxidized DCPIP (the electron
13 recipient) was traced by measuring the formation of reduced DCPIP spectrophotometrically.
14 With this approach, we observed that NS3pro not only did not impair CII activity, but slightly
15 stimulated it (increase of 13,4%, $p=0.0124$) (Fig. 4B), indicating that NS3pro does not impact the
16 activity of CII directly.
17
18
19
20
21
22
23

24
25 A possible effect of NS3pro on cytochrome c (which transports electrons from complex III to
26 complex IV) function can be easily tested by providing exogenous cytochrome c to mitochondria
27 previously incubated with NS3pro. If cytochrome c addition restores the OCR to the levels of
28 control, we can assume that it is the limiting element of the ETS in this context. In the presence
29 of pyruvate/malate, supplementation with cytochrome c did not restore the decrease in OCR
30 induced by NS3pro (Fig. 4C-D). However, when using succinate as the respiratory substrate,
31 cytochrome c addition completely restored the decrease in OCR caused by NS3pro (Fig. 4D-E).
32 Therefore, NS3pro seems to interfere with the electron transport through cytochrome c when
33 succinate, but not when pyruvate/malate, is the substrate. As aforementioned, the latter seems
34 to be caused by a degradation (via NS3 protease activity) of some component responsible for
35 pyruvate/malate metabolization since the catalytically inactive NS3proS135A does not impair
36 mitochondria respiration in the presence of these substrates (Fig. 3B). Conversely, the effect of
37 NS3pro on succinate-associated respiration occurs in a protease-independent manner (Fig. 3C).
38 Indeed, we did not see any sign of proteolysis of cytochrome c when incubated for one hour with
39 NS3pro (Fig. 4E).
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

55
56
57 Until this point, we have evaluated the effects of the NS3 protease domain on mitochondria
58 function. However, the protease domain alone has never been observed during a natural
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 infection. Thus, we evaluated the effect of the full-length recombinant NS3, containing both
5 protease and helicase domains (NS3prohel), in pyruvate/malate- and succinate-linked oxygen
6 consumption. Our results showed that NS3prohel did not significantly impair the OCR associated
7 with pyruvate/malate but decreased succinate-induced OCR in about 31%, similarly to the
8 proteolytically-inactive NS3proS135A (Fig. 4F). Therefore, the effects of NS3 on succinate-linked
9 respiration, which seem to be dependent on cytochrome c and occur in a protease-independent
10 manner, are more likely to be relevant physiologically.
11
12
13
14
15
16
17
18
19

20 *Full-length NS3 impairs succinate-induced oxygen consumption in mitochondria of permeabilized*
21 *cells*
22
23
24

25
26 In the results described so far, we showed that DENV NS3 potentially alters mitochondrial
27 metabolism. To confirm whether NS3 is capable of triggering the same effect within the cell, we
28 overexpressed the intact NS3 in HEK293T cells to evaluate its effects on mitochondrial
29 respiration. Unfortunately, the transfection efficiency was low, although we could see a time-
30 dependent cellular increase in NS3 expression by western blotting (Fig. 5A). Only about 20% of
31 the cells were positive for NS3 24h after transfection (Fig. 5B). The low NS3 expression in
32 transfected cells was not due to an increased cell death in NS3-expressing cells since we did not
33 observe differences in viability between the empty vector control cells transfected or NS3-
34 transfected cells (Fig. 5C). It is possible that cells possess innate immune mechanisms that block
35 NS3 expression or target NS3 to degradation and that, during a natural infection, these
36 mechanisms are at least partially counteracted by other viral proteins or are not effective in the
37 viral replication site.
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50

51 Although the efficiency of expression was low, we proceeded with high resolution respirometry
52 experiments in intact and in permeabilized cells transfected with NS3 or the empty vector
53 control. In this condition, we did not observe any change in mitochondrial respiration using intact
54 cells (Fig. 5D). Noteworthy, although the number of NS3-positive cells was limited, we observed
55 a slightly, but significant decrease (of 8% on average, $p=0.0365$) on succinate-induced, but not on
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 pyruvate/malate-induced respiration, in mitochondria of NS3-expressing permeabilized cells (Fig.
5 5E). These data indicate that the expression of DENV NS3 alone is able to at least partially
6 recapitulate the effects of recombinant NS3pro and NS3prohel in isolated liver mitochondria.
7
8
9

10 11 12 13 14 **Discussion**

15
16
17
18 Dengue virus infection is known to elicit a variety of metabolic alterations in the host cells,
19 including changes in the preference for oxidizing energetic substrates in mitochondria (4,6). The
20 data presented here suggest that DENV NS3 may be one of the molecular players that mediate
21 the metabolic alterations in DENV-infected cells by directly interfering with the mitochondrial
22 ETS capacity in a substrate-specific manner. NS3 remarkably impaired the succinate-linked
23 mitochondrial respiration in a protease-independent manner, while pyruvate/malate-induced
24 oxygen consumption is not only less affected but also dependent on NS3 protease activity. More
25 intriguingly, we found that NS3 suppresses succinate-induced, but not pyruvate/malate-induced,
26 oxygen flux by interfering with cytochrome c function, suggesting that the viral protein targets
27 specific cytochrome c pools in mitochondria.
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37

38
39 NS3 protease activity is only fully active when interacting with NS2B (8,17). Importantly, NS2B
40 was not found among the six DENV proteins (NS3, NS1, NS2A, NS4A, NS5, and E) we identified in
41 the mitochondrial fraction of infected cells, suggesting that, when localized in this organelle, NS3
42 performs other functions than those requiring its proteolytic activity. Thus, in the context of
43 infection, the NS3 effect on succinate-linked mitochondrial respiration is likely more relevant
44 than that caused by pyruvate/malate-induced oxygen consumption.
45
46
47
48
49
50
51

52
53 NS2B is an integral ER membrane protein shown to be essential for recruiting Zika virus (also a
54 flavivirus) NS3 to the viral replication complex (18). Although most DENV NS3 also associates with
55 the ER during infection (19), it possesses a mitochondrial import signal, allowing it to be imported
56 into the mitochondrial matrix (14). In agreement, NS3 was found to be enriched in the
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 mitochondria fraction of infected cells (20,21). These studies support that, besides its role during
5 viral replication, NS3 of flaviviruses are also addressed to mitochondria, where they would play
6 other functions. Our findings are the first to demonstrate that NS3 modulates mitochondrial
7 metabolism directly, interfering with components of the ETS.
8
9

10
11
12
13
14 We showed that NS3 impairs succinate-driven mitochondria respiration in a cytochrome c-
15 dependent manner. At first glance, this finding would suggest that NS3 induces cytochrome c
16 release from mitochondria by altering the permeabilization of the mitochondrial outer
17 membrane. This mechanism has been described for other viruses that induce apoptosis in
18 infected cells (22). For instance, hepatitis C virus NS3/NS4A proteins cause the translocation of
19 the pro-apoptotic protein BAX to mitochondria, leading to mitochondrial outer membrane
20 permeabilization and the release of cytochrome c, ultimately inducing apoptosis (23-25).
21 Nonetheless, our data do not support mitochondrial outer membrane permeabilization by DENV
22 NS3 since a) the mitochondrial membrane potential, typically lost during apoptosis, is preserved
23 in NS3pro-incubated mitochondria, b) pyruvate- and malate-linked oxygen flux is not disrupted
24 in mitochondria incubated with NS3prohel (suggesting that mitochondria stay functional while
25 succinate-induced respiration is specifically impaired), and c) NS3 transfection does not affect
26 cell viability. Thus, it is unlikely that NS3 induces a massive release of cytochrome c from
27 mitochondria. Instead, it is better conceivable that NS3 binds to cytochrome c, thus impairing the
28 electron transport. NS3 may also prevent cytochrome c association with respiratory complexes
29 (CIII or CIV). If NS3 binds to cytochrome c, this event may also represent a virus-induced anti-
30 apoptotic mechanism. We aim to pursue these possibilities in future studies.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

49 A question that remains enigmatic is why NS3 specifically affects the cytochrome c pool that
50 transports electrons from succinate. There are possible explanations for that, such as a) the
51 existence of distinct cytochrome c pools in mitochondria that associates independently to
52 different respiratory complexes, b) NS3 may interfere with regulatory factors that facilitate
53 electron transport through CIII-CIV pools that preferentially receive electrons from CII, rather
54 than interfering with cytochrome c directly, and c) the existence of different mitochondria
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 subpopulations within the liver that are more enriched in CII and more prone to the NS3 actions.
5
6 Current structural and functional information about mitochondrial ETS supports the two first
7
8 possibilities. Differently from what has been believed some decades ago, now it is known that
9
10 the respiratory complexes are constantly assembling and disassembling in dynamic
11
12 supramolecular structures of defined stoichiometry, the respiratory supercomplexes (SC) (26).
13
14 Possible supramolecular assemblies include the N-respirasome (SC I+III₂+IV₁₋₂), Q-respirasome
15
16 (SC III₂ + IV and SC III₂ + IV₂), CIII₂, CIV₂, and many others (26). In 2013, Lapuente-Brun *et al.*
17
18 demonstrated that the association of respiratory SC define specific pools of ubiquinone and
19
20 cytochrome c linked to different CIV populations, those receiving electron exclusively from NADH
21
22 (CI-containing SC), other receiving electrons from FAD-dependent enzymes, and another
23
24 receiving electrons from both NADH and FAD. These different CIV populations allow
25
26 mitochondria to oxidize multiple substrates simultaneously, minimizing competitive inhibition
27
28 between pyruvate and succinate utilization (27). They have also demonstrated that modulating
29
30 SC assembly is a mechanism through which cells adapt to oxidize different substrates according
31
32 to the metabolic state (27). Thus, it is possible that NS3 only interferes with CIV-linked
33
34 cytochrome c pools that receive electrons from FAD-dependent enzymes (such as succinate
35
36 dehydrogenase), where it is presumably more accessible to NS3. At the same time, those
37
38 participating in CI-containing SC would be less exposed and/or less vulnerable to the NS3 actions,
39
40 maybe by hysteric hindrance. Alternatively, NS3 could alter SC formation by modulating
41
42 supercomplex assembly factors. Whatever the mechanism is, by targeting succinate-linked
43
44 respiration specifically, DENV NS3 may be altering the source of carbons for oxidative metabolism
45
46 in the infected cells.
47
48

49 Other DENV proteins were shown to localize in mitochondria. One example is the NS4B protein,
50
51 which inhibits the activation of the mitochondrial fission factor DRP1, inducing mitochondrial
52
53 elongation and, thus, favoring the oxidative metabolism in infected cells (20,21). Our data
54
55 suggest that NS3 may also contribute to metabolic reprogramming during DENV infection. The
56
57 overall outcomes of the infection on cellular metabolism may mask the actions of each viral
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 protein individually. However, it is crucial to discriminate each protein's effects separately to
5
6 uncover new functions and potential targets for therapeutic interventions.
7
8
9

10 11 12 **Experimental procedures**

13 14 15 *Proteomics screening*

16
17 Huh7 cells were plated in 150cm² bottles (2x10⁷ cells), infected with DENV serotype 2 (strain
18 16681) using a multiplicity of infection (MOI) of 1 or subjected to simulated infection (mock).
19
20 After 24h infection, the cells were collected and lysed with a Potter-Elvehjem type homogenizer
21 (Sigma- Aldrich, Missouri, USA). The cell lysate was centrifuged at 700 g, for 10 min, at 4°C, to
22 remove cell debris. The supernatant was collected and subsequently centrifuged at 15000g, for
23 10 min, at 4°C, to precipitate the enriched mitochondria fraction. For the isolation of
24 mitochondria, we standardized a method using sucrose gradient based on a well-established
25 protocol (28). Briefly, we reduced the rotation speed, and compensated for this change with an
26 increase in the centrifugation time. The enriched fraction of mitochondria was deposited on a
27 discontinuous sucrose gradient of 1.7 M under 1.0 M and centrifuged at 17,000 g, for 80 min, at
28 4°C.
29

30
31 The dry samples were incubated for 12h, at 37°C, under agitation (200 rpm), in a solution
32 containing 0.2% of RapiGest™ (Waters, Massachusetts, USA), and submitted to sonication in bath
33 for 30 min, followed by centrifugation (12,000 rpm, for 1 min, at room temperature). After these
34 steps, each sample was filtered and desalted using Centriprep® of 3 kDa (Merck Millipore,
35 Massachusetts, USA). The samples were washed 3 times with 500 µl of NH₄HCO₃, and the
36 retained volume was dry using a Speed-Vac system. Each sample was resuspended in a solution
37 containing 0.2% of RapiGest™, followed by digestion steps according to the manufacturer's
38 instructions. The tryptic peptides, in triplicate, were loaded on a Waters nanoAcquity system
39 (Waters). In total, 9µl of the samples were injected (3µl each time) and desalted online, using a
40 Waters Symmetry C18 180 µm X 20 mm 5 µm trap column. By using an HSS T3 130 C18 150 µm
41 X 75 mm, 1.7 µm column (Waters), a liquid chromatography step was performed using a 0.5
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5 $\mu\text{l}/\text{min}$ mobile phase flow with a linear gradient from 3–40% of acetonitrile containing 0.1%
6 formic acid across a 210 min running time. Electrospray tandem mass spectra were recorded
7 using a Waters SynaptTM G1 HD/MS High-Definition Mass Spectrometer (Waters, Manchester,
8 UK) interfaced with the nanoAcquity system capillary chromatography. The parameters used
9 during the experiments were: 3000 V for ESI voltage, source temperature of 80 °C, and cone
10 voltage of 35 V. MassLynx data system (Version 4.1, Waters) was used for data acquisition and
11 instrument control and performed by scanning from a mass-to-charge ratio (m/z) of 50–2000,
12 using a scan time of 1.0 s. MSE acquisition (Waters, Milford, MA) was performed with collision
13 energy alternating between 6 V in low energy and ramped from 12–40 V in high energy, using
14 argon as the collision gas at a pressure of 1 bar. All data were processed using the Progenesis QI
15 for proteomics version 2.0 software platform (Nonlinear Dynamics, Waters, Manchester, UK).
16 The exact masses were determined using the Q-ToF's LockSprayTM of GFP reference ion 785.8426
17 m/z . Raw data were searched in Progenesis against Databank_Human_DENV-strain_fasta (strain
18 16681) Uniprot non-reviewed protein Database (downloaded in 2019, 40734 sequences),
19 including reversed sequences, human keratin proteins and *Sus scrofa* Trypsin as possible
20 contaminants. Cysteine carbamidomethylation was set as fixed modification, oxidation of
21 methionine was set as variable modification, and peptide and fragment tolerance were set as 10
22 ppm and 20 ppm, respectively, with the following ions requirements: two fragments peptide, five
23 fragments protein, and one peptide. The false discovery rate was set to less than 1%, and the
24 quantified proteins, with a p-value lower than 0.05 for ANOVA, were considered a reliable
25 identification for relative normalized abundance analysis.
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46

47 *NS3 expression and purification*

48 *Escherichia coli* BL21 (DE3) were transformed with pET32a(+)_NS3pro (Biomatik, Ontario,
49 Canada) containing residues 1 to 180 corresponding for the NS3 protease domain; or
50 pET32a(+)_NS3proS135A, with the serine 135 of the catalytic triad replaced by an alanine, which
51 makes the protease inactive; or pET32a(+)_NS3prohel containing residues 1 to 618
52 corresponding to full length NS3. Bacteria were grown in M9 minimal medium containing 100
53 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of ampicillin. Protein expression was induced with 0.6 mM IPTG when the optical density
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 reached 0.6-0.7 at 600 nm. After 18h of induction at 18°C, cells were pelleted and resuspended
5 in buffer A (50 mM Tris-HCl [pH 8], 500 mM NaCl, 20 mM imidazole, 10% glycerol) and lysed by
6 sonication. The lysate was centrifuged at 12,000 g, for 60 min, at 4°C. The supernatant containing
7 the expressed proteins was collected, filtered using a 0.22 µm filter, applied to HisTrap FF column
8 (GE Healthcare Life Sciences, New Jersey, USA) and purified by immobilized metal affinity
9 chromatography (IMAC) using the buffer A for equilibration and buffer B (50 mM Tris-HCl [pH 8],
10 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10% glycerol) for elution. Proteins were eluted with a 20-500
11 mM linear imidazole gradient. For NS3prohel purification, an additional gel filtration step was
12 performed using a Sephacryl S-100 column (Cytiva, Massachusetts, USA). The eluates containing
13 the recombinants proteins were placed in Amicon Ultra-4 3K centrifugal filter device (Merck
14 Millipore), dialyzed with buffer C (Tris 50 mM [pH 8], NaCl 150 mM, glycerol 5%), and later with
15 buffer D (Tris 50 mM [pH 8], 5% glycerol, 5% ethylene glycol). The samples were then stored at -
16 80°C and their purity confirmed by 15% SDS-PAGE (Fig S1, Supporting information).
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

30 31 *Mitochondria isolation*

32 Male C57BL/6 mice aged 12-20 weeks were euthanized by cervical dislocation and the liver was
33 quickly collected to perform mitochondria isolation. The experiments were approved by the
34 Committee on Ethics in Animal Use (CEUA) in Scientific Experimentation of the Health Sciences
35 Center of the Federal University of Rio de Janeiro (protocol No. 046/22). Mitochondria isolation
36 was performed using a method previously described (29), with some adaptations. Briefly,
37 isolation was performed in isolation buffer (0.1 M Tris/MOPs [pH7.4], 0.1 M EGTA/Tris [pH7.4], 1
38 M sucrose) using Potter-Elvehjem homogenizer (Sigma-Aldrich) on ice. The liver homogenate was
39 centrifuged at 700 g, 4°C, 10 min, the supernatant was collected and centrifuged at 7000 g, 4°C,
40 10 min, forming a mitochondria pellet. The pellet was washed in ice-cold isolation buffer and
41 centrifuged at 8500 g, 4°C, 10 min. The isolated mitochondria were then kept on ice until use and
42 the protein concentration of the samples was evaluated by Bradford.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 *High resolution respirometry*

1
2
3
4 Mitochondrial oxygen consumption (OCR) rates were assessed by high-resolution respirometry
5 using the Oxygraph-2k system (Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria) and DatLab 7.4.0.4
6 software (Oroboros Instruments). All experiments were conducted at 37°C, at 750 rpm agitation
7 rate and 2 mL final volume per chamber. In the experiments with isolated mitochondria, 300 µg
8 of mitochondria were incubated with NS3pro, NS3proS135A, NS3prohel or, as a control, with
9 buffer in which the recombinant proteins were diluted (50 mM Tris [pH 8], 5% glycerol and 5%
10 ethylene glycol), in MIR05, supplemented with 2 mM ATP and 10 mM succinate, for 1 h, on ice.
11 The respirometries were performed with 50 µg of sample per chamber. Different substrates and
12 inhibitors (Sigma-Aldrich) were added in the concentrations and orders described below. For
13 concentration curve assays: 5 mM malate, 10 mM pyruvate, 10 mM succinate, 2.5 mM ADP, 1
14 µM cytochrome C, 0.25 µM rotenone, and 0.5 mM antimycin. For complexes I+II+IV assays: 5 mM
15 malate, 10 mM pyruvate, 2.5 mM ADP, 1 µM cytochrome C and 0.25 µM rotenone. For complexes
16 II+III+IV assays: 5 mM malate, 0.25 µM rotenone, 10 mM succinate, 2.5 mM ADP, 1 µM
17 cytochrome C and 25 mM malonate. For complex IV: 1 mM ascorbate, 1 mM TMPD, 1 µM
18 cytochrome C and 1.5 mM KCN. In HEK293T transfected cells experiments, 24h pos transfection
19 2×10^6 cells were suspended in MIR05 medium, added to each chamber and permeabilized with
20 digitonin at a final concentration of 10 µg/mL. Oxygen consumption was evaluated in the
21 presence of the following substrates and inhibitors: 5 mM malate, 10 mM pyruvate, 2.5 mM ADP,
22 0.25 µM rotenone, 10 mM succinate and 25 mM malonate. In assays with intact HEK293T
23 transfected cells, 24h pos transfection 2×10^6 cells were suspended in DMEM (Gibco) and placed
24 in the chambers. Then, oxygen consumption was evaluated with the addition of 0.25 nM
25 oligomycin, followed by titration of FCCP 0.05 to 0.9 µM, 0.25 µM rotenone and 0.5 mM
26 antimycin.

50 *Blue native PAGE*

51 Mitochondria samples (300 µg of protein) were diluted in a final volume of 100 µL in phosphate
52 buffered saline, PBS, containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) and lysed with n-
53 dodecyl β-D-maltoside, DDM (Sigma-Aldrich), in a final concentration of 1%, for 15 min, on ice.
54 Then, were centrifuged at 2000 g, 4°C, for 20 min. Supernatant was collected and 10 µL of sample
55
56
57
58
59
60

1
2
3
4 buffer (2 M aminocaproic acid, 500 mM Bis-Tris, 100 mM EDTA, 2% comassie G-250, pH 7) was
5 added. 5 μ L of sample was loaded in NativePAGE 4-16% Bis-Tris gels (Invitrogen, Massachusetts,
6 USA) and electrophoresis was performed with anode buffer (Bis-Tris 50 mM, pH 7) and blue
7 cathode buffer (15 mM Bis-Tris, 50 mM tricine, 0.02% comassie G-250, pH 7) at 6A constant
8 amperage on ice. After two-thirds of the run, the blue cathode buffer was replaced with cathode
9 buffer without G-250 comassie until electrophoresis end.
10
11
12
13
14
15
16
17

18 *Mitochondrial membrane potential*

19 The mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi$) was analyzed using safranin O (Sigma-Aldrich), a
20 lipophilic cationic dye that self-quenches its fluorescence through its potential-dependent
21 distribution between the external environment and the intramitochondrial compartment. The
22 assay was carried out in a Varian Cary Eclipse fluorometer (Agilent, California, USA), with an
23 excitation wavelength of 495 nm, an emission wavelength of 587 nm and high-speed stirring at
24 37°C. The cuvettes were prepared with 1 mL of MIR05, 50 μ g/mL of isolated liver mitochondria
25 incubated or not with NS3pro and 0.5 μ M safranin O. The assay started with the addition of 5
26 mM malate, 10 mM pyruvate and 10 mM succinate, followed by the addition of 200 μ M ADP, 0.1
27 μ g /mL oligomycin and 0.05 μ M FCCP. The calculation of the membrane potential is carried out
28 by subtracting the value of the maximum membrane potential induced by the addition of
29 oligomycin (hyperpolarization) from the minimum value induced by the depolarization with
30 FCCP.
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44

45 *Succinate dehydrogenase (SDH) activity*

46 The activity of the SDH enzyme was performed with extracts of mitochondria isolated from the
47 liver of mice incubated or not with NS3pro using an adapted procedure previously described (30).
48 Briefly, SDH activity was determined using 2,6-dichlorophenolindophenol, DCPIP (Sigma-Aldrich),
49 an artificial electron acceptor. The assay was conducted in 96-well plates using the SpectraMax
50 M5 (Molecular Devices, California, USA). Approximately 20 μ g of isolated mitochondria were
51 added to the wells and the reaction was started by adding 200 μ l of reaction buffer (20 mM
52 phosphate buffer [pH 7], 0.1% Triton X-100, 4 mM sodium azide, 5 mM succinate, 300 mM
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4 DCPIP). The plate was shaken for 10 s, the DCPIP reduction was monitored for 3 min at 600 nm,
5
6 35°C. The activity calculation was performed using the reduced DCPIP absorption coefficient
7
8 (21.0 mM⁻¹.cm⁻¹) and normalized by the protein concentration of each sample.
9

10 11 12 *Transfection*

13
14 HEK293T cells were cultured in DMEM (Gibco, Massachusetts, USA) supplemented with 10% fetal
15
16 bovine serum, FBS (Gibco), penicillin 100 U/mL, streptomycin 100 µg/mL, HEPES 2 g/L and
17
18 NaHCO₃ 2.2 g/L, in a humid CO₂ incubation chamber, at 37°C. The cells were transfected with
19
20 pcDNA3.1_NS3 (Biomatik, Ontario, Canada) coding the residues 1 to 618 of NS3 and PEI MAX 40K
21
22 (Polysciences, Warrington, USA) in a 3:1 ratio of PEI to DNA. As a control, we used the empty
23
24 vector pcDNA3.1_∅. PEI:DNA complexes were prepared in Opti-MEM (Gibco) with 0.5 µg of
25
26 plasmid DNA per cm² of culture surface area, incubated for 20 min at room temperature, and
27
28 added to the cell culture. After 12h, the culture medium was replaced by fresh medium.
29

30 31 32 *Western blotting*

33
34 HEK293T cells after different times of transfection with pcDNA3.1_NS3 were lysed with lysis
35
36 buffer A (20 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 10% glycerol and 1% Triton
37
38 X-100) containing protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich). Proteins present in the cell extract
39
40 were resolved by 15% SDS-PAGE and transferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad,
41
42 California, USA). The membrane was blocked for 1 h by incubation in TBS-T with 5% skim milk.
43
44 Next, probe with anti-NS3 antibody (GeneTex, California, USA) at 1:4000 dilution for 1 h and anti-
45
46 rabbit antibody IRDye®800CW (LI-COR Biosciences, Nebraska, USA) at 1:25000 dilution for 1h.
47
48 After incubation with each of the mentioned antibodies, the membrane was washed three times
49
50 with TBS-T for 10 min. For loading control, the membrane was incubated with anti-GAPDH
51
52 antibody (Merck Millipore) at 1:10000 dilution for 1h and anti-mouse antibody IRDye®800CW (LI-
53
54 COR Biosciences) at 1:15000 dilution for 1h. The membrane was washed after the incubations as
55
56 described above and developed on Licor Odyssey Scanner (LI-COR Biosciences). The intensity of
57
58 the bands was quantified using the ImageJ/Fiji program (Rasband, 1997-2018) and normalized by
59
60 the intensity of the GAPDH bands.
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Immunofluorescence

HEK293T cells were grown in 6-well coverslip plates (1×10^6 cells per well) and transfected. After different transfection times, the cover slips were removed from the plates and fixed with a 4% formaldehyde solution in PBS for 15 min, permeabilized with 0.1% Triton X-100 for 7 min and incubated with blocking solution (PBS with 1% BSA) for 1h. After blocking, the cells were incubated with anti-NS3 antibody (GeneTex) at 1:1000 dilution and goat anti-rabbit-Alexa Fluor 488 antibody (Life Technologies, California, USA) at 1:800 dilution. Both antibodies were diluted in blocking buffer and incubated for 1h. After the incubations, three washes with PBS were performed. Cells were stained with DAPI (Invitrogen) for 10 min. Then analyzed by fluorescence optical microscopy using the Olympus IX81 microscope and the CellSens Standard program (Olympus, Tokyo, Japan).

Cell viability by MTT reduction

HEK293T cells were seeded in 24-well plates (7×10^4 cells per well), transfected with pcDNA3.1_NS3 or pcDNA3.1_∅ and after different transfection times incubated with a 3-(4,5-dimethyl-2-bromide solution) thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium (MTT) 0.5 mg/mL (USB, Ohio, USA) in DMEM (Gibco). The test is based on the fact that MTT is reduced in viable cells, forming crystals of formazan, whose solubilization allows analysis by spectrophotometry. After 2h of incubation, the MTT solution was discarded, and the formazan crystals were solubilized in 200 μ L of DMSO. The absorbance of the samples was analyzed at 570 nm in the SpectraMax M5 reader (Molecular Devices).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, California, USA) and data expressed as mean \pm standard error of mean. Differences between means were compared using One-way ANOVA with Sidak's post hoc test or Student's t-test. Results with $p < 0.05$ were considered statistically significant.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Data availability

All data are contained within the manuscript.

Supporting information

This article contains supporting information.

Author contributions

B. G. S., J. D. Z. and A. T. P. conceptualization; B. G. S. and M. B. C. formal analysis; A. T. P. funding acquisition; B. G. S., L. O. F. -S., M. B. C., G. N. S. and C. F. C. investigation; B. G. S., M. B. C., C. F. C., T. C. N. -M., N. C. M. -A. and J. D. Z. methodology; A. A. G., R. B. Z. and A. T. P. resources; J. D. Z. and A. T. P. supervision; B. G. S. and T. C. N. -M. visualization; B. G. S., J. D. Z. and A. T. P. writing – original draft; B. G. S., M. B. C., T. C. N. -M., N. C. M. -A., A. A. G., J. D. Z. and A. T. P. writing – review & editing.

Funding and additional information

This study was financed by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), grant numbers E-26/201.173/2021 and E-26/201.316/2016; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 312650/2021-3; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), finance code 001.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure legends

Fig 1. Proteomics screening of isolated mitochondria from DENV-infected Huh7 cells. (A) Pie chart showing the percentage of DENV peptides identified by mass spectrometry. (B) NS3 sequence with the identified peptides highlighted in dark grey corresponds to a coverage of 46.60% of the protein (288 out of 618 aa). Uniprot informations: Entry: P29990; Entry name: POLG_DEN26; Protein name: Genome polyprotein; Organism: Dengue virus type 2 (strain Thailand/16681/1984) (DENV-2); Length: 3391 aa. (C) Pie charts with the percentage of down-regulated proteins (at least two-fold relative to mock) categorized by function (using UniProt database) in the mitochondria of DENV-infected cells.

Fig 2. DENV NS3pro impairs mitochondrial respiration. (A) Scheme of the DENV polyprotein highlighting the NS3 peptide and the constructs used in this study. The recombinant NS3pro construct comprises residues 1-180 (green) of DENV NS3 protein and has a hexa-histidine tag (His-tag) (light purple) and a TEV cleavage sequence (dark purple). The ribbon representation of NS3 protein with the helicase (blue) and protease (green) domains, highlighting the catalytic triad composed of histidine at position 51 (orange), aspartate at position 75 (orange), and serine at position 135 (red), was generated with PyMOL using PDB ID: 2VBC. NS3proS135A (green checkered) is catalytically inactive due to a substitution of serine 135 for an alanine. (B) Representative high-resolution respirometry multi-substrate experiment with isolated mitochondria previously incubated or not with the indicated concentrations of NS3pro. (C) Oxygen consumption rate (OCR) coupled to ATP synthesis. (D) Proton leak respiration. (E) Respiratory control ratio (RCR). (F) Membrane potential of isolated mitochondria incubated or not with 300nM and 600nM NS3pro. (G) Blue-Native PAGE of isolated mitochondria protein extracts incubated or not with 300nM and 600nM NS3pro. The estimated positions of the complexes are indicated. All data were expressed as mean \pm standard deviation. *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Fig.3 NS3pro affects malate/pyruvate and succinate oxidation by different mechanisms. (A)

Illustrative scheme of the electron transport system (ETS) with substrates and inhibitors used in the high-resolution respirometry experiments of this study. Electrons (e-) were represented in orange, and ubiquinone (Q) in dark grey. Flat-tipped arrows in dark red indicate inhibition. The structure of the respiratory complexes was generated with PyMOL using PDB IDs: 3M9S, 3AEF, 1NTM, 3ZCF, 2Y69, and 5ARE. (B) RCR of isolated mitochondria incubated or not with NS3pro or NS3proS135A using malate/pyruvate as substrates (C) RCR using succinate as substrate. Data were expressed as mean \pm standard deviation. **, $p < 0.005$; ****, $p < 0.0001$.

Fig. 4 NS3pro impairs a specific cytochrome c pool when succinate is used as substrate. (A)

Complex IV-associated oxygen consumption rates using TMPD/ascorbate as electron donor. (B) Succinate dehydrogenase activity in protein extracts of isolated mitochondria incubated or not with NS3pro. Data expressed as mean \pm standard deviation. *, $p = 0.0124$. (C) Representative high-resolution respirometry experiments using the indicated substrates. Notice the differential response to cytochrome c when malate/pyruvate or succinate are used as substrates. (D) Changes in oxygen consumption rates with different substrates in the presence or absence of cytochrome c. Data were expressed relative to non-treated control in presence of cytochrome c. *, $p < 0.05$; ** $p < 0.009$. (E) SDS-PAGE of recombinant cytochrome c previously incubated with 300 nM NS3pro (1:1 molar ratio) for 30 min at 37°C or 1 h on ice, as indicated. (F) Changes in RCR of isolated mitochondria incubated or not with full-length NS3 (NS3prohel) using malate/pyruvate or succinate as substrates. Data were expressed relative to non-treated control. ***, $p = 0.0006$. Data represented as mean \pm standard deviation.

Fig. 5 Succinate oxidation, but not malate/pyruvate, is also impaired in HEK293T cells

expressing the full-length NS3. (A) Western blotting and the densitometric quantification of the bands from independent experiments (below) in HEK293T total protein extracts transfected with pcDNA3.1_NS3 collected 12h, 18h, and 24h post-transfection. The NS3 protein has 70 kDa and is seen in green. The 37 kDa GAPDH protein, shown in red staining, was used as the loading control. MW: Molecular weight standard. *, $p = 0.0171$ (comparison between 12 and 24h). (B)

1
2
3
4 Immunofluorescence microscopy in NS3-transfected HEK293T cells using an anti-NS3 antibody
5 (green) and nucleus-staining probe DAPI (blue). Magnification of 20×. The scale bar corresponds
6 to 50 μm. CTL: transfection control (empty vector). The graph (upper right) shows the percentage
7 of cells with positive staining for NS3 at different times post-transfection. *, p=0.0209
8 (comparison between 18 and 24 hours). (C) Cell viability relative to the transfection control
9 (empty vector), analyzed by MTT reduction assay. (D) Oxygen consumption rates of intact cell
10 suspensions in DMEM medium. (E) Coupled respiration of digitonin-permeabilized cells (in MIR05
11 respiration medium) using the indicated substrates. The control (blue) represents HEK293T cells
12 transfected with the empty vector, and NS3-transfected is in orange. *, p=0.0365. All data were
13 expressed as mean ± standard deviation.
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27

28 References

- 29 1. Zhang, J., Lan, Y., Li, M. Y., Lamers, M. M., Fusade-Boyer, M., Klemm, E., Thiele, C., Ashour, J., and
30 Sanyal, S. (2018) Flaviviruses Exploit the Lipid Droplet Protein AUP1 to Trigger Lipophagy and Drive
31 Virus Production. *Cell host & microbe* **23**, 819-831 e815
- 32 2. Jordan, T. X., and Randall, G. (2017) Dengue Virus Activates the AMP Kinase-mTOR Axis To
33 Stimulate a Proviral Lipophagy. *J Virol* **91**
- 34 3. Heaton, N. S., and Randall, G. (2010) Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism.
35 *Cell Host Microbe* **8**, 422-432
- 36 4. Fernandes-Siqueira, L. O., Zeidler, J. D., Sousa, B. G., Ferreira, T., and Da Poian, A. T. (2018)
37 Anaplerotic Role of Glucose in the Oxidation of Endogenous Fatty Acids during Dengue Virus
38 Infection. *mSphere* **3**
- 39 5. Khanam, A., Gutierrez-Barbosa, H., Lyke, K. E., and Chua, J. V. (2022) Immune-Mediated
40 Pathogenesis in Dengue Virus Infection. *Viruses* **14**
- 41 6. Zeidler, J. D., Fernandes-Siqueira, L. O., Barbosa, G. M., and Da Poian, A. T. (2017) Non-Canonical
42 Roles of Dengue Virus Non-Structural Proteins. *Viruses* **9**
- 43 7. Li, H., Clum, S., You, S., Ebner, K. E., and Padmanabhan, R. (1999) The serine protease and RNA-
44 stimulated nucleoside triphosphatase and RNA helicase functional domains of dengue virus type
45 2 NS3 converge within a region of 20 amino acids. *J Virol* **73**, 3108-3116
- 46 8. Falgout, B., Pethel, M., Zhang, Y. M., and Lai, C. J. (1991) Both nonstructural proteins NS2B and
47 NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *Journal of*
48 *virology* **65**, 2467-2475
- 49 9. Bartelma, G., and Padmanabhan, R. (2002) Expression, purification, and characterization of the
50 RNA 5'-triphosphatase activity of dengue virus type 2 nonstructural protein 3. *Virology* **299**, 122-
51 132
- 52 10. Benarroch, D., Selisko, B., Locatelli, G. A., Maga, G., Romette, J. L., and Canard, B. (2004) The RNA
53 helicase, nucleotide 5'-triphosphatase, and RNA 5'-triphosphatase activities of Dengue virus
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- protein NS3 are Mg²⁺-dependent and require a functional Walker B motif in the helicase catalytic core. *Virology* **328**, 208-218
11. Tang, W. C., Lin, R. J., Liao, C. L., and Lin, Y. L. (2014) Rab18 facilitates dengue virus infection by targeting fatty acid synthase to sites of viral replication. *J Virol* **88**, 6793-6804
 12. Heaton, N. S., Perera, R., Berger, K. L., Khadka, S., Lacount, D. J., Kuhn, R. J., and Randall, G. (2010) Dengue virus nonstructural protein 3 redistributes fatty acid synthase to sites of viral replication and increases cellular fatty acid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 17345-17350
 13. Samrat, S. K., Xu, J., Li, Z., Zhou, J., and Li, H. (2022) Antiviral Agents against Flavivirus Protease: Prospect and Future Direction. *Pathogens* **11**
 14. Gandikota, C., Mohammed, F., Gandhi, L., Maisnam, D., Mattam, U., Rathore, D., Chatterjee, A., Mallick, K., Billoria, A., Prasad, V. S. V., Sepuri, N. B. V., and Venkataramana, M. (2020) Mitochondrial Import of Dengue Virus NS3 Protease and Cleavage of GrpEL1, a Cochaperone of Mitochondrial Hsp70. *J Virol* **94**
 15. El-Bacha, T., Midlej, V., Pereira da Silva, A. P., Silva da Costa, L., Benchimol, M., Galina, A., and Da Poian, A. T. (2007) Mitochondrial and bioenergetic dysfunction in human hepatic cells infected with dengue 2 virus. *Biochim Biophys Acta* **1772**, 1158-1166
 16. Chance, B., and Williams, G. R. (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization. *J Biol Chem* **217**, 383-393
 17. Yusof, R., Clum, S., Wetzel, M., Murthy, H. M., and Padmanabhan, R. (2000) Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *J Biol Chem* **275**, 9963-9969
 18. Xing, H., Xu, S., Jia, F., Yang, Y., Xu, C., Qin, C., and Shi, L. (2020) Zika NS2B is a crucial factor recruiting NS3 to the ER and activating its protease activity. *Virus Res* **275**, 197793
 19. Reid, D. W., Campos, R. K., Child, J. R., Zheng, T., Chan, K. W. K., Bradrick, S. S., Vasudevan, S. G., Garcia-Blanco, M. A., and Nicchitta, C. V. (2018) Dengue Virus Selectively Annexes Endoplasmic Reticulum-Associated Translation Machinery as a Strategy for Co-opting Host Cell Protein Synthesis. *J Virol* **92**
 20. Barbier, V., Lang, D., Valois, S., Rothman, A. L., and Medin, C. L. (2017) Dengue virus induces mitochondrial elongation through impairment of Drp1-triggered mitochondrial fission. *Virology* **500**, 149-160
 21. Chatel-Chaix, L., Cortese, M., Romero-Brey, I., Bender, S., Neufeldt, C. J., Fischl, W., Scaturro, P., Schieber, N., Schwab, Y., Fischer, B., Ruggieri, A., and Bartenschlager, R. (2016) Dengue Virus Perturbs Mitochondrial Morphodynamics to Dampen Innate Immune Responses. *Cell Host Microbe* **20**, 342-356
 22. Galluzzi, L., Brenner, C., Morselli, E., Touat, Z., and Kroemer, G. (2008) Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* **4**, e1000018
 23. Deng, L., Adachi, T., Kitayama, K., Bungyoku, Y., Kitazawa, S., Ishido, S., Shoji, I., and Hotta, H. (2008) Hepatitis C virus infection induces apoptosis through a Bax-triggered, mitochondrion-mediated, caspase 3-dependent pathway. *J Virol* **82**, 10375-10385
 24. Javed, F., and Manzoor, S. (2018) HCV non-structural NS4A protein of genotype 3a induces mitochondria mediated death by activating Bax and the caspase cascade. *Microb Pathog* **124**, 346-355
 25. Nomura-Takigawa, Y., Nagano-Fujii, M., Deng, L., Kitazawa, S., Ishido, S., Sada, K., and Hotta, H. (2006) Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. *J Gen Virol* **87**, 1935-1945
 26. Cogliati, S., Cabrera-Alarcon, J. L., and Enriquez, J. A. (2021) Regulation and functional role of the electron transport chain supercomplexes. *Biochem Soc Trans* **49**, 2655-2668

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

27. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P. M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M. A., Navas, P., Cruz, R., Carracedo, A., Lopez-Otin, C., Perez-Martos, A., Fernandez-Silva, P., Fernandez-Vizarra, E., and Enriquez, J. A. (2013) Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* **340**, 1567-1570
28. Bozidis, P., Williamson, C. D., and Colberg-Poley, A. M. (2007) Isolation of endoplasmic reticulum, mitochondria, and mitochondria-associated membrane fractions from transfected cells and from human cytomegalovirus-infected primary fibroblasts. *Current protocols in cell biology* **Chapter 3**, Unit 3 27
29. Frezza, C., Cipolat, S., and Scorrano, L. (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2**, 287-295
30. Simonin, V., and Galina, A. (2013) Nitric oxide inhibits succinate dehydrogenase-driven oxygen consumption in potato tuber mitochondria in an oxygen tension-independent manner. *Biochem J* **449**, 263-273

Figure 1

[Click here to access/download;Main Figure \(High Resolution\);Fig. 1.tif](#)

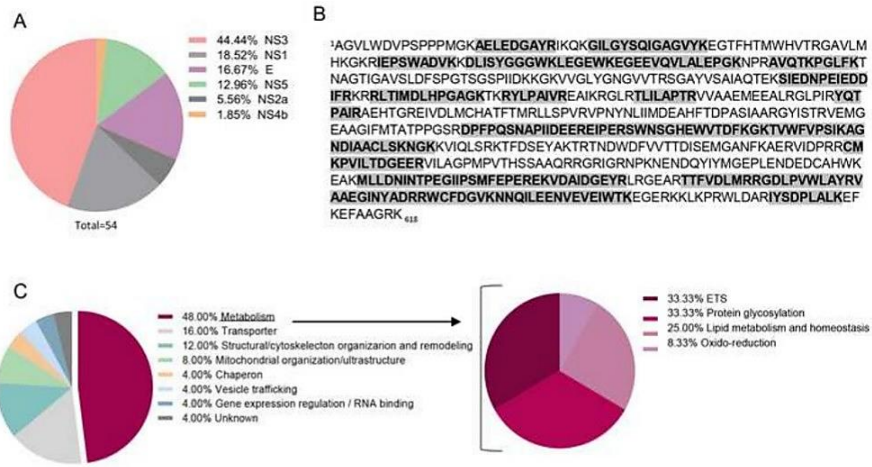


Figure 2

[Click here to access/download;Main Figure \(High Resolution\);Fig. 2.tif](#)

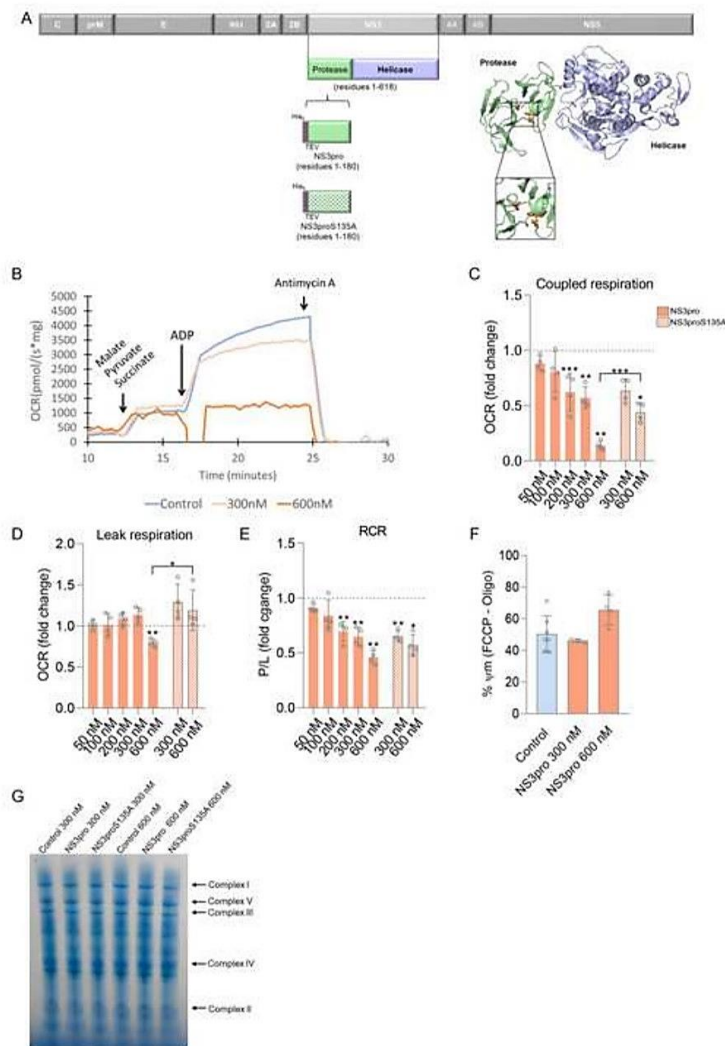


Figure 3

[Click here to access/download;Main Figure \(High Resolution\);Fig. 3.tif](#)

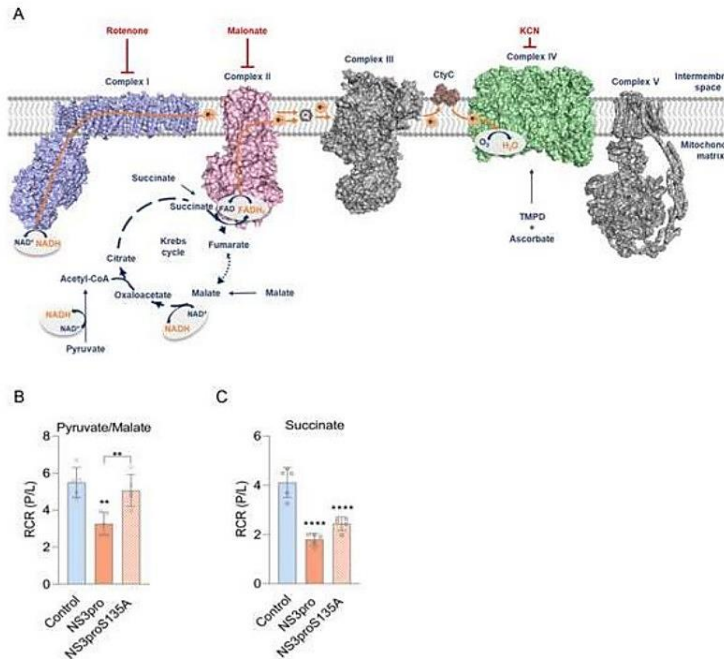


Figure 4

[Click here to access/download;Main Figure \(High Resolution\);Fig. 4.tif](#)

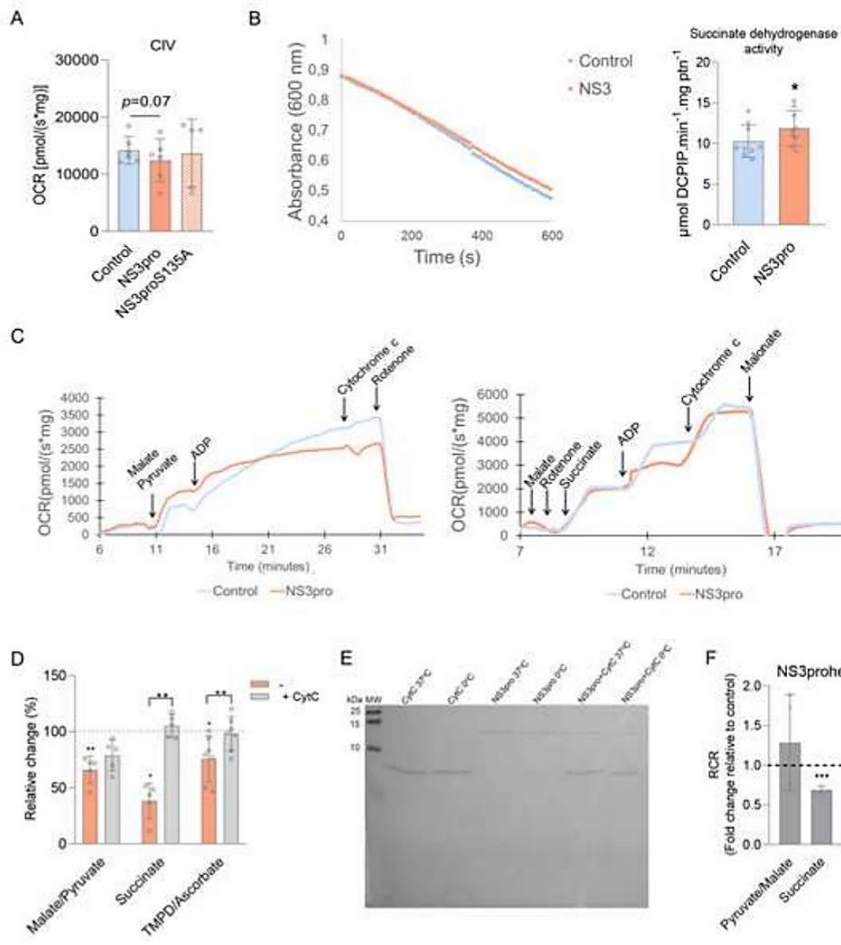


Figure 5

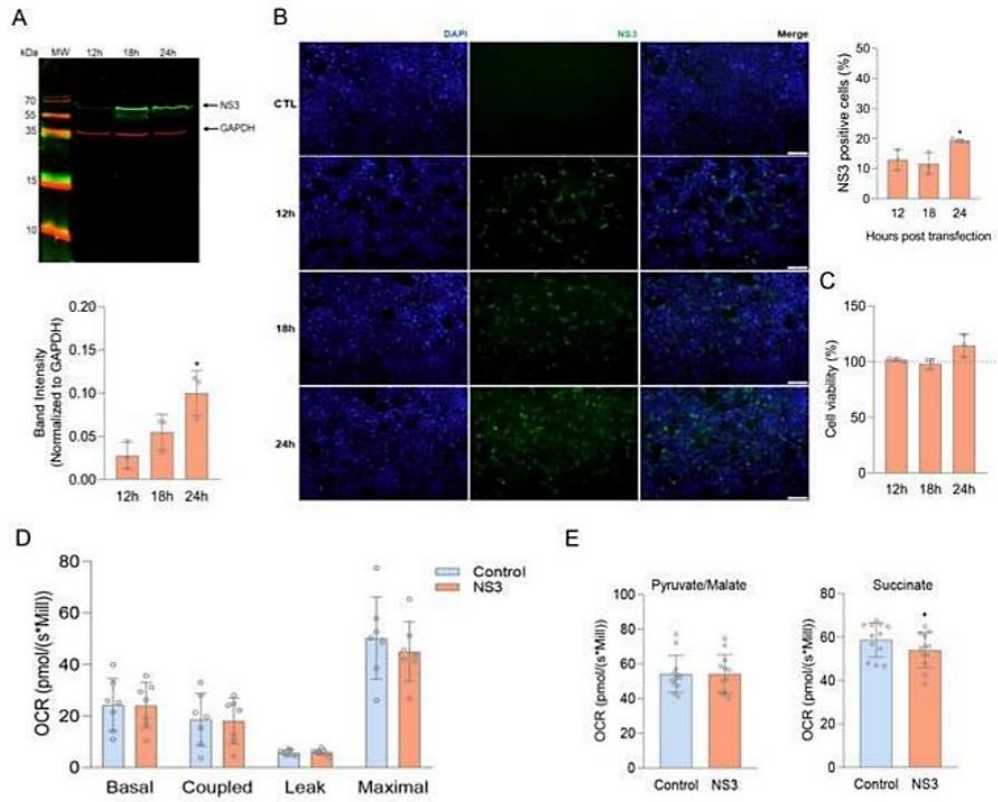
[Click here to access/download;Main Figure \(High Resolution\);Fig. 5.tif](#)


Table 1

[Click here to access/download;Main Table;Table 1.docx](#)

Table 1.

Peptide sequence	Peptide length (aa)	Protein
AELEDGAYR	9	Serine protease NS3
AGNDIAACLSKNGK	14	Serine protease NS3
AVQTKPGLFK	10	Serine protease NS3
CMKPVILTDGEER	13	Serine protease NS3
DLISYGGGWK	10	Serine protease NS3
DPFPQSNAPIIDEEREIPER	20	Serine protease NS3
EGEEVQVLALEPGKNPR	17	Serine protease NS3
EKVIDAIDGEYR	11	Serine protease NS3
RGDLPVWLAYR	11	Serine protease NS3
GILGYSQIGAGVYK	14	Serine protease NS3
IEPSWADVK	9	Serine protease NS3
IYSDPLALK	9	Serine protease NS3
LEGEWKEGEEVQVLALEPGK	20	Serine protease NS3
LTIMDLHPGAGK	12	Serine protease NS3
MLLDNINTPEGIIPSMFEPEREK	23	Serine protease NS3
NNQILEENVEVEIWK	16	Serine protease NS3
RLTIMDLHPGAGK	13	Serine protease NS3
RYLPAIVR	8	Serine protease NS3
SIEDNPEIEDDIR	14	Serine protease NS3
SWNSGHEWVTDKFKGK	15	Serine protease NS3
TLILAPTR	8	Serine protease NS3
TTFVDLMRR	9	Serine protease NS3
TVWFVPSIK	9	Serine protease NS3
VAAEGINYADRR	12	Serine protease NS3
WCFDGVK	7	Serine protease NS3
YQTPAIR	7	Serine protease NS3
AHEEGICGIR	10	Non-structural protein 1
ASFIEVK	7	Non-structural protein 1
CGSGIFITDNVHTWTEQYK	19	Non-structural protein 1
LENLMWK	7	Non-structural protein 1
LITEWCCR	8	Non-structural protein 1
QITPELNHILSENEVK	16	Non-structural protein 1
NLAGPVSQHNYRPGYHTQITGPWHLGK	27	Non-structural protein 1
LTIMTGDIK	9	Non-structural protein 1
SHTLWSNGVLESEMIIPK	18	Non-structural protein 1
SLRPQPTLTK	10	Non-structural protein 1
TDWIPLALTIK	11	Non-structural protein 2A
GLNPTAIFLTTLSR	14	Non-structural protein 2A
TDWIPLALTIK	11	Non-structural protein 2A
VRPTFAAGLLLR	12	Non-structural protein 2A
CPTQGEPSLNEEQDKR	16	Envelope protein E
DSPVNIEAEPFPGDSYIIIGVEPGQLK	27	Envelope protein E
ETLVTFK	7	Envelope protein E
GGIVTCAMFR	10	Envelope protein E
GSSIGQMFETTMR	13	Envelope protein E
HSMVDRGWNGCGLFGK	17	Envelope protein E
ITPQSSTEAELTGYGTVTMECSPR	25	Envelope protein E
LITVNPVTEK	11	Envelope protein E
NKPTLDFELIK	11	Envelope protein E
EAVEDSRFVELVDK	14	RNA-directed RNA polymerase NS5
EDQWCGSLIGLTSR	14	RNA-directed RNA polymerase NS5
EGGAMYADDTAGWDTR	16	RNA-directed RNA polymerase NS5
GSRAIWMWLGAR	13	RNA-directed RNA polymerase NS5
LQSGVDVFFIPPEK	14	RNA-directed RNA polymerase NS5
NIGIESEIPNLDIIGK	16	RNA-directed RNA polymerase NS5
TPVESWEEIPYLGK	14	RNA-directed RNA polymerase NS5
NPTVDGITVIDLPIPYDPK	20	Non-structural protein 4B

Author contributions

B. G. S., J. D. Z. and A. T. P. conceptualization; B. G. S. and M. B. C. formal analysis; A. T. P. funding acquisition; B. G. S., L. O. F. -S., M. B. C., G. N. S. and C. F. C. investigation; B. G. S., M. B. C., C. F. C., T. C. N. -M., N. C. M. -A. and J. D. Z. methodology; A. A. G., R. B. Z. and A. T. P. resources; J. D. Z. and A. T. P. supervision; B. G. S. and T. C. N. -M. visualization; B. G. S., J. D. Z. and A. T. P. writing – original draft; B. G. S., M. B. C., T. C. N. -M., N. C. M. -A., A. A. G., J. D. Z. and A. T. P. writing – review & editing.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
Instituto de Microbiologia Paulo de Góes
Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia)



DECLARAÇÃO DE CONHECIMENTO DE DIREITOS AUTORAIS

Eu, **Bruna Guedes de Sousa**, declaro que não reproduzi em minha **tese** imagens, ilustrações, figuras, fotos, tabelas, gráficos, quadros e PDFs, sem prévia autorização dos órgãos/pessoas que são de direito. Nesse sentido, encontram-se anexados no final de minha **tese** todas as documentações de permissão de reprodução de imagens, cedidas pelos autores, journals e/ou editoras científicas.

Bruna Guedes de Sousa

(nome e assinatura do(a)
discente)

Documentações de permissão de reprodução de imagens referente as figuras 2 e 7

06/04/2023, 21:49

RightsLink Printable License

OXFORD UNIVERSITY PRESS LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 06, 2023

This Agreement between Bruna Sousa ("You") and Oxford University Press ("Oxford University Press") consists of your license details and the terms and conditions provided by Oxford University Press and Copyright Clearance Center.

License Number	5467760817675
License date	Jan 14, 2023
Licensed content publisher	Oxford University Press
Licensed content publication	FEMS Microbiology Reviews
Licensed content title	Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells
Licensed content author	Cruz-Oliveira, Christine; Freire, João Miguel
Licensed content date	Feb 25, 2015
Type of Use	Thesis/Dissertation
Institution name	
Title of your work	Metabolic alterations induced by the dengue virus NS3 protein
Publisher of your work	Federal University of Rio de Janeiro
Expected publication date	Mar 2023
Permissions cost	0.00 USD
Value added tax	0.00 USD

06/04/2023, 21:49

RightsLink Printable License

Total	0.00 USD
Title	Metabolic alterations induced by the dengue virus NS3 protein
Institution name	Federal University of Rio de Janeiro
Expected presentation date	Mar 2023
Portions	Figure 1 A
Specific Languages	Portuguese
	Bruna Sousa Paula Barros 277
Requestor Location	Rio de Janeiro, 21221420 Brazil Attn: Bruna Sousa
Publisher Tax ID	GB125506730
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

**STANDARD TERMS AND CONDITIONS FOR REPRODUCTION OF MATERIAL
FROM AN OXFORD UNIVERSITY PRESS JOURNAL**

1. Use of the material is restricted to the type of use specified in your order details.
2. This permission covers the use of the material in the English language in the following territory: world. If you have requested additional permission to translate this material, the terms and conditions of this reuse will be set out in clause 12.
3. This permission is limited to the particular use authorized in (1) above and does not allow you to sanction its use elsewhere in any other format other than specified above, nor does it apply to quotations, images, artistic works etc that have been reproduced from other sources which may be part of the material to be used.
4. No alteration, omission or addition is made to the material without our written consent. Permission must be re-cleared with Oxford University Press if/when you decide to reprint.

5. The following credit line appears wherever the material is used: author, title, journal, year, volume, issue number, pagination, by permission of Oxford University Press or the sponsoring society if the journal is a society journal. Where a journal is being published on behalf of a learned society, the details of that society must be included in the credit line.

6. For the reproduction of a full article from an Oxford University Press journal for whatever purpose, the corresponding author of the material concerned should be informed of the proposed use. Contact details for the corresponding authors of all Oxford University Press journal contact can be found alongside either the abstract or full text of the article concerned, accessible from www.oxfordjournals.org Should there be a problem clearing these rights, please contact journals.permissions@oup.com

7. If the credit line or acknowledgement in our publication indicates that any of the figures, images or photos was reproduced, drawn or modified from an earlier source it will be necessary for you to clear this permission with the original publisher as well. If this permission has not been obtained, please note that this material cannot be included in your publication/photocopies.

8. While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by Oxford University Press or by Copyright Clearance Center (CCC)) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and Oxford University Press reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned or transferred by you to any other person without Oxford University Press's written permission.

10. Oxford University Press reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

11. You hereby indemnify and agree to hold harmless Oxford University Press and CCC, and their respective officers, directors, employs and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

12. Other Terms and Conditions:

v1.4

Questions? customercare@copyright.com.

06/04/2023, 21:48

RightsLink Printable License

ELSEVIER LICENSE
TERMS AND CONDITIONS

Apr 06, 2023

This Agreement between Bruna Sousa ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	5467800914640
License date	Jan 14, 2023
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Cell Host & Microbe
Licensed Content Title	Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites
Licensed Content Author	Sonja Welsch,Sven Miller,Ines Romero-Brey,Andreas Merz,Christopher K.E. Bleck,Paul Walther,Stephen D. Fuller,Claude Antony,Jacomine Krijnse-Locker,Ralf Bartenschlager
Licensed Content Date	Apr 23, 2009
Licensed Content Volume	5
Licensed Content Issue	4
Licensed Content Pages	11
Start Page	365
End Page	375
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation

06/04/2023, 21:48

RightsLink Printable License

Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	No
Title	Metabolic alterations induced by the dengue virus NS3 protein
Institution name	Federal University of Rio de Janeiro
Expected presentation date	Mar 2023
Portions	Figure 3
	Bruna Sousa Paula Barros 277
Requestor Location	Rio de Janeiro, 21221420 Brazil Attn: Bruna Sousa
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

<https://s100.copyright.com/CustomerAdmin/PLF.jsp?ref=599b624e-b416-4e9d-bc26-6a31e7e8f6a1>

2/7

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier's permissions helpdesk [here](#)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. **No Amendment Except in Writing:** This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. **Objection to Contrary Terms:** Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. **Revocation:** Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. For book authors the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated.

The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the

work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.10

Questions? customercare@copyright.com.
