



**Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da  
Saúde**

---

**JÚLIA GUIMARÃES DIAS RUBIATO**

**Estudo *in vitro* da diversidade genética e  
dinâmica de adaptação do vírus da encefalite  
de Saint Louis (SLEV) durante ciclo de  
transmissão**

**São José do Rio Preto**

**2023**

**JÚLIA GUIMARÃES DIAS RUBIATO**

**Estudo *in vitro* da diversidade genética e  
dinâmica de adaptação do vírus da encefalite  
de Saint Louis (SLEV) durante ciclo de  
transmissão**

Tese apresentada à  
Faculdade de Medicina de  
São José do Rio Preto para  
obtenção do Título de Mestre  
no curso de Pós-Graduação  
em Ciências da Saúde, Eixo  
Temático: Medicina e  
Ciências Correlatas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme R. F. Campos

**SÃO JOSÉ DO RIO PRETO**

**2023**

Rubiato, Júlia Guimarães Dias Rubiato

Estudo *in vitro* da diversidade genética e dinâmica de adaptação do vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) durante ciclo de transmissão/ Júlia Guimarães Dias Rubiato

São José do Rio Preto, 2024 44 p.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – FAMERP Eixo temático: Medicina e Ciências correlatas

Orientador: Prof. Dr. Guilherme Rodrigues Fernandes Campos

1. SLEV; 2. Diversidade genética viral; 3. Interação Vírus-Hospedeiro;

**JÚLIA GUIMARÃES DIAS RUBIATO**

**Estudo *in vitro* da diversidade genética e  
dinâmica de adaptação do vírus da encefalite  
de Saint Louis (SLEV) durante ciclo de  
transmissão**

**BANCA EXAMINADORA  
TESE PARA OBTENÇÃO DO GRAU DE  
MESTRE**

# SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	I
Lista de Abreviaturas e Símbolos.....	II
Resumo.....	III
Abstract.....	V
INTRODUÇÃO.....	1
1. Arbovírus.....	1
1.2 .....	2
2. Encefalite de Saint Louis.....	4
2.1 Estrutura e Replicação .....	6
2.2 Interação vírus-vetor .....	8
2.3 Interação vírus-hospedeiro .....	9
JUSTIFICATIVA.....	11
OBJETIVOS.....	12
MATERIAIS E MÉTODOS.....	12
RESULTADOS.....	20
DISCUSSÃO.....	27
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

## Lista de Figuras

Figura 1: Distribuição do SLEV pela América.....	5
Figura 2: Estrutura genômica dos <i>Orthoflavivirus</i> .....	7
Figura 3: Esquema das barreiras do mosquito.....	9
Figura 4. Esquema das células imunológicas envolvidas na resposta imune.....	11
Figura 5: Titulação do SLEV durante o ciclo interhospedeiro. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registro fotográfico das titulações.....	21
Figura 6: Titulação do SLEV durante o ciclo intrahospedeiro em LLC-MK2. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registro fotográfico das titulações.....	22
Figura 7: Titulação do SLEV durante o ciclo intrahospedeiro em Aag2. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registro fotográfico das titulações.....	23
Figura 8: Frequência das mutações de todas os ciclos. As bolinhas roxas representam as mutações não sinônimas, enquanto as verdes representam as sinônimas.....	24
Figura 9: Frequência das mutações no ciclo interhospedeiro. Aparecem apenas as que tiveram maior modulação em suas frequências. ....	25
Figura 10: Frequência das mutações no ciclo intrahospedeiro em LLC-MK2. Aparecem apenas as que tiveram maior modulação em suas frequências.....	26
Figura 11: Frequência das mutações no ciclo intrahospedeiro em Aag2. Aparecem apenas as que tiveram maior modulação em suas frequências.....	26

## Lista de Abreviaturas e Símbolos

<b>CHIKV</b>	<b>Vírus Chikungunya</b>
<b>DENV</b>	<b>Vírus da dengue</b>
<b>EEEV</b>	<b>Vírus da encefalite equina oriental</b>
<b>EEEV</b>	<b>Vírus da encefalite equina oriental</b>
<b>iRNA</b>	<b>Ácido ribonucleico de interferência</b>
<b>JEV</b>	<b>Vírus da encefalite japonesa</b>
<b>MAYV</b>	<b>Vírus Mayaro</b>
<b>MIB</b>	<b>Barreiras de infecção do intestino</b>
<b>MEB</b>	<b>Barreira de escape do intestino</b>
<b>OROV</b>	<b>Vírus Oropouche</b>
<b>RNA</b>	<b>Ácido ribonucleico</b>
<b>RRV</b>	<b>Vírus Ross river</b>
<b>SLEV</b>	<b>Vírus da encefalite de Saint Louis</b>
<b>TB</b>	<b>Barreiras de transmissão</b>
<b>VEEV</b>	<b>Vírus da encefalite equina venezuelana</b>
<b>WEEV</b>	<b>Vírus da encefalite equina ocidental</b>
<b>WNV</b>	<b>Vírus do Nilo ocidental</b>

## Resumo

**Introdução:** O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) é um vírus de RNA fita simples, de polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae*, gênero *Orthoflavivirus*. Junto com outros vírus já conhecidos, como o vírus da dengue (DENV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV), são integrantes dos arbovírus, um grupo de vírus capazes de ser transmitidos a partir de um vetor artrópode. Apesar de não ser considerado um problema de saúde global como outras arboviroses, o SLEV já causou surtos no Brasil e apresenta potencial para ocasionar novos surtos e epidemias no futuro. **Objetivos:** Este estudo visou avaliar a variabilidade genética e a dinâmica adaptativa do SLEV, em cultura de células, durante os ciclos de transmissão entre o hospedeiro invertebrado e o hospedeiro vertebrado, assim como a dinâmica adaptativa, em nível intrahospedeiro, para cada um de seus hospedeiros. **Materiais e Métodos:** Os ciclos de infecção interhospedeiro e intrahospedeiro foram mimetizados em cultura de células, em linhagens de mosquito (Aag2) e de primata (LLC-MK2), onde a diversidade genética do SLEV entre as passagens de cada ciclo e ao final dos ciclos foi avaliada com o sequenciamento de nova geração. **Resultados:** De forma geral, muitas mutações se fixaram na população, sendo 82,45% sinônimas. No ciclo interhospedeiro, entre todas as mutações, as NS2A:T3727C e NS2B: C4576A se fixaram com uma modulação entre 30% e 70% durante as passagens. A Infecção nesse ciclo foi interrompida de forma antecipada, após a segunda passagem, uma vez que o vírus coletado nesse ponto perdeu infectividade, possivelmente por conta da emergência de inúmeras substituições. Para o ciclo intrahospedeiro em linhagem de vertebrados, houve uma fixação de 99% para as mutações NS1:R100K e NS4B:T7075C. Por último, no ciclo em invertebrados a E:H285R emergiu e

alcançou uma frequência de 61%. Do ponto de vista fenotípico, nos ciclos interhospedeiro e intrahospedeiro vertebrado, um fenótipo menor de plaque viral ocorreu, com impacto direto no aumento do título. **Conclusão:** Esses dados sugerem que as passagens intrahospedeiro, seja em linhagem de mosquito ou em primata, exercem pressões seletivas distintas que direcionam a rápida evolução do SLEV, com impacto direto no fenótipo de plaque viral e no *fitness* replicativo. Comparativamente, a alternância de hospedeiros aparentemente impõe uma barreira maior para a evolução viral. A dinâmica evolutiva e adaptativa do SLEV aos diferentes hospedeiros ainda é uma grande questão, mas os achados aqui descritos proporcionam caminhos para possivelmente entender como esse arbovírus se comporta em seu ciclo de infecção, assim como ele se adapta a novos potenciais hospedeiros.

**Palavras-chave:** SLEV; Diversidade genética viral; Interação vírus-hospedeiro.

## Abstract

**Introduction:** The Saint Louis encephalitis virus (SLEV) is a single-stranded positive-sense RNA virus belonging to the Flaviviridae family, Orthoflavivirus genus. Alongside other well-known viruses such as dengue virus (DENV), West Nile virus (WNV), and Japanese encephalitis virus (JEV), it is part of the arboviruses, a group of viruses capable of being transmitted by arthropod vectors. Although not considered a global health problem like other arboviruses, SLEV has caused outbreaks in Brazil and has the potential to cause new outbreaks and epidemics in the future. **Objectives:** This study aimed to assess the genetic variability and adaptive dynamics of SLEV in cell culture during transmission cycles between the invertebrate and vertebrate hosts, as well as the intrahost adaptive dynamics for each of its hosts. **Materials and Methods:** Interhost and intrahost infection cycles were mimicked in cell culture using mosquito (Aag2) and primate (LLC-MK2) cell lines, where the genetic diversity of SLEV between passages of each cycle and at the end of the cycles was evaluated using next-generation sequencing. **Results:** Overall, many mutations became fixed in the population, with 82.45% being synonymous. In the interhost cycle, among all mutations, NS2A:T3727C and NS2B:C4576A became fixed with a modulation between 30% and 70% during passages. Infection in this cycle was prematurely interrupted after the second passage, as the virus collected at this point lost infectivity, possibly due to the emergence of numerous substitutions. For the intrahost cycle in vertebrate cell lines, there was a fixation of 99% for mutations NS1:R100K and NS4B:T7075C. Finally, in the invertebrate cycle, E:H285R emerged and reached a frequency of 61%. Phenotypically, in both interhost and intrahost vertebrate cycles, a smaller viral

plaque phenotype occurred, directly impacting the increase in titer. **Conclusion:** These data suggest that intrahost passages, whether in mosquito or primate cell lines, exert distinct selective pressures that drive the rapid evolution of SLEV, with a direct impact on the viral plaque phenotype and replicative fitness. Comparatively, host alternation apparently poses a greater barrier to viral evolution. The evolutionary and adaptive dynamics of SLEV to different hosts are still a major question, but the findings described here provide insights into possibly understanding how this arbovirus behaves in its infection cycle and adapts to new potential hosts.

**Keywords:** SLEV; Viral genetic diversity; Virus-host interaction.

## INTRODUÇÃO

### 1. Arbovírus

Arbovírus são vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, mosquitos em sua maioria, através da picada a outros animais, como aves e roedores, incluindo o homem, que configura-se como hospedeiro acidental na maioria das arboviroses por não contribuir com seu ciclo de transmissão (1).

Entre as quase mais de 600 espécies, as famílias *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Flaviviridae* são as responsáveis pela maioria das arboviroses, sendo associadas com mais de 100 doenças transmitidas ao homem (1,2,3). Todos, com exceção do vírus da peste suína africana, são vírus de RNA, o que explica a alta diversidade dessas arboviroses. Isto faz com que a taxa mutacional desses vírus seja elevada, o que concede a alta capacidade de se adaptar e de ser transmitido entre vertebrados e artrópodes (4).

Dentre as cinco famílias citadas, os arbovírus de maior importância clínica são os *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *Chikungunya virus* (CHIKV), *Yellow Fever virus* (YFV), *Oropouche virus* (OROV), *Mayaro virus* (MAYV) e *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), sendo os responsáveis pela grande porcentagem de morbidades a nível mundial, principalmente em países tropicais, mas não apenas nestes (1).

O aumento das arboviroses está intrinsecamente ligado a uma série de fatores complexos. As condições climáticas desempenham um papel crucial, em que ambientes quentes e úmidos favorecem a reprodução e sobrevivência de vetores como mosquitos. A urbanização crescente e a globalização facilitam o

deslocamento de pessoas, mercadorias e, conseqüentemente, dos próprios vetores e vírus para novas regiões. Mudanças ambientais, como desmatamento e alterações no uso do solo, afetam os habitats naturais dos vetores, enquanto o acúmulo de água parada em locais como pneus velhos e recipientes descartados proporciona condições ideais para a proliferação. A falta de saneamento básico e a resistência aos inseticidas também desempenham papéis significativos. Além disso, a globalização das viagens internacionais amplifica o potencial de disseminação dos vírus. Em razão dessas e outras causas, os *Dengue virus*, *Zika virus* e *Chikungunya virus* já tem o homem como hospedeiro definitivo, não possuindo mais seu ciclo enzoótico (5).

A emergência e permanência desse grupo de vírus em uma nova região provoca alguns impactos na saúde pública, como o surgimento de epidemias e surtos, acarretando desafios aos sistemas públicos de saúde, que ficam sobrecarregados ao ponto de não conseguirem suprir todas as necessidades da população local. Outro desafio encontrado é o diagnóstico, pois a maioria das arboviroses apresentam sintomas parecidos, testes sorológicos podem apresentar reações cruzadas, e, mesmo que não frequente, coinfeções também podem surgir. Além disso, não só o sistema de saúde, mas também o socioeconômico acaba sendo afetado, pois os custos aumentam, o número de trabalhadores pode cair devido à própria doença e, dependendo do local, o turismo pode vir a ter um déficit, assim ocasionando um impacto negativo em toda a economia local (1,5).

### **1. 2 Família *Flaviridae***

Dentre os três gêneros presentes nesta família, apenas o gênero *Orthoflavivirus* faz parte do grupo dos arbovírus, possuindo mais de 30 espécies

causadoras de doenças. Entre elas, os vírus mais conhecidos são *Dengue virus*, *Zika virus* e *Yellow fever virus* (1).

Possuem uma configuração estrutural esférica, com dimensões que variam entre 40 a 60 nanômetros. Sua estrutura é composta por um envelope lipídico que envolve o capsídeo proteico (C), apresentando na superfície do envelope proteínas de membrana e espículas de natureza glicoproteica. Dentro do capsídeo se encontra o genoma viral (1,2).

Seu genoma consiste em RNA de fita simples, linear, não segmentado e de polaridade positiva, contendo aproximadamente 11.000 nucleotídeos. O genoma possui uma única região de leitura aberta (ORF - *open reading frame*) responsável pela codificação de diversas proteínas. Entre estas, destacam-se três proteínas estruturais principais: a proteína C do capsídeo, a proteína precursora de membrana (prM) e a proteína do envelope (E). Adicionalmente, o genoma também codifica sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5), interpretando papéis cruciais na replicação viral, montagem do vírus e interação com o hospedeiro (1,2,3).

O vírus da Dengue possui quatro sorotipos, DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, e é transmitido através da picada da fêmea do *Aedes Aegypti*. Tem o homem como hospedeiro definitivo, sendo exclusivo de ciclos urbanos, e pode atingir pessoas de qualquer idade. Os sintomas podem variar entre febre, artralgia, mialgia, dor retro-orbital e, em casos mais graves, febre hemorrágica, dor abdominal e vômito (1,3).

Assim como o DENV, o vírus da Zika é transmitido através da picada da fêmea do *Aedes Aegypti* e tem como hospedeiro definitivo o homem, podendo atingir pessoas de qualquer idade, mas sendo potencialmente perigosos em

gestantes. Os principais sintomas são mialgia, febre, artralgia e manchas vermelhas na pele, porém, em neonatos, pode ocorrer o surgimento de microcefalia congênita, convulsões e contratura dos membros (1).

Também transmitido através da picada da fêmea do *Aedes Aegypti*, mas não só por ele, o vírus da Febre Amarela possui o ciclo urbano e selvagem, tendo primatas como reservatório principal. Pode atingir pessoas de qualquer idade e apresenta sintomas como febre, mialgia, vômitos e perda de apetite (3).

O vírus do Oeste do Nilo, transmitido através da picada do mosquito *Culex pipien*, tem como principal reservatório aves selvagens e seu ciclo de transmissão, normalmente, envolve equídeos, mas detém o homem como hospedeiro acidental. Os sintomas variam entre febre, mialgia, fadiga, exantema e, em casos mais graves, meningite e encefalite (1).

O vírus da Encefalite Japonesa é transmitido por mosquitos do gênero *Culex* e costuma infectar equídeos e suínos. Seu principal reservatório são aves selvagens, mas podem infectar seres humanos de forma acidental, e seus sinais clínicos incluem febre, calafrios, dores musculares, mialgia severa com vômitos e, em casos mais graves, encefalite (1).

## **2. VÍRUS DA ENCEFALITE DE SAINT LOUIS**

Sua primeira aparição ocorreu na década de 30 no estado de Illinois nos Estados Unidos, sendo isolado anos depois de amostras de cérebro humano a partir de uma epidemia na cidade de Saint Louis, a qual lhe deu o nome, com mais de 1000 casos e 197 óbitos. Mais tarde, outros surtos aconteceram nos estados do Missouri, Califórnia, Flórida e Texas (6,7).

Apenas na década de 60 o vírus foi encontrado na América do Sul, mais precisamente no Brasil, em um mosquito *Sabethes belisarioi* na rodovia

Belém-Brasília, e posteriormente, em 1978, em uma mulher de 21 anos na cidade de Belém (7,10). Adiante, surgiram casos na bacia amazônica no final da década de 90 e um caso na cidade de São Pedro confundido com o DENV (7). Surtos ocorreram em outros locais da América Latina, como Argentina e Peru, entre 2005 e 2010, tendo o primeiro surto no Brasil na cidade de São José do Rio Preto em 2006 junto ao DENV-3 (1,7,11). O último caso registrado no país foi em 2008, no interior do estado de São Paulo, na cidade de Ribeirão Preto, confundido com o DENV (12).

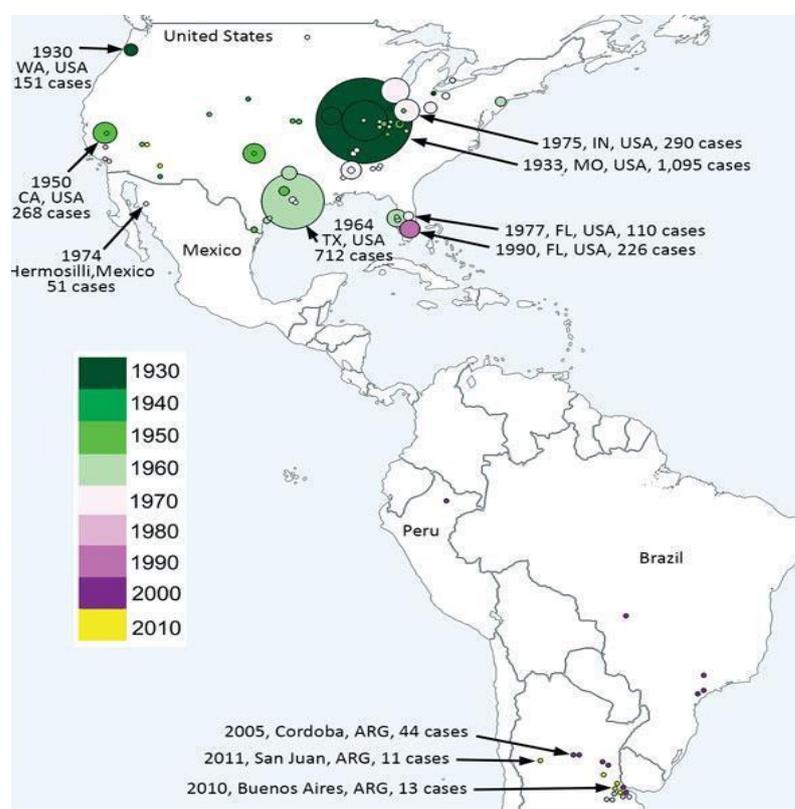


Figura 1. Distribuição dos casos de SLEV pela América. Fonte: DIAZ et al., 2018.

Sua transmissão é feita principalmente por mosquitos do gênero *Culex spp.* e ocorre quando um mosquito infectado faz seu repasto sanguíneo. Geralmente, os mosquitos se infectam ao se alimentarem do sangue de aves ou roedores, que são hospedeiros naturais do vírus. No entanto, o SLEV pode infectar humanos e, normalmente causa sintomas leves ou assintomáticos. Os sintomas da infecção,

quando presentes, podem incluir febre, dor de cabeça, fadiga, fraqueza e, em alguns casos raros, podem levar a complicações neurológicas graves, como encefalite ou meningite (1,7).

O diagnóstico é realizado através da avaliação dos sintomas clínicos e exames laboratoriais, como testes sorológicos para detectar anticorpos específicos (IgM e IgG), isolamento viral e testes moleculares, como PCR ou sequenciamento. Exames de imagem também podem ser utilizados em casos mais graves para avaliar danos neurológicos (1,2,13).

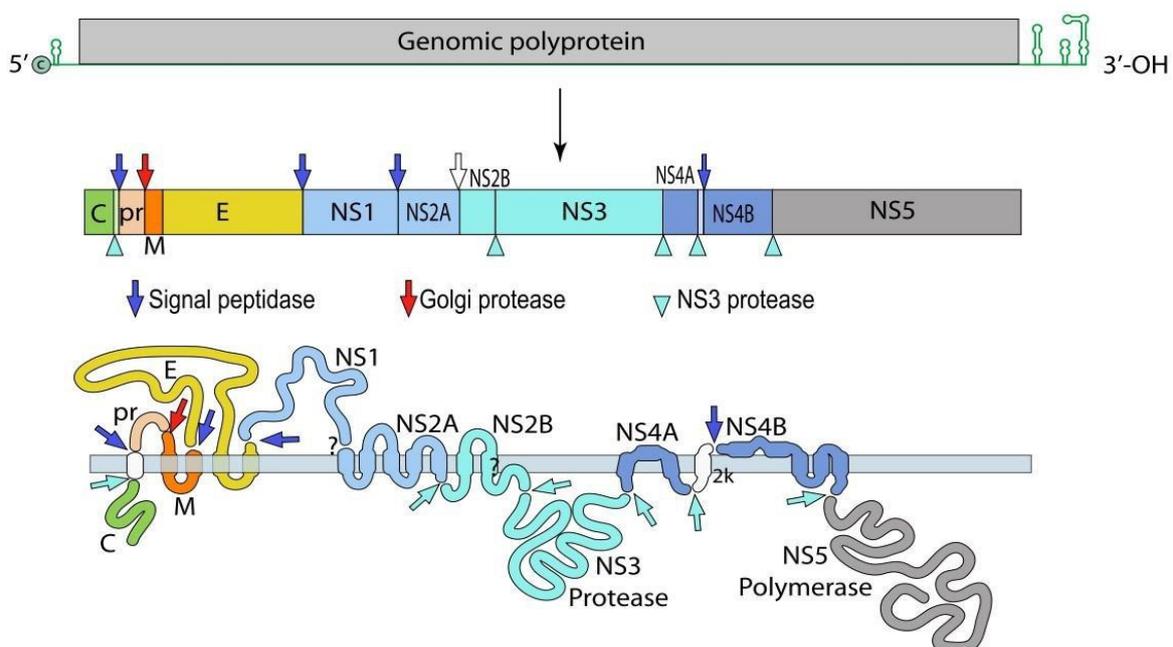
Não existe uma vacina ou medicamentos para a infecção, dessa forma, a prevenção envolve principalmente medidas para reduzir a exposição a picadas de mosquitos. Algumas medidas preventivas incluem o uso de repelentes contra insetos, roupas que cubram a maior parte do corpo, a instalação de telas em portas e janelas, e a aplicação de inseticidas para reduzir a população de mosquitos ao redor das áreas habitadas (14).

Quanto ao tratamento, é direcionado aos sintomas apresentados pelo paciente. Isso pode incluir repouso, ingestão adequada de líquidos para evitar a desidratação, analgésicos e antipiréticos para aliviar a febre e dores no corpo. Em casos mais graves, especialmente quando há manifestações neurológicas como encefalite ou meningite, pode ser necessária hospitalização para cuidados médicos mais intensivos (15).

## **2. 1 Estrutura e replicação**

O vírus da encefalite de Saint Louis (SLEV) possui oito genótipos, sendo I e II mais comuns na América do Norte, e os demais na América do Sul, e faz parte do complexo antigênico da encefalite japonesa. Dispõe de um RNA de fita simples e polaridade positiva com a ordem 5'- C - preM - NS1 - NS2A - NS2B - NS3 - NS4A

-NS4B - NS5 - C, e é composto por duas regiões não codificantes, conhecidas como 5' e 3' UTR, flanqueando uma região traduzível chamada de ORF (do inglês *Open Reading Frame*) (7). Ao invadir as células, o RNA viral é liberado no citoplasma e a ORF é imediatamente traduzida pelos ribossomos, aproveitando sua orientação positiva (5' para 3'), a mesma observada nos RNAs mensageiros celulares. Essa tradução da ORF ocorre de forma contínua, gerando uma poliproteína de 3,300 resíduos de aminoácidos, que será posteriormente clivada por proteases virais e celulares em proteínas do capsídeo, envelope e pré-membrana (C, E e prM) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (7,6).



**Figura 2.** Estrutura genômica dos *Orthoflavivirus*. Fonte: [viralzone.expasy.org](http://viralzone.expasy.org)

Estas proteínas desempenham papéis específicos na direção da maquinaria celular para possibilitar a replicação do genoma viral, resultando na formação e liberação de novas partículas virais para infectar células vizinhas. A NS1 e NS4A participam da replicação viral, a NS2A na liberação viral, NS2B e NS3 possuem atividade proteolíticas, e a NS5 participa da metilação da estrutura 5'-CAP, além de

atuar como RNA polimerase dependente de RNA viral, realizando a replicação do genoma viral. O ciclo viral do SLEV tem início na interação entre o vírus e os receptores celulares. Após essa interação, a partícula viral é internalizada por endocitose e o material genético do vírus é então liberado no citoplasma (7,6).

Seguindo o padrão replicativo geral dos vírus pertencentes ao gênero *Orthoflavivirus*, o genoma viral liberado no citoplasma é reconhecido pelos ribossomos celulares, como mencionado anteriormente, devido à sua orientação positiva, que é similar à encontrada nos RNAs mensageiros celulares. Os ribossomos começam a tradução do genoma, resultando na formação de uma poliproteína que, posteriormente, é processada por proteases virais e celulares, originando as proteínas virais individuais. Após a replicação do genoma viral, as cópias são montadas em novas partículas que serão então liberadas da célula (7,9).

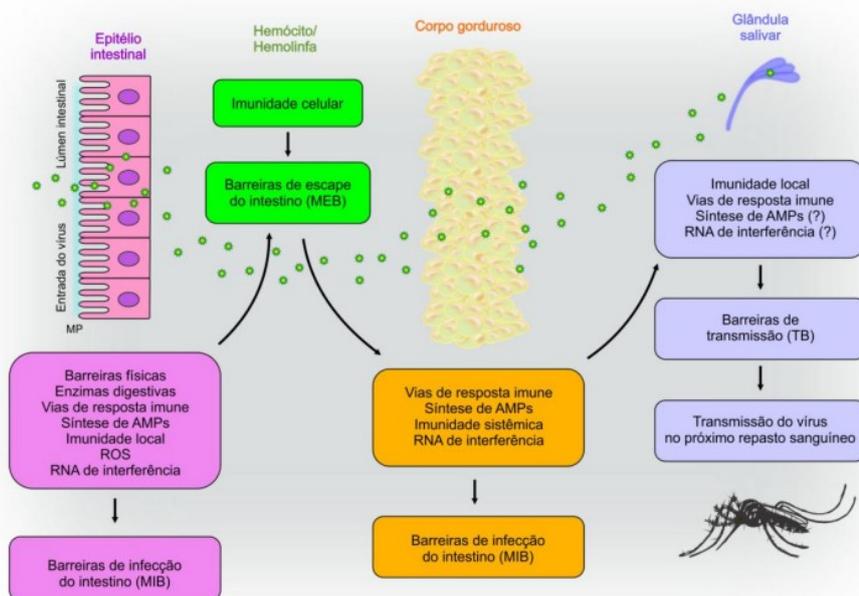
## **2. 2 Interação vírus-vetor**

Ao contrário do que ocorre nos vertebrados, em que a doença se apresenta de forma aguda e autolimitada por meio da corrente sanguínea, a interação entre vírus e vetor nos mosquitos é caracterizada pela persistência da infecção sistêmica ao longo de toda a vida do vetor, sem que este manifeste sintomas da doença, embora continue a produzir partículas infecciosas. Desse modo, o mosquito é capaz de transmitir o vírus de maneira altamente eficaz (16).

Para que o vetor seja capaz de transmitir o vírus é necessário adquirir a competência vetorial, a qual só é conquistada ao ser infectado, possibilitar a multiplicação desse vírus e, por último, conseguir transmiti-lo a um hospedeiro vertebrado (16,17).

A competência vetorial começa com a ingestão do vírus através do repasto sanguíneo, que cai no trato digestivo do mosquito e precisa se multiplicar nas

microvilosidades do intestino médio ao burlar a imunidade local, mecanismos de defesa físicos e químicos, como RNA interferente (RNAi), imunidade local e vias Toll e JAK-STAT, que em conjunto são chamados de Barreiras de Infecção do intestino (MIB). Em seguida, o vírus precisa invadir a hemolinfa, corpo gorduroso e, por fim, as glândulas salivares, que também possuem suas barreiras físicas e químicas, sendo elas as Barreira de escape do intestino (MEB), Barreira de Infecção do Intestino (MIB) novamente e Barreiras de Transmissão (TB) respectivamente. Após conseguir evadir todas essas barreiras, permanecendo, principalmente, nas glândulas salivares, o vírus estará apto a ser transmitido no próximo repasto sanguíneo(16,17).



**Figura 3.** Esquema das barreiras do mosquito. Fonte: Amaral, R. J. V. et al., 2012.

## 2. 3 Interação vírus-hospedeiro

Após a inoculação do vírus por meio do repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, torna-se necessário que o vírus adote estratégias de evasão para garantir sua replicação bem-sucedida. No contexto humano, ao serem

identificadas as presenças virais pelas células Dendríticas e de Langerhans, na pele, essas células desencadeiam sinais químicos direcionados a células NK, macrófagos e neutrófilos, efetuando seu recrutamento (18).

Os macrófagos, por sua vez, apresentam o invasor às células T, as quais ajudam as células B na imunidade humoral, auxiliando-as na produção de anticorpos ao expor o antígeno. A partir do estímulo proporcionado às células T, estas se especializam em quatro tipos distintos, que liberam uma chuva intensa de citocinas pró e anti-inflamatórias. Mecanismos modulados pela infecção viral alteram a liberação dessas citocinas de forma a contribuir para a inibição das vias de interferon (IFN) e na redução da dilatação dos vasos, contribuindo para o controle da resposta inflamatória e, dessa maneira, permitindo com que sua replicação tenha maior eficácia (17).

Outro fenômeno que pode vir a acontecer é o antibody-dependent enhancement (ADE). Por muitos *orthoflavivirus* apresentarem o ADE, tem-se a hipótese de que, talvez, possa acontecer o mesmo para SLEV. O ADE inicia-se com a exposição inicial ao vírus, desencadeando uma resposta imunológica adaptativa. Nesse contexto, a produção de anticorpos não neutralizantes é crucial. Enquanto alguns anticorpos são altamente eficazes na neutralização do vírus, outros podem não ser capazes de bloquear completamente a infecção, garantindo apenas sua opsonização (19, 20).

Em uma reexposição ao mesmo vírus, os anticorpos não neutralizantes gerados previamente formam complexos com o vírus. Em vez de neutralizarem o antígeno, esses anticorpos facilitam a entrada nas células hospedeiras. Isso ocorre através da interação dos complexos anticorpo-vírus com receptores nas células, promovendo a internalização do vírus facilitada (19,20).

A internalização é frequentemente mediada por células do sistema imunológico, como macrófagos e monócitos, que possuem receptores específicos para a porção dos anticorpos. Uma vez internalizado, o vírus se replica dentro dessas células, utilizando a maquinaria celular para produzir novas cópias do vírus (19, 20).

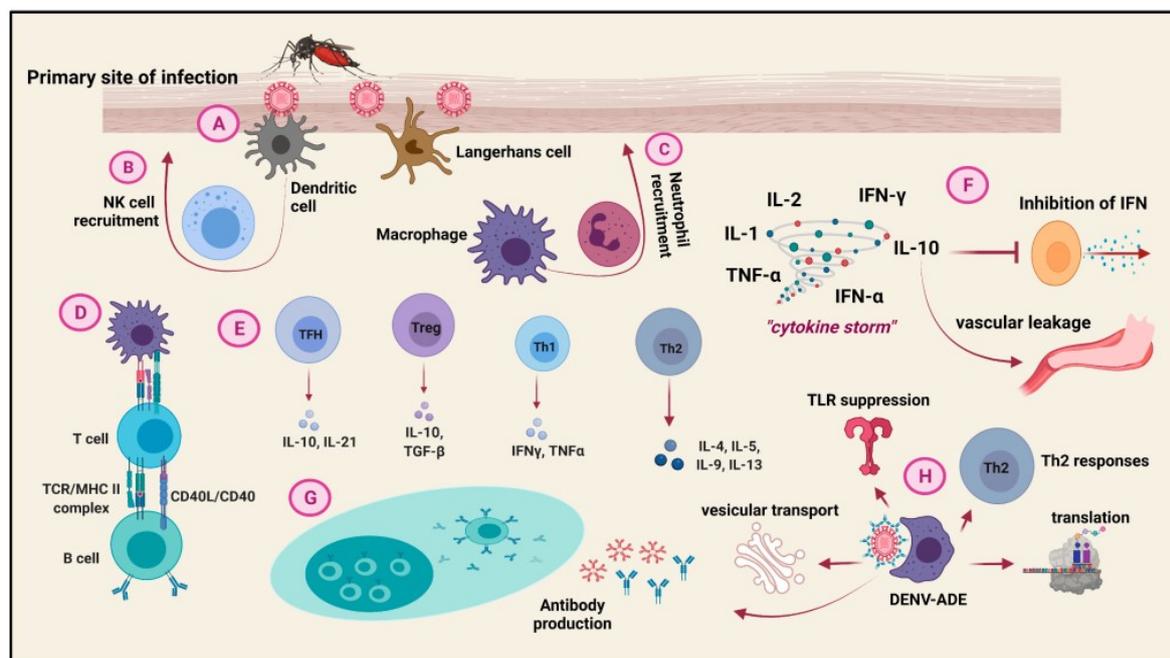


Figura 4. Esquema das células imunológicas envolvidas na resposta imune. Fonte: Nanaware N. et al., 2021.

## JUSTIFICATIVA

Compreender melhor a dinâmica adaptativa dos arbovírus é uma tarefa árdua, embora muito conhecimento nessa área já exista. Esses achados permitem saber como esses vírus se comportam ao infectar seus diferentes hospedeiros durante o ciclo de infecção, e como conseguem se adaptar a potenciais novos hospedeiros e vetores. No que diz respeito ao SLEV, um vírus com grande potencial emergente e de interesse de saúde pública, existem lacunas de conhecimento que precisam ser preenchidas, uma vez que pouco se sabe sobre a sua dinâmica evolutiva em seus diferentes hospedeiros. Dessa forma, esse estudo visou avaliar, *in vitro*, as

dinâmicas adaptativas do SLEV aos hospedeiros vertebrado e invertebrado, analisando alterações genótípicas e fenotípicas durante os ciclos de infecção.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Analisar, em cultura de células, a dinâmica adaptativa do SLEV em nível interhospedeiro e intrahospedeiro.

### **Objetivos específicos**

- Mimetizar, em cultura de células, ciclos de infecção interhospedeiro em linhagens de mosquito (Aag2) e primata (LLC-MK2);
- Mimetizar, em cultura de células, o ciclo intrahospedeiro em linhagem de primata (LLC-MK2);
- Mimetizar, em cultura de células, o ciclo intrahospedeiro em linhagem de mosquito (Aag2);
- Analisar a frequência das mutações na população viral, inter e intrahospedeiro, antes, durante e após os ciclos de infecção;
- Avaliar o impacto da modulação da população viral no *fitness* replicativo;

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Cultura de células e isolado viral**

Para avaliar a dinâmica adaptativa do SLEV, foram conduzidos ciclos de infecção em cultura celular em uma linhagem celular embrionária de mosquitos da espécie *Aedes aegypti* (Aag2) e linhagem de células epiteliais de macaco Rhesus (LLC-MK2).

As células Aag2 foram cultivadas em meio de cultura Schneider, suplementado com 2mM glutamina, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB), e incubadas em estufa umidificada a 28°C e sem adição de CO<sub>2</sub>. Já a linhagem de mamífero LLC-MK2 foi cultivada em meio DMEM, suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, e mantida em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para a produção do estoque viral inicial e a realização do cálculo de título viral, células renais de macaco verde africano (Vero) foram cultivadas em meio MEM, suplementado com 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino, e mantida em estufa umidificada a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>.

Para realizar os ciclos de infecção, foi utilizada a linhagem viral BeH 355964 do SLEV para os ensaios *in vitro*, fornecida pelo Laboratório de Pesquisa em Virologia (LPV) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto - FAMERP.

### **Ciclo de infecção interhospedeiro *in vitro***

Para isso, células renais de macaco verde africano (Vero) foram cultivadas em garrafas de 75cm<sup>2</sup> até atingir a confluência de 95%. Em seguida, o meio de cultura foi retirado e as células infectadas com o SLEV em um MOI (*Multiplicity of infection*) de 0,1, ou seja, uma partícula viral para cada 10 células, e por 1 hora em estufa à 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após, 10mL de meio de cultura MEM foi adicionado, suplementado com 2% de SFB.

Depois de 120h, a garrafa foi congelada a -80°C, para lise celular e, em seguida, o sobrenadante foi coletado para titulação do vírus liberado e

armazenamento em freezer -80°C. A partir desse estoque viral produzido em Vero, células LLC-MK2 foram infectadas com MOI de 0,1 e, após 120h, o mesmo processo foi realizado: sobrenadante coletado, titulado e armazenado. Após, células Aag2 foram infectadas com vírions provenientes da passagem anterior em LLC-MK2, completando um ciclo de transmissão. Foram realizados cinco ciclos completos, cada um com duas passagens (LLC-MK2 □ Aag2 e LLC-M2 □ Aag2), totalizando dez passagens.

### **Ciclo de infecção intrahospedeiro *in vitro***

Para os ciclos intrahospedeiro, infecções consecutivas nas linhagens LLC-MK2 e Aag2 foram realizadas seguindo o protocolo descrito anteriormente, com a diferença de que o sobrenadante coletado foi usado para infecções consecutivas na mesma linhagem celular, sem a alternância entre as duas linhagens durante o ciclo. Para cada ciclo intrahospedeiro, cinco passagens foram realizadas.

### **Titulação viral por ensaio de formação de placa**

Adaptando o protocolo desenvolvido por Renato Dulbecco (21), primeiramente, o vírus foi titulado em placas de 24 poços com  $10^5$  células Vero por poço no dia anterior ao experimento, para determinar o número de partículas virais infecciosas e, desse modo, produzir o estoque viral.

No dia da titulação, foi feita a diluição serial do estoque viral em meio de cultura MEM sem suplementação, seguindo uma proporção de 1:10. Este processo resultou em 11 diluições. O meio de cultura da placa foi removido, e as células foram então infectadas com as diluições do estoque viral.

Em cada poço, 200µL das respectivas diluições virais foram adicionados em duplicata. A utilização desse menor volume possibilita um maior contato entre o vírus e as células, otimizando o processo de infecção. A placa foi incubada por uma hora em uma estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, sendo agitada a cada cinco minutos para prevenir o ressecamento da monocamada celular e otimizar a adsorção viral.

Após esse período, foi adicionado meio MEM suplementado com 100U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 2% de soro fetal bovino e 2% de carboximetilcelulose (CMC). A incubação continuou por 120 horas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a incubação, o meio de cultura foi removido, e as células foram fixadas com formaldeído a 10% durante 20 minutos. Em seguida, o formaldeído foi retirado, as células fixadas foram lavadas com água para remover resíduos, e, por fim, foram coradas com cristal violeta.

A contagem dos plaques virais foi realizada para determinar o título viral, expresso em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/mL).

### **Identificação e rastreamento das mutações**

Para avaliar a emergência e manutenção de mutações durante o ciclo replicativo do SLEV nos diferentes hospedeiros, o sequenciamento do genoma viral foi realizado antes, entre as diferentes passagens e após o término dos ciclos, o que permitiu avaliar em quais pontos dos múltiplos ciclos mutações surgiram ou se perderam e, no caso das substituições que emergiram, quais foram mantidas. Para isso, uma análise de *deep sequencing* foi realizada. Essa técnica de sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing* - NGS) permite avaliar o surgimento dessas mutações em nível interhospedeiro e, principalmente, em nível intrahospedeiro, detectando a frequência com que essas mutações surgem e são mantidas em uma população circulante dentro de uma mesma amostra.

Após cada passagem, o sobrenadante coletado foi submetido à extração de RNA com o *QIAamp Viral RNA kit* (QIAGEN), seguindo o protocolo do fabricante, para obtenção do RNA genômico do SLEV em cada uma das etapas dos ciclos, e armazenado em freezers -80°C.

A realização do NGS foi feita usando o kit *Illumina COVIDSeq Test*, seguindo o protocolo do fabricante, porém utilizando um *set* de *primers* compatível com o SLEV. A sequência dos primers utilizados nesse procedimento se encontram descritas no Quadro 1. Todo o processo de sequenciamento foi realizado na plataforma MiSeq (Illumina).

Primer Name	Sequence (5'-3')	Primer pool
SLEV_1_LEFT	GGTGAGCGGAGAGGAAACAGAT	1
SLEV_1_RIGHT	GGTCCCTCCTCTCTTCTTGCTT	1
SLEV_2_LEFT	GGAGGGCTGTGGACAAAAGAAC	2
SLEV_2_RIGHT	CACCAACAGTCAATGTCCTCGG	2
SLEV_3_LEFT	TTGTGAGGGCTCTAGATGTGGG	1
SLEV_3_RIGHT	CAGTTGAAGCTGTATGCCGGAG	1
SLEV_4_LEFT	CTGGATATGCCCTAGTTGCGCT	2
SLEV_4_RIGHT	CGCGGTCCACAACATCTCTTTT	2
SLEV_5_LEFT	TTACGAAGCAACCTTGGACACG	1
SLEV_5_RIGHT	GTTCCATACTCGCCCATGTTGG	1
SLEV_6_LEFT	GGACTCTACGTCACATGGCAAT	2
SLEV_6_RIGHT	CAGATGCCCTGATTGCAAGGTT	2
SLEV_7_LEFT	ACTGTAGTAGCCCTAGGATCGC	1
SLEV_7_RIGHT	TAATCTGGGTGGTGCCTCTTCC	1
SLEV_8_LEFT	TTATAAGCACAGGGGGAGCGAA	2
SLEV_8_RIGHT	AGCCAGTAGAGTCAGCGAGATG	2

SLEV_9_LEFT	GGGGAATGTCCTGGATCACACA	1
SLEV_9_RIGHT	AGCTCTCTCTGTATGTTCTCCCAC	1
SLEV_10_LEFT	TTCCCTCTGACTCCAACCTGGAC	2
SLEV_10_RIGHT	ACAATCGAGTGAACACCATGCC	2
SLEV_11_LEFT	TTGTTGATGGACCCGAGACCAA	1
SLEV_11_RIGHT	TCCAGGGTCCTTTTGTCTGTGT	1
SLEV_12_LEFT	GTGGGGTGATGGTGTGTTGAA	2
SLEV_12_RIGHT	GCTACCAGGAGACCAAGTTGGA	2
SLEV_13_LEFT	GGTATGGAATGGAAATCCGGCC	1
SLEV_13_RIGHT	CTGGTTGCTCCACTGCATTCTT	1
SLEV_14_LEFT	TTGCGGAAATGAACACTGGAGG	2
SLEV_14_RIGHT	TGGCCACACTTTCTCTTCTTTCA	2
SLEV_15_LEFT	GACTCCAGGAATGAGGATGGCT	1
SLEV_15_RIGHT	CCCATGTGATGTCTGCTGCTTT	1
SLEV_16_LEFT	TGGTGGTCCCTTTTGCAATAGC	2
SLEV_16_RIGHT	TGGAAAGTGCCCAAATTCCTCT	2
SLEV_17_LEFT	GGCTACTTGGCAAACACTCGAA	1
SLEV_17_RIGHT	ACTCCTGGTGTGTTGTCTGGACAT	1
SLEV_18_LEFT	TCTCGTATGGAGGTCCCTGGAA	2
SLEV_18_RIGHT	TCCCGGATGCAATTCCAGTACT	2
SLEV_19_LEFT	GTTAGTGGCATCATCCAAGGGG	1
SLEV_19_RIGHT	TGAAGTGGGCCTCATCCATGAT	1
SLEV_20_LEFT	TAGTTGACGTGATGTGCCATGC	2
SLEV_20_RIGHT	CGCTTTCCTGCTTTTTGTAGGC	2
SLEV_21_LEFT	ACCGGGTATGAGTGGATCACCA	1
SLEV_21_RIGHT	TCAGTCCAGTTGGCCAGATCAT	1
SLEV_22_LEFT	CAGAGGCCGCATTGGAAGAAAT	2

SLEV_22_RIGHT	ATCCATCCACTTTGGCCTGAGA	2
SLEV_23_LEFT	CCGCTCATGGTGTTTTACAGGA	1
SLEV_23_RIGHT	AACGTACCCATTGACATGACGC	1
SLEV_24_LEFT	GGCAAACAGTAGGGCACACAAA	2
SLEV_24_RIGHT	CAAATCCCACCGATCCAGGTTG	2
SLEV_25_LEFT	ACTGGCTGTCTTCTTGATATGCA	1
SLEV_25_RIGHT	TGATTCCAACACCCTAGCACCA	1
SLEV_26_LEFT	TGCATCCCAAGCTGGTGTACTA	2
SLEV_26_RIGHT	TGCTGACCCTAAGACCCCAAAT	2
SLEV_27_LEFT	AGAAAATGGGTCAAATCCTGCTCA	1
SLEV_27_RIGHT	GGGCTCTGTCTACTTCCACGAT	1
SLEV_28_LEFT	GAGGAGGAAAAGGAGCCACTCT	2
SLEV_28_RIGHT	GGAACACGTCCACTCCACTTTT	2
SLEV_29_LEFT	AAAGGATTCACAAAGGGCGGAC	1
SLEV_29_RIGHT	GCCCCACTAACCCAGTACATCT	1
SLEV_30_LEFT	ACACGCCCAAATCATTGAGAAGT	2
SLEV_30_RIGHT	TCACCATCGAGCTAGCTGATCC	2
SLEV_31_LEFT	AGGGAAGAATACCAACAAACGTGG	1
SLEV_31_RIGHT	GCGCTACTCCACTGATTTTGCT	1
SLEV_32_LEFT	TTGCCCGGGAAAAGAAACCAAG	2
SLEV_32_RIGHT	CCTTTCCCCTCAACTCCTCCAT	2
SLEV_33_LEFT	TTGGTACATGTGGTTGGGAGCT	1
SLEV_33_RIGHT	TGGTGAAGGTGTTCAGGGCATA	1
SLEV_34_LEFT	GTGAAAGTCATGAGACCAGGGC	2
SLEV_34_RIGHT	TTGAAGTGGTGTGAGCAGAAGG	2
SLEV_35_LEFT	TGCACTCCACTTTCTCAACAACA	1
SLEV_35_RIGHT	CACACGGTTCAGACACTCAAC	1

SLEV_36_LEFT	G TTCAGCTGTCCCAGTCAACTG	2
SLEV_36_RIGHT	GCACTCCTCCTACCACATGAGT	2
SLEV_37_LEFT	TCCAATCATGCAGATCCGCAAC	1
SLEV_37_RIGHT	GGCATGTACAGACAGCACCTTT	1
SLEV_38_LEFT	GGATGTCAGGTAAACGGTGCTG	2
SLEV_38_RIGHT	GTTGTTTGC GTTAACGGCAAGG	2

**Quadro 1.** Set de primers. Fonte: Autor.

### Identificação e análise de frequência das mutações

Utilizando os dados obtidos por meio da técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), procedeu-se à reconstrução do genoma do vírus estoque, permitindo a realização de análises comparativas com base no vírus presente no inóculo inicial como ponto de referência.

Os arquivos de sequenciamento foram gerados no formato ".fastq". Para a reconstrução do genoma, empregou-se o software *cutadapt v. 4.4* para a remoção de primers e adaptadores, processo conhecido como trimagem. Posteriormente, os arquivos trimados foram utilizados no software *Spades v 3.15.5* para a montagem dos *scaffolds*. A etapa seguinte envolveu o alinhamento dos *scaffolds* por meio do software *BWA mem*. Utilizando *samtools/IVAR*, foi gerada a sequência consenso do vírus estoque, pela metodologia *De Novo*. O VIRULIGN foi então aplicado para a anotação do genoma, identificando as regiões responsáveis pela codificação de cada proteína viral (21,22,23).

No que diz respeito aos dados provenientes do sequenciamento das amostras dos ciclos interhospedeiro e intrahospedeiro, os passos seguiram uma abordagem semelhante à montagem do genoma de referência. Os arquivos gerados

durante o sequenciamento foram submetidos à trimagem por meio do software *cutadapt 4.4*, seguido do alinhamento com o genoma de referência (vírus estoque) usando *BWA mem*. Utilizando o software *samtools/ivar variants*, foram identificados os SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único), gerando um arquivo ".csv" contendo todos os dados das variantes virais, assim como a variação de frequência de cada um dos SNPs detectados em cada uma das etapas dos ciclos de infecção (21,22).

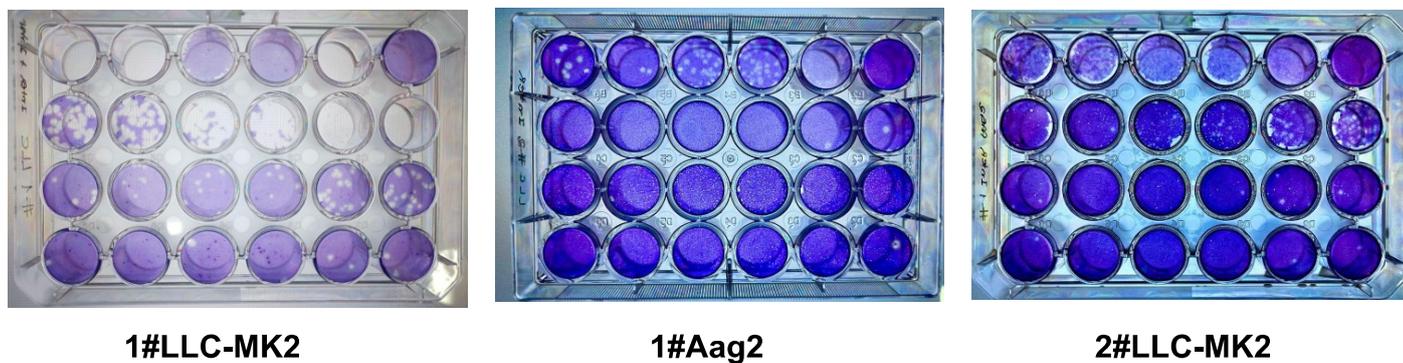
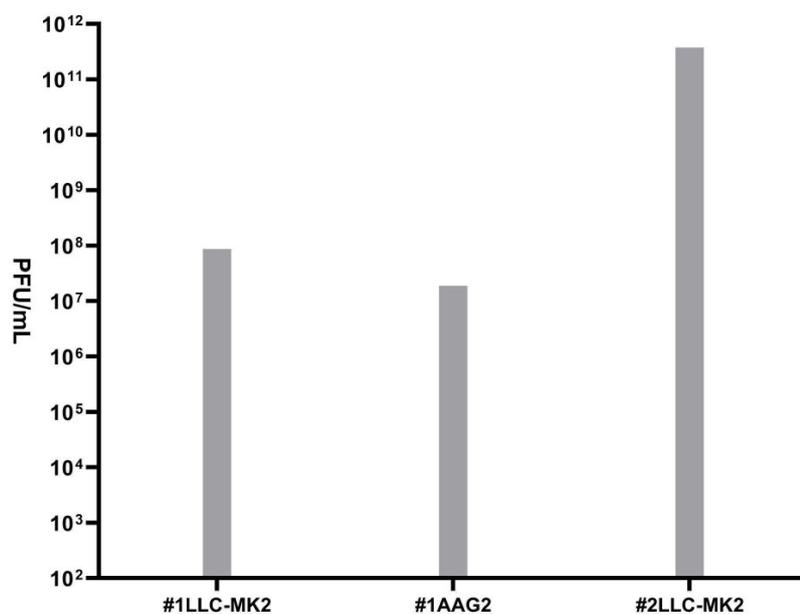
Os resultados e gráficos foram então gerados por meio do Rstudio e do GraphPad Prism 8.

## RESULTADOS

### Ensaio de titulação para análise do *fitness* replicativo

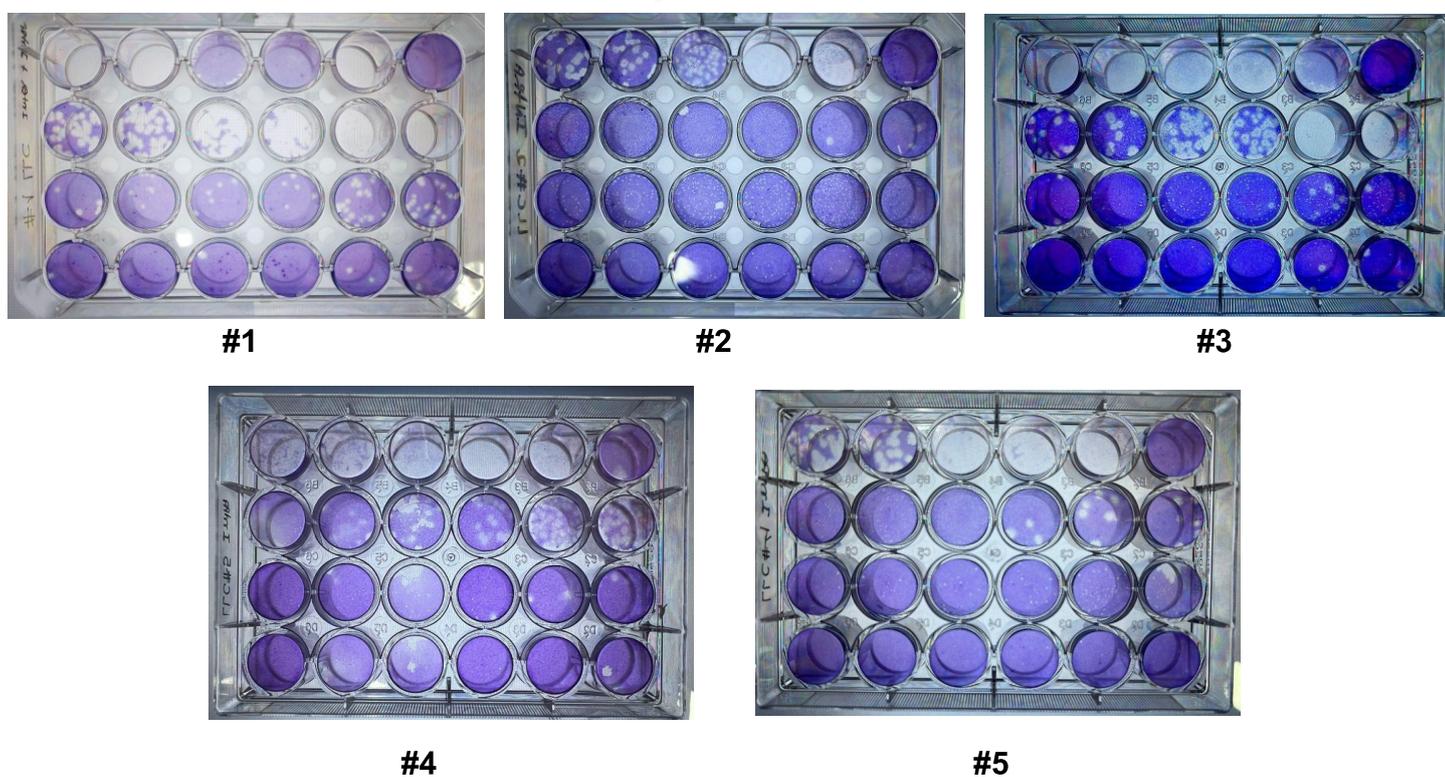
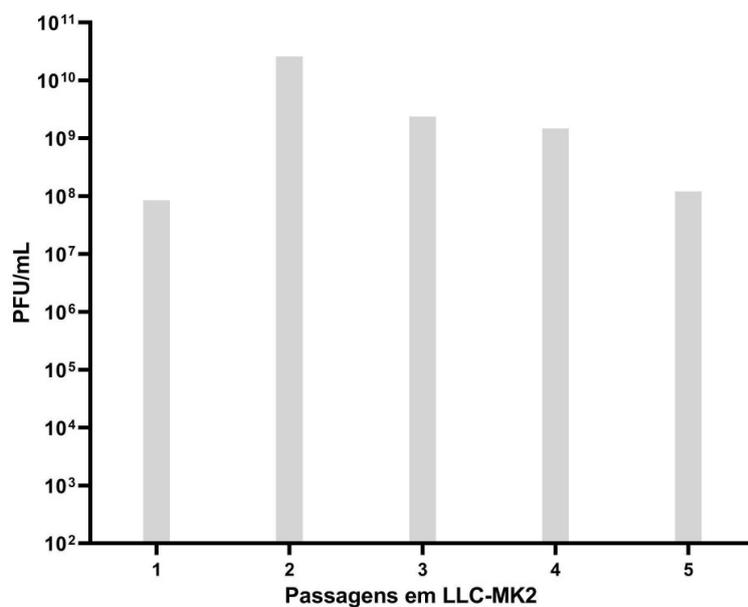
Os ensaios em ciclo interhospedeiro foram realizados até a segunda passagem em células LLC-MK2, não prosseguindo a partir da segunda passagem em Aag2, que não demonstrou efeito citopático, dessa forma não sendo possível continuar com a premissa inicial de realizar dez passagens intercaladas entre as duas linhagens. Titulações em Aag2 e LLC-MK2 em paralelo foram feitas para identificar se a falta do efeito citopático foi causado pela especialização da cepa quanto a célula de mamífero, porém não houve resposta positiva em nenhuma das placas, evidenciando que a perda de infectividade foi para ambas as linhagens.

O título se manteve em  $10^7$  na primeira passagem nas duas linhagens, tendo uma elevação para a casa do  $10^{11}$  na segunda passagem em células de mamíferos. Foi observada, morfológicamente, uma redução no tamanho dos plaques a partir da segunda titulação da primeira passagem em Aag2, tendo dois plaques de diâmetros diferentes até a última passagem. Possivelmente, esta mudança ocorreu devido a alteração da população viral.



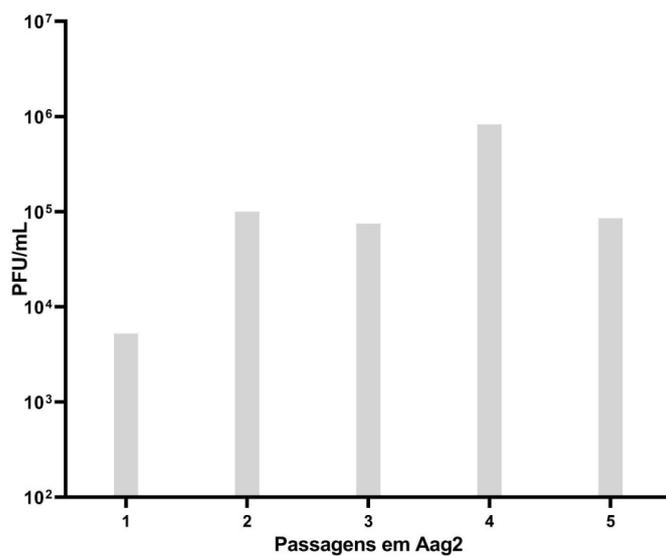
**Figura 5.** Titulação do SLEV durante o ciclo interhospedeiro. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registro fotográfico da titulações e morfologia dos plaques virais.

Em referência ao ciclo intrahospedeiro em células LLC-MK2, a primeira passagem obteve um título de  $10^7$ , demonstrando um aumento de três logs na segunda passagem, a queda de umlog na passagem seguinte, que foi mantida por mais uma, e outra na última, finalizando o ciclo em  $10^8$ . Assim como no ciclo interhospedeiro, houve uma mudança na morfologia dos plaques a partir da segunda passagem, em que o plaque menor foi detectado, mantendo-se heterogênea até a última. Diferentemente do ciclo interhospedeiro, não houve perda de infectividade.

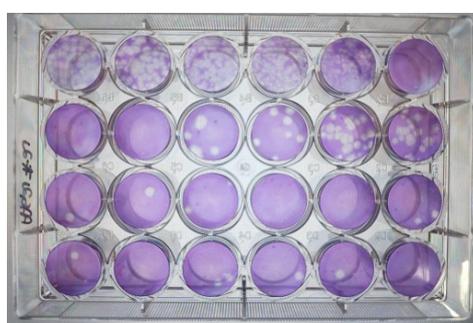


**Figura 6.** Titulação do SLEV durante o ciclo intrahospedeiro em LLC-MK2. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registo fotográfico das titulações e morfologia dos plaques virais.

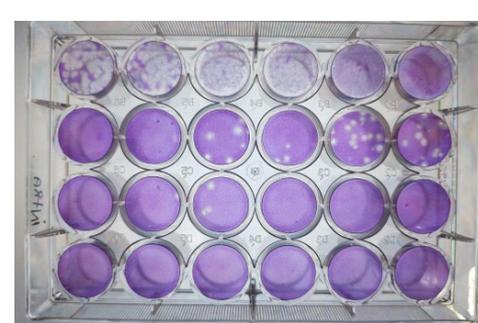
Por fim, no ciclo intrahospedeiro em Aag2 o título inicial foi de  $10^3$ , enquanto as quatro passagens seguintes flutuaram entre  $10^4$  e  $10^5$ , terminando o ciclo na casa do  $10^4$ . Não houve mudanças na morfologia dos plaques como nos outros dois ciclos, não demonstrando redução do diâmetro.



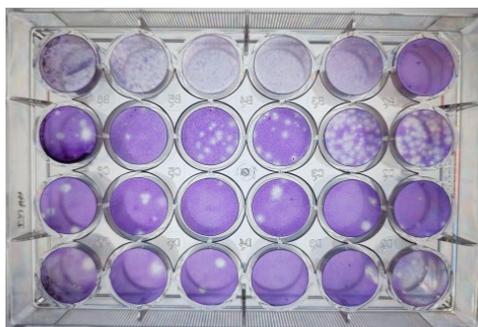
1#



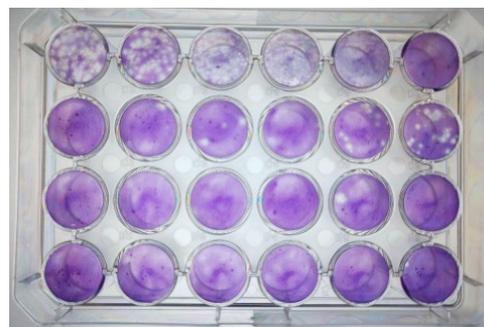
2#



3#



4#



5#

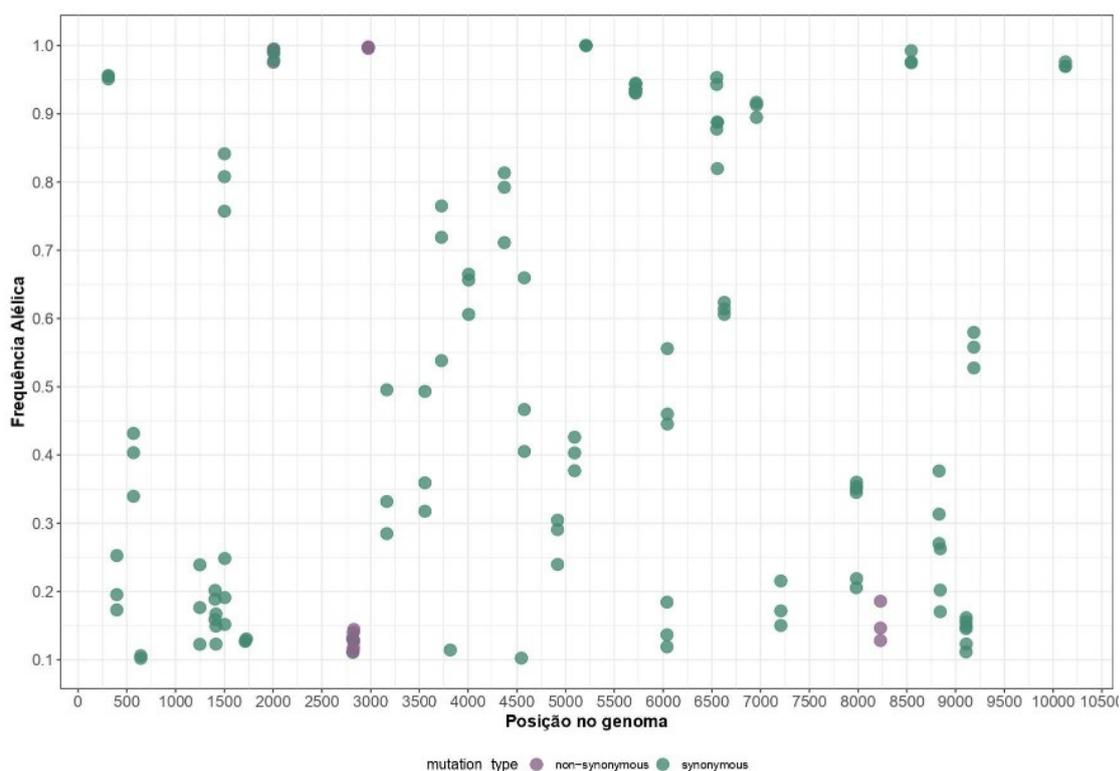
**Figura 7.** Titulação do SLEV durante o ciclo intrahospedeiro em Aag2. A) Gráfico dos valores em PFU/mL. B) Registro fotográfico das titulações e morfologia dos plaques virais.

### **Análises de sequenciamento para detecção de variantes virais**

A partir do sequenciamento, utilizado o *cutoff* de 0.1 para avaliar a frequência alélica (considerando somente substituições detectadas com frequência maior que 10%), foram identificados 57 SNPs entre os três ciclos, os quais, em sua maioria,

apresentaram alta frequência em comparação com o genoma referência. Em sua grande maioria, as mutações não apresentaram alterações de frequência, se mantendo estáveis ao longo de todas as passagens. Entretanto, algumas mutações nitidamente foram selecionadas durante os ciclos, alterando sua frequência de forma considerável no decorrer das infecções..

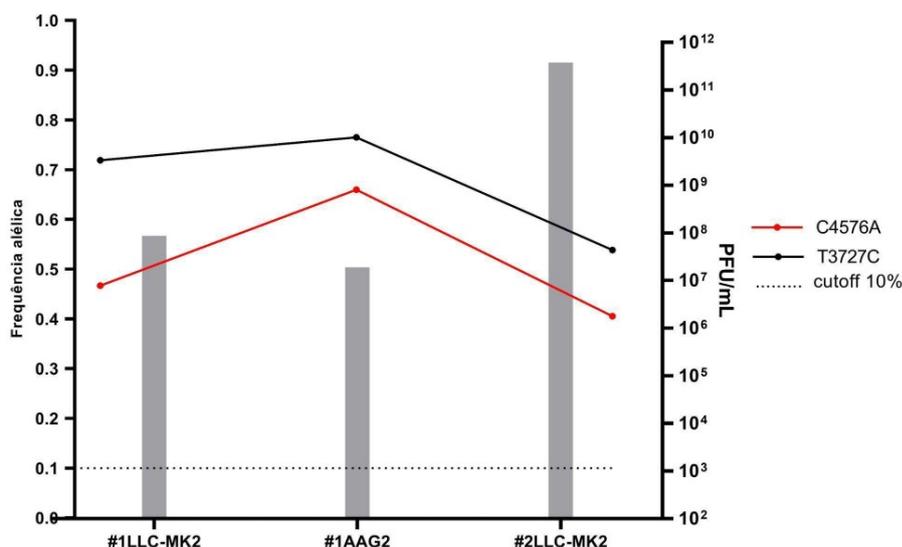
De maneira geral, pode-se notar que mais da metade desses SNPs são sinônimos e estão localizados em regiões de proteínas não estruturais (Figura 8). Três dessas mutações são compartilhadas entre os ciclos intrahospedeiro em LLC-MK2 e interhospedeiro, enquanto uma é compartilhada entre os ciclos intrahospedeiro em Aag2 e interhospedeiro. Três são exclusivas do ciclo realizado em LLC-MK2, uma do ciclo interhospedeiro, e quatro do ciclo intrahospedeiro Aag2.



**Figura 8.** Frequência geral das mutações, em todos os ciclos. Os círculos roxos representam as mutações não sinônimas, enquanto que os verdes representam as sinônimas.

No ciclo interhospedeiro, as mutações sinônimas T3727C e C4576A, nas proteínas não estruturais NS2a e NS2b, respectivamente, se fixaram na população

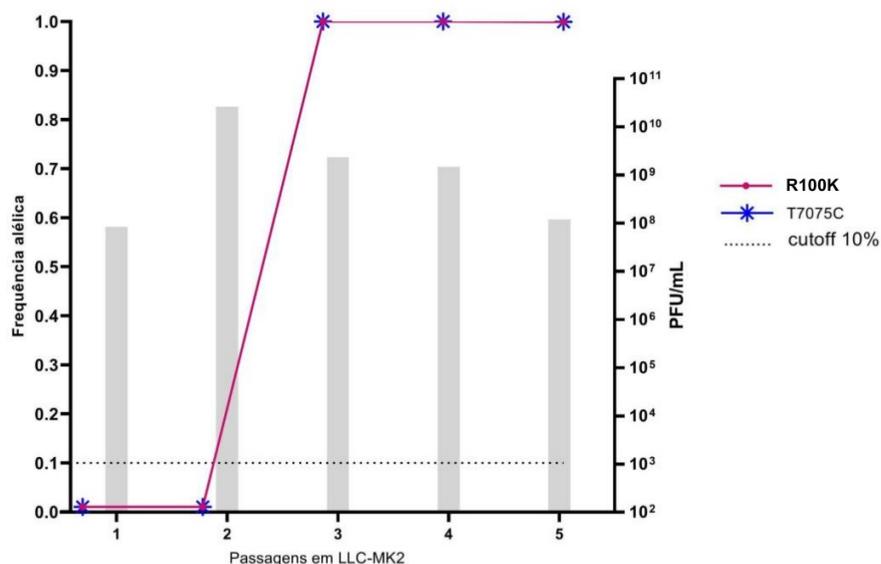
logo na primeira passagem, apresentando uma oscilação significativa na frequência entre as passagens, variando entre 70% e 30%. Coincidentemente, ambas apresentaram queda de frequência na última passagem realizada. As demais não apresentaram mudanças significativas na frequência, ficando perto do *cutoff* de 10% ou abaixo.



**Figura 9.** Frequência das mutações no ciclo interhospedeiro e título viral em cada passagem. Em destaque as substituições que apresentaram maior modulação em suas frequências.

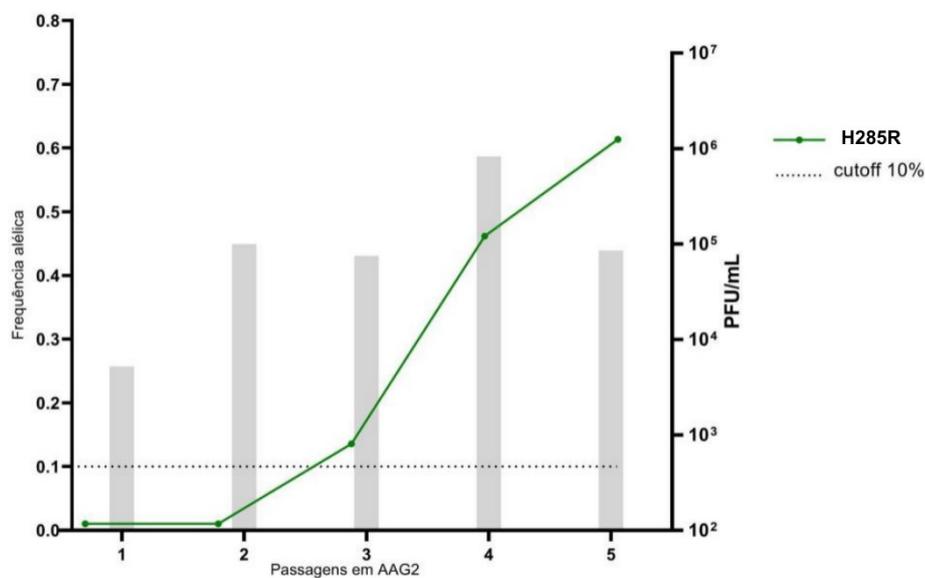
No ciclo intrahospedeiro na linhagem celular LLC-MK2, as mutações R100K e T7075C, nas proteínas não estruturais NS1 e NS4B, respectivamente, se fixaram na população, apresentando uma frequência significativa entre as passagens. Foi observado que as ambas, inicialmente, presentes abaixo do limite de 10%, tornaram-se fixas na população a partir da terceira passagem, mantendo uma prevalência de 99%.

Diferente do ciclo anterior, em que os dois SNPs com maior alteração de frequência eram do tipo sinônimos, a mutação R100K mostrou ser não sinônima.



**Figura 10.** Frequência das mutações no ciclo intrahospedeiro em LLC-MK2, e título viral em cada passagem. Em destaque as substituições que apresentaram maior modulação em suas frequências.

No ciclo intrahospedeiro na linhagem celular Aag2, a mutação H285R não sinônima, na proteína E do envelope, se fixou na população com uma frequência diferente das demais, saindo de uma frequência abaixo dos 10% e subindo a partir da terceira passagem, chegando a 61% na última passagem.



**Figura 11.** Frequência das mutações no ciclo intrahospedeiro em Aag2, e título viral em cada passagem. Em destaque as substituições que apresentaram maior modulação em suas frequências.

## DISCUSSÃO

A partir dos achados apresentados neste estudo foi possível avaliar o comportamento do SLEV a nível inter e intrahospedeiro em cultura de células, mimetizando a adaptação do vírus em vertebrados e artrópodes durante os ciclos de transmissão.

A partir da hipótese de que os ciclos alternados garantem maior adaptabilidade entre os hospedeiros, visto que têm como finalidade garantir que o vírus continue circulando na natureza ativamente, foi possível concluir que, no presente estudo, os resultados mostraram uma negativa quanto a este pressuposto, uma vez que o efeito citopático não foi mais visto ao passá-lo em células de mosquito, o que conclui-se como a extinção do vírus ou a redução da carga viral ao ponto de não conseguir mais produzir um plaque, mesmo mostrando, antes, um aumento no título entre as infecções. Muito provavelmente, esse resultado pode ser explicado pelas linhagens celulares utilizadas no ciclo de infecção interhospedeiro. Células Aag2 são provenientes de *Aedes aegypti*, que conhecidamente não é o principal vetor de transmissão do SLEV. Além disso, a linhagem LLC-MK2 é proveniente de primatas, e é descrito na literatura que os primatas, assim como os humanos, são hospedeiros “sem saída” (*Dead-end*) para o SLEV, assim como equinos e humanos são para WNV e JEV, respectivamente. Dessa forma, acredita-se que a alternância entre essas linhagens tenha imposto uma pressão seletiva muito forte, de forma a interromper o ciclo de infecção, funcionando como um ciclo *Dead-end* (1, 24).

Muitos estudos mostram como os ciclos alternados restringem a virulência em comparação com os ciclos seriados, como visto por Taylor e colaboradores (26), em que o ciclo alternado *in vivo* entre *Ae. aegypti* e camundongos não exibiu um

aumento na infectividade do RRV como nos ciclos consecutivos em um mesmo hospedeiro, que se mostraram maiores quando infectadas com cepas especializadas para cada linhagem. Em outro estudo, porém *in vitro*, por Vasilakis e colaboradores (27), também foi concluído que as passagens alternadas entre células de hepatocarcinoma celular humano (Huh-7) e linhagem larval de *Aedes albopictus* (C6/36) para o DENV não tiveram a mesma infectividade como nas passagens consecutivas em que cepas especializadas foram usadas.

Contudo, existem cenários contrários ao descrito acima, como apresentado por Coffey (28) e colaboradores, os quais mostraram como o VEEV se comportou *in vitro* e *in vivo* entre camundongos e *Aedes aegypti*, evidenciando a estabilidade viral do ciclo alternado *in vivo*, e a queda da aptidão no ciclo intrahospedeiro *in vitro*, resultado esse que corrobora com os dados aqui apresentados para as passagens consecutivas na linhagem LLC-MK2.

Divergindo do ciclo interhospedeiro, as passagens consecutivas em células de mamíferos tiveram uma queda a partir da segunda passagem, caindo consecutivamente até a última, assim como visto para o VEEV. Contudo, diferente do SLEV, o VEEV apresentou tal alteração devido a adaptação do vírus ao sulfato de heparano, enquanto que o motivo pelo qual o SLEV apresentou o mesmo padrão ainda precisa ser investigado (28,29).

De forma comparativa, apesar da queda, as passagens consecutivas em LLC-MK2 continuaram acima dos títulos apresentados nas passagens consecutivas em Aag2, que mostram uma flutuação maior entre os títulos virais, com plaques homogêneos. Partindo do pressuposto da competência vetorial, visto que o SLEV não tem como vetor principal o *Aedes aegypti*, mas outros *Orthoflavivirus* sim, e por esta linhagem possuir a via do iRNA ativa, supõe-se que essa queda na aptidão foi

freada, mas não suprimida por completo apontando a permissividade e susceptibilidade à infecção por SLEV pela linhagem Aag2, assim como a modulação da população viral a partir da seleção de uma mutação não-sinônima durante esse processo.

Diante dos três cenários apresentados, também é perceptível uma variação na morfologia dos plaques virais em dois ciclos, ambos iniciados com a inoculação do vírus em células de mamíferos. No ciclo interhospedeiro, após a primeira infecção em células LLC-MK2, em que inicialmente havia apenas um fenótipo de plaque, notou-se o surgimento de um segundo tipo de morfologia. Essa distinção persistiu ao longo das passagens subsequentes. No ciclo intrahospedeiro em células de mamífero, foi igualmente evidenciada a presença das duas morfologias distintas, iniciando-se após a primeira passagem e mantendo-se coexistentes até a última titulação. Esse padrão de diferenciação morfológica no plaque viral é uma alteração fenotípica diretamente relacionada com alterações genotípicas, sendo notável não apenas aqui, mas também em contextos aplicados a outros *Orthoflavivirus*, como nas cepas vacinais de YFV, onde é possível observar, na cepa vacinal 17-DD do YFV, duas morfologias distintas de plaque viral, com maior e menor diâmetro. Nesse caso, a cepa 17-DD é notavelmente conhecida por sua característica atenuada, o que pode estar relacionado com essas alterações fenotípicas. No caso do SLEV, não se sabe se essa mudança fenotípica pode caracterizar uma atenuação do vírus, uma vez que a diminuição do plaque não garante, obrigatoriamente, menor virulência, porém, em cenários futuros de caracterização biológica, pode ser um indicativo de atenuação viral que, na melhor das hipóteses, poderá ser utilizada para a produção de uma vacina atenuada (30,31).

Em outro estudo com SLEV, porém *in vivo*, em que linhagens de *Culex mosquitoes pipiens* e galinhas foram submetidas a passagens seriadas, a tendência de mudanças na morfologia do plaque viral após titulação em células Vero também foi observada, demonstrando um aumento do plaque durante as passagens em vertebrados, e uma modesta redução no tamanho do plaque quanto as passagens em mosquitos, conformando uma heterogeneidade em todas as placas (32).

Levando em conta o número de mutações sinônimas encontradas, em que entre as 57 identificadas, 47 são sinônimas e estão fixadas na população em altas frequências, sugere-se que, possivelmente, o uso do *codon bias* pelo vírus aconteça. Entretanto, observou-se que nos ciclos intra em LLC-MK2 e inter essas seleção de nucleotídeos não foi vantajosa, uma vez que a aptidão diminui. Uma hipótese para explicar a ocorrência desse fenômeno pode ser o fato de que, apesar do *codon bias* possivelmente ocorrer no SLEV, essas alterações nucleotídicas, sem mudança de aminoácidos, proporcionam grande impacto nas estruturas secundárias do RNA, o que poderia influenciar negativamente no *fitness* replicativo do SLEV. Esse processo já foi descrito para DENV-2, porém, com um impacto reduzido, visto que as estruturas secundárias de RNA são bem mais conservadas nesse vírus, e em ZIKV. Isso evidencia como o vírus pode selecionar os nucleotídeos em decorrência da pressão seletiva exercida, mesmo que haja impacto negativo na replicação, priorizando a correspondência dos códons com os do hospedeiro para otimizar a tradução e síntese de proteínas virais (33,34).

Em relação aos aminoácidos, para a passagem intra em linhagem de vertebrados, foi possível notar que a frequência de NS1:R100K e NS4B:T7075C tiveram uma diferença em relação aos demais, saindo de uma frequência abaixo de 10% para quase 100% em todas as passagens a partir da terceira. Na primeira,

sendo uma mutação não sinônima, houve uma alteração de arginina (R) para lisina (K), enquanto na segunda, sendo uma mutação sinônima, aconteceu uma alteração de timina (T) para uma citosina (C). Nota-se que a R100K é única para este ciclo, e aparece a partir da terceira passagem, que já demonstra queda do título e mudanças morfológicas do plaque. Sabe-se que mudanças a nível de aminoácidos na proteína NS1 podem reduzir sua estrutura, funcionalidade e até mudanças fenotípicas no plaque viral. Em relação a NS4B, um estudo *in vivo* considerou que uma mutação nessa proteína não estrutural foi a responsável pela atenuação do JEV em ratos, uma vez que sua neurovirulência caiu drasticamente. Esses dados da literatura podem sugerir que, no caso do observado para o SLEV em nosso estudo, uma possível relação exista entre as mutações observadas com o que foi descrito anteriormente em relação a uma possível atenuação advinda dos plaque pequenos (35,36).

No ciclo intrahospedeiro em artrópodes, foi visto um aumento de frequência principalmente em E:H285R, uma mutação não sinônima, que saiu de uma frequência abaixo de 10%, atingindo mais de 60% e fez a troca de uma histidina (H) para uma arginina (R). Mutações na proteína de envelope podem, em sua maioria, afetar a virulência e o tropismo viral em determinados hospedeiros, como visto para o ZIKV, em que mutações no domínio III (EDIII) afetaram diretamente no tropismo em células de mamíferos, porém não nas de mosquito. Em nossos dados, não foi vista tal alteração, apenas a flutuação do título na linhagem Aag2. O fato da frequência ter aumentado conforme as passagens pode sugerir que, com um prolongamento do ciclo de infecção intrahospedeiro, talvez fosse possível ver uma mudança mais acentuada no *fitness* viral em passagens subsequentes às 5 realizadas em nosso estudo (37).

Por último, o ciclo interhospedeiro apresentou em maiores mudanças de frequência NS2A:T3727C e NS2A:C4576A, com mudanças, respectivamente, de timina (T) para citosina (C) e citosina (C) para adenina (A), ambas sinônimas. Foi visto que as duas tiveram um aumento em células de mamífero e uma redução nas células de mosquito. Entretanto, para Rossi e colaboradores, as células Vero, BHK e Huh7, em ciclos *in vitro* com WNV, sofreram uma redução no título. Levando em consideração que a LLC-MK2 possui a via de interferon ativa, diferente das 3 apresentadas por Rossi, e a Aag2 possui o iRNA ativo, a linhagem LLC-MK2 provavelmente impôs uma seleção positiva dessas mutações, que em linhagem de artrópodes, possivelmente devido ao diferente mecanismo de resposta imune, apresentaram uma redução na frequência (38).

## **CONCLUSÃO**

O estudo proporcionou uma análise abrangente da diversidade populacional e da dinâmica adaptativa do vírus SLEV em diversos hospedeiros. As pressões seletivas, particularmente evidentes em células de mamíferos, desempenharam um papel fundamental nas mudanças na população viral, tanto em nível genotípico como em nível fenotípico também. O monitoramento das mutações ao longo dos ciclos de infecção revelou claramente indícios de um impacto biológico resultante dessas alterações, à medida que sua frequência aumentava e se estabilizava na população, ressaltando tanto a plasticidade genética viral quanto a atuação do ambiente celular na adaptação do vírus. Os resultados obtidos indicam que a interação entre o vírus e seus hospedeiros modula fortemente a evolução do SLEV, e esse fator está diretamente relacionado com a quebra de barreiras seletivas e infecção de novos hospedeiros e vetores, fator esse de grande preocupação do ponto de vista epidemiológico e de saúde pública.

## REFERÊNCIAS

1. LOPES, Nayara; NOZAWA, Carlos; LINHARES, Rosa Elisa Carvalho. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude, Ananindeua*, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014. Disponível em <[http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2176-62232014000300055&lng=pt&nrm=iso](http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300055&lng=pt&nrm=iso)>. acessos em 07 fev. 2024. <http://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232014000300007>.
2. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C. Come fly with me: review of clinically important arboviruses for global travelers. *J Clin Virol*. 2012 Nov;55(3):191-203. doi: 10.1016/j.jcv.2012.07.004. Epub 2012 Jul 25. Erratum in: *J Clin Virol*. 2013 Jan;56(1):89-91. PMID: 22840968.
3. Figueiredo LT. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect*. 2000;2(13):1643-1649. doi:10.1016/s1286-4579(00)01320-4.
4. Calisher CH, Karabatsos N, Monath TP. The arboviruses: epidemiology and ecology. CRC. 1988;19–57.
5. Lima-Camara TN. Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil. *Rev Saude Publica*. 2016;50:36
6. Chamberlain RW. History of St. Louis encephalitis. In: Monath TP, editor. *St. Louis encephalitis*. Washington (DC): American Public Health Association; 1980. p. 680.
7. Diaz A, Coffey LL, Burkett-Cadena N, et al. Reemergence of St. Louis Encephalitis Virus in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*. 2018;24(12):2150-2157. doi:10.3201/eid2412.180372.
8. Swetnam, D.M., et al., *Movement of St. Louis encephalitis virus in the Western United States, 2014- 2018*. *PLoS Negl Trop Dis*, 2020. **14**(6): p. e0008343.

9. Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol.* 2020 Jun;5(6):796-812. doi: 10.1038/s41564-020-0714-0. Epub 2020 May 4. PMID: 32367055; PMCID: PMC7696730.
10. Pinheiro FP, LeDuc JW, Travassos da Rosa AP, Leite OF. Isolation of St. Louis encephalitis virus from a patient in Belém, Brazil. *Am J Trop Med Hyg.* 1981;30(1):145-148. doi:10.4269/ajtmh.1981.30.145.
11. Mondini A, Bronzoni RV, Cardeal IL, et al. Simultaneous infection by DENV-3 and SLEV in Brazil. *J Clin Virol.* 2007;40(1):84-86. doi:10.1016/j.jcv.2007.06.007.
12. Maia FG, Chávez JH, de Souza WM, et al. Infection with Saint Louis encephalitis virus in the city of Ribeirao Preto, Brazil: report of one case. *Int J Infect Dis.* 2014;26:96-97. doi:10.1016/j.ijid.2014.05.018.
13. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: World Health Organization; 2009. 4, LABORATORY DIAGNOSIS AND DIAGNOSTIC TESTS. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143156/>
14. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: World Health Organization; 2009. 3, VECTOR MANAGEMENT AND DELIVERY OF VECTOR CONTROL SERVICES. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143163/>
15. Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: World Health Organization; 2009. 2, CLINICAL MANAGEMENT AND DELIVERY OF CLINICAL SERVICES. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK143161/>
16. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Barreiras teciduais à infecção por arbovírus em mosquitos. *Vírus* . 2015; 7(7):3741-3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
17. Amaral, R. J. V.; Dansa-Petretski, M. 2012. Capítulo 14: Interação PatógenoVetor: Dengue. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular: Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular. INCT-EM. UFRJ. Disponível em: <http://www.inctem.bioqmed.ufrj.br/index.php/pt/biblioteca/124-topicos-avancados>

-em-entomologia-molecular-instituto-nacional-de-ciencia-e-tecnologia-em-entomologia-molecular . Acesso em: 12/12/2023.

18. Li MJ, Lan CJ, Gao HT, Xing D, Gu ZY, Su D, Zhao TY, Yang HY, Li CX. Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* Aag2 cells in response to dengue virus-2 infection. *Parasit Vectors*. 2020 Aug 17;13(1):421. doi: 10.1186/s13071-020-04294-w. PMID: 32807211; PMCID: PMC7433057.
19. Nanaware N, Banerjee A, Mullick Bagchi S, Bagchi P, Mukherjee A. Infecção pelo vírus da dengue: uma história de explorações virais e respostas do hospedeiro. *Virus* . 2021; 13(10):1967. <https://doi.org/10.3390/v13101967>.
20. Teo A, Tan HD, Loy T, Chia PY, Chua CLL. Understanding antibody-dependent enhancement in dengue: Are afucosylated IgG1s a concern? *PLoS Pathog*. 2023 Mar 30;19(3):e1011223. doi: 10.1371/journal.ppat.1011223. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2023 Oct 18;19(10):e1011736. PMID: 36996026; PMCID: PMC10062565.
21. Dulbecco R. Production of Plaques in Monolayer Tissue Cultures by Single Particles of an Animal Virus. *Proc Natl Acad Sci [Internet]*. 1952 Aug;38(8):747–52. Available from: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.38.8.747>
22. Martin M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal [Internet]*. 2011 May 2;17(1):10. Available from: <http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>
23. Prjibelski A, Antipov D, Meleshko D, Lapidus A, Korobeynikov A. Using SPAdes De Novo Assembler. *Curr Protoc Bioinforma [Internet]*. 2020 Jun 19;70(1). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cpbi.102>.
24. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows– Wheeler transform. *Bioinformatics [Internet]*. 2009 Jul 15;25(14):1754–60. Available from: <https://academic.oup.com/bioinformatics/article/25/14/1754/225615>.
25. SCHERER WF, BUESCHER EL. Ecologic studies of Japanese encephalitis firus in Japan. I. Introduction. *Am J Trop Med Hyg*. 1959 Nov;8:644-50. doi: 10.4269/ajtmh.1959.8.644. PMID: 14442653.

26. Taylor WP, Marshall ID. Adaptation studies with Ross River virus: laboratory mice and cell cultures. *J Gen Virol*. 1975;28(1):59-72. doi:10.1099/0022-1317-28-1-59.
27. Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog*. 2009 Jun;5(6):e1000467. doi: 10.1371/journal.ppat.1000467. Epub 2009 Jun 5. PMID: 19503824; PMCID: PMC2685980.
28. Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 May 13;105(19):6970-5. doi: 10.1073/pnas.0712130105. Epub 2008 May 5. PMID: 18458341; PMCID: PMC2383930.
29. Bernard KA, Klimstra WB, Johnston RE. Mutations in the E2 glycoprotein of Venezuelan equine encephalitis virus confer heparan sulfate interaction, low morbidity, and rapid clearance from blood of mice. *Virology*. 2000;276:93–103.
30. Marchevsky RS, Mariano J, Ferreira VS, et al. Phenotypic analysis of yellow fever virus derived from complementary DNA. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;52(1):75-80. doi:10.4269/ajtmh.1995.52.75.
31. Freire MS, Mann GF, Marchevsky RS, et al. Production of yellow fever 17DD vaccine virus in primary culture of chicken embryo fibroblasts: yields, thermo and genetic stability, attenuation and immunogenicity. *Vaccine*. 2005;23(19):2501-2512. doi:10.1016/j.vaccine.2004.10.035
32. Ciota AT, Jia Y, Payne AF, Jerzak G, Davis LJ, Young DS, Ehrbar D, Kramer LD. Experimental passage of St. Louis encephalitis virus in vivo in mosquitoes and chickens reveals evolutionarily significant virus characteristics. *PLoS One*. 2009 Nov 17;4(11):e7876. doi: 10.1371/journal.pone.0007876. Erratum in: *PLoS One*. 2010;5(1). doi: 10.1371/annotation/8e335f18-47c3-4748-b6b7-acca14f94e5c. PMID: 19924238; PMCID: PMC2773414.
33. Goz E, Tuller T. Widespread signatures of local mRNA folding structure selection in four Dengue virus serotypes. *BMC Genomics*. 2015;16 Suppl 10(Suppl 10):S4. doi:

10.1186/1471-2164-16-S10-S4. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26449467; PMCID: PMC4602183.

34. Cristina J, Fajardo A, Soñora M, Moratorio G, Musto H. A detailed comparative analysis of codon usage bias in Zika virus. *Virus Res.* 2016 Sep 2;223:147-52. doi: 10.1016/j.virusres.2016.06.022. Epub 2016 Jul 19. PMID: 27449601.
35. Heise MT, Simpson DA, Johnston RE. A single amino acid change in nsP1 attenuates neurovirulence of the Sindbis-group alphavirus S.A.AR86. *J Virol.* 2000 May;74(9):4207-13. doi: 10.1128/jvi.74.9.4207-4213.2000. PMID: 10756033; PMCID: PMC111935.
36. Kümmerer BM, Rice CM. Mutations in the yellow fever virus nonstructural protein NS2A selectively block production of infectious particles. *J Virol.* 2002 May;76(10):4773-84. doi: 10.1128/jvi.76.10.4773-4784.2002. PMID: 11967294; PMCID: PMC136122.
37. Jaimipuk T, Sachdev S, Yoksan S, Thepparit C. A Small-Plaque Isolate of the Zika Virus with Envelope Domain III Mutations Affect Viral Entry and Replication in Mammalian but Not Mosquito Cells. *Viruses.* 2022 Feb 26;14(3):480. doi: 10.3390/v14030480. PMID: 35336887; PMCID: PMC8954177.
38. Rossi SL, Fayzulin R, Dewsbury N, Bourne N, Mason PW. Mutations in West Nile virus nonstructural proteins that facilitate replicon persistence in vitro attenuate virus replication in vitro and in vivo. *Virology.* 2007 Jul 20;364(1):184-95. doi: 10.1016/j.virol.2007.02.009. Epub 2007 Mar 23. PMID: 17382364.

