

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

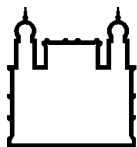
CÁSSIA DA SILVA SANTOS ROCHA

**ALTERAÇÕES MIOGÊNICAS EM CÉLULAS MUSCULARES HUMANAS
INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA: SUSCEPTIBILIDADE DE MIOBLASTOS E
RESISTÊNCIA DE MIOTUBOS**

Orientadores: Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2021



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CÁSSIA DA SILVA SANTOS ROCHA

**ALTERAÇÕES MIOGÊNICAS EM CÉLULAS MUSCULARES HUMANAS
INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA: SUSCEPTIBILIDADE DE MIOBLASTOS E
RESISTÊNCIA DE MIOTUBOS**

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientadores: Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

RIO DE JANEIRO

2021

i

Rocha, Cássia da Silva Santos.

Alterações miogênicas em células musculares humanas infectadas pelo vírus zika: Susceptibilidade de mioblastos e resistência de miotubos / Cássia da Silva Santos Rocha. - Rio de Janeiro, 2021.

135 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2021.

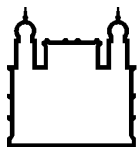
Orientador: Ingo Riederer.

Co-orientador: Dumith Chequer Bou-Habib.

Bibliografia: f. 66-76

1. Mioblastos. 2. Miotubos. 3. Zika. 4. Matriz extracelular. I. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/Icict/Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Igor Falce Dias de Lima - CRB-7/6930.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

CÁSSIA DA SILVA SANTOS ROCHA

ALTERAÇÕES MIOGÊNICAS EM CÉLULAS MUSCULARES HUMANAS INFECTADAS PELO VÍRUS ZIKA: SUSCEPTIBILIDADE DE MIOBLASTOS E RESISTÊNCIA DE MIOTUBOS

ORIENTADORES: Prof. Dr. Ingo Riederer
Prof. Dr. Dumith Chequer Bou-Habib

Aprovada em: 10/09/2021

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Gonzalo Bello Bentacor/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ- Presidente

Prof. Dr. Claudia dos Santos Mermelstein/ Universidade Federal do Rio de Janeiro, RJ

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos/ Instituto Fernandes Figueira, RJ

Prof. Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ

Prof. Dr. Daniel Pedra Adesse/ Instituto Oswaldo Cruz, RJ

Rio de Janeiro, 10 de setembro de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família pelo carinho, apoio e confiança, que foi essencial para a concretização dessa etapa.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus que permitiu alcançar essa etapa tão importante na minha vida, minha fé me permite dizer que a ciência é uma das grandes maravilhas que Ele criou.

Agradeço a minha família, com imenso orgulho meus pais, Genice Rocha e Carlos Alberto Rocha, meu filho Pedro Henrique, que sempre estiveram ao meu lado durante essa trajetória.

Agradeço ao meu orientador Dr. Ingo Riederer pela oportunidade, paciência, por exercer com muito zelo seu papel na orientação, compartilhando seu conhecimento, e sempre disponível para discussões de resultados e experimentos. Sou muito grata por todo aprendizado nesses anos.

Agradeço ao meu segundo orientador Dr. Dumith Chequer, por toda dedicação e disponibilidade para discussões de resultados e experimentos. Tenho muito a agradecer por tudo que aprendi nesse período.

Agradeço a Dr^a Daniella Arêas Mendes-da-Cruz, que foi minha orientadora durante o primeiro ano do mestrado, e ainda continua contribuindo com seu imenso conhecimento, muito obrigada.

Com imenso carinho, agradeço ao grupo “Inguetes” por me acolher tão bem e contribuir cientificamente para o meu trabalho. Em especial, Mariela Gonzalez que me acompanhou dentro e fora da bancada, sua luz incrível contribuiu para transformar dias difíceis em aprendizado e esperança para dias melhores! Rafaella Reis, Aline Processi, Arnon Jurberg, Samuel Horita, Thayná Dias, Igor, muito obrigada por tudo!

Agradeço ao grupo “Dumith’s” por todas as discussões e contribuição científica.

Agradeço aos integrantes e amigos do Laboratório de Pesquisas sobre o Timo, o querido LPT, que tornam os dias de trabalho mais agradáveis, é uma honra fazer parte dessa equipe! Em especial, agradeço a Carolina Messias e Jairo Temerozo pela contribuição intelectual e

ajuda nos experimentos. Agradeço ao João Ortigão pela imensa ajuda com o transcriptoma e noções de bioinformática, e ao Désio pelo auxílio e treinamento com a cultura de células, muito obrigada por tudo.

Agradeço à Dra. Myrna Bonaldo e Lidiane Menezes do Laboratório de Biologia de Flavivírus/IOC, por toda contribuição intelectual, além do fornecimento da cepa do ZIKV.

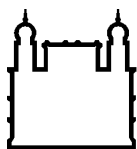
Agradeço ao grupo de bioinformática no Laboratório Nacional de Computação Científica pela realização do sequenciamento de RNA, em especial à Dra Ana Tereza Vasconcelos, por coordenar a equipe na etapa de sequenciamento, e o Dr. Guilherme Loss por todo auxílio.

Agradeço à pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, em especial à Julimar Ferreira por toda dedicação, sempre gentil e atenciosa, muito obrigada!

À CNPq e ao IOC, pelo apoio financeiro.

Aos membros da banca, Dr. Gonzalo Bello Bentacor, Dr^a.Cláudia Mermelstein, Dr. Zilton Vasconcelos, Dr. Pedro Paulo de Abreu Manso e Dr. Daniel Adesse, agradeço a contribuição para o encerramento desse ciclo.

A todos, muito obrigada!



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

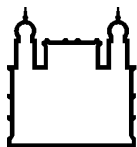
Alterações miogênicas em células musculares humanas infectadas pelo vírus zika: susceptibilidade de mioblastos e resistência de miotubos

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Cássia da Silva Santos Rocha

O músculo esquelético é responsável pelo movimento e manutenção da postura, e é um órgão produtor de miocinas e altamente metabólico, onde alterações em sua fisiologia podem ter consequências sistêmicas. Esse tecido é alvo para diferentes arbovirose, e mialgia é um sintoma frequentemente relatado. O músculo esquelético é composto majoritariamente por fibras musculares, e uma pequena população de células progenitoras denominadas células satélites (SC), que em caso de lesão podem ser ativadas, proliferam e se diferenciam, sendo capazes de regenerar o tecido muscular. Recentemente nosso grupo demonstrou que SC em proliferação (mioblastos) são infectadas pelo vírus ZIKA (ZIKV), enquanto células diferenciadas e fusionadas (miotubos) não apresentam proteínas virais. O presente trabalho avaliou alterações miogênicas e o perfil transcricional de mioblastos e miotubos humanos após tratamento com ZIKV, com o objetivo de identificar fatores e mecanismos envolvidos na susceptibilidade e resistência destas células à infecção. Confirmamos infecção produtiva do ZIKV nos mioblastos, que apresentaram uma redução no número de células expressando a molécula KI67 em altas concentrações (característico de células em mitose). A análise de sequenciamento mostrou perturbação das vias do ciclo celular em mioblastos infectados, que ainda apresentaram enriquecimento de vias relacionadas à morte celular. Também confirmamos a ausência de infecção produtiva nos miotubos. Interessantemente, verificamos que o ZIKV entra nas células diferenciadas, mas não consegue replicar o RNA viral, e a análise do transcriptoma identificou um enriquecimento de vias e modulação de genes antivirais maior ou exclusivamente nas células diferenciadas em comparação aos mioblastos infectados. Além disso, miotubos expostos ao ZIKV aparentam ter aumento de fusão/hipertrofia. Ao contrário dos mioblastos, miotubos apresentaram enriquecimento de vias relacionadas a organização da matriz extracelular. Dados preliminares do nosso grupo mostraram que o cultivo de mioblastos sobre a isoforma de laminina 511 levou à redução da infecção pelo ZIKV. Contudo, em nossos ensaios, a infecção pelo ZIKV não modulou a expressão de receptores para LM e o bloqueio do receptor de LM, a integrina $\alpha 6$, não reduziu a infecção pelo ZIKV em mioblastos. Nosso trabalho mostrou que a infecção pelo ZIKV induz resposta imune e antiviral, que foram enriquecidos em mioblastos e miotubos, sendo que estes apresentaram uma assinatura única de vias e genes antivirais, que poderiam explicar a resistência frente ao ZIKV.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

MYOGENIC CHANGES IN HUMAN MUSCLE CELLS INFECTED BY ZIKV VIRUS: MYOBLASTS SUSCEPTIBILITY AND MYOTUBES RESISTENCE

ABSTRACT

MASTER'S DISSERTATION IN MOLECULAR AND CELL BIOLOGY

Cássia da Silva Santos Rocha

Skeletal muscle is responsible for the movement and maintenance of posture and is a myokine-producing and highly metabolic organ, where changes in its physiology can have systemic consequences. This tissue is a target for different arboviruses, and myalgia is a frequently reported symptom. Skeletal muscle is composed mainly of muscle fibers and a small population of progenitor cells called satellite cells (SC), which in case of injury can be activated, proliferate and differentiate, being able to regenerate muscle tissue. Recently our group demonstrated that proliferating SC (myoblasts) are infected by the ZIKA virus (ZIKV), while differentiated and fused cells (myotubes) do not present viral proteins. The current work evaluated myogenic alterations and the transcriptional profile of human myoblasts and myotubes after treatment with ZIKV, aiming to identify factors and mechanisms involved in the susceptibility and resistance of these cells to infection. Here, we confirmed productive ZIKV infection in myoblasts, which showed a reduction in the number of cells expressing the KI67 molecule at high concentrations (characteristic of cells in mitosis). Sequencing analysis showed disruption of cell cycle pathways in infected myoblasts, which still showed enrichment of cell death-related pathways. We also confirmed the absence of productive infection in myotubes. Interestingly, we found that ZIKV invades differentiated cells but fails to replicate the viral RNA. The transcriptome analysis identified enrichment of antiviral pathways and genes, greater or exclusively in differentiated cells than infected myoblasts. Furthermore, myotubes exposed to ZIKV appeared to have increased fusion/hypertrophy. In contrast to myoblasts, myotubes showed enrichment of pathways related to extracellular matrix organization. Preliminary data from our group showed that culturing myoblasts on laminin 511 isoform led to reduced ZIKV infection. However, in our assays, ZIKV infection did not modulate LM receptor expression, and the blockade of the LM receptor, integrin $\alpha 6$, did not reduce ZIKV infection in myoblasts. Our work showed that ZIKV infection induces immune and antiviral responses, which were enriched in myoblasts and myotubes. The differentiated cells showed a unique signature of antiviral pathways and genes, which could explain resistance against ZIKV.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 1.1 Músculo Estriado esquelético | 1 |
| 1.2 Miogênese | 3 |
| 1.3 Células satélites e regeneração muscular | 4 |
| 1.4 Membrana basal e Matriz extracelular | 8 |
| 1.5 Músculo esquelético é um tecido alvo para infecções virais | 11 |
| 1.6 Vírus Zika: epidemiologia e transmissão | 12 |
| 1.7 Biologia do ZIKV | 15 |
| 1.8 Ciclo de replicação viral na célula hospedeira | 16 |
| 1.9 Tropismo do ZIKV por diferentes células e tecidos | 18 |
| 1.10 Justificativa | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1 Objetivo geral | 23 |
| 2.2 Objetivos específicos | 23 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 24 |
| 4. RESULTADOS | 31 |
| 4.1 Avaliação da miogenicidade, proliferação e diferenciação dos mioblastos humanos LHCN-M2 <i>in vitro</i> | 31 |
| | 33 |
| 4.2 Mioblastos humanos são susceptíveis à infecção pelo ZIKV | 33 |
| 4.3 Infecção pelo ZIKV afeta o ciclo celular em mioblastos humanos | 35 |
| 4.4 Infecção pelo ZIKV modula a diferenciação de mioblastos humanos | 37 |
| 4.5 Infecção pelo ZIKV não modula a expressão de integrinas em mioblastos | 39 |
| 4.6 O bloqueio do receptor de LM integrina $\alpha 6$ não inibiu a infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos | 41 |
| 4.7 ZIKV induz alterações nos perfis transcricionais em mioblastos e miotubos relacionados com a resposta imune antiviral | 42 |
| 4.8 ZIKV induz alterações nos perfis transcricionais em mioblastos e miotubos relacionados com funções biológicas do sistema muscular esquelético | 49 |
| | 49 |
| 4.9 Interações com receptores de matriz em células musculares humanas na infecção pelo ZIKV | 53 |
| 5. DISCUSSÃO | 57 |
| 6. CONCLUSÕES | 64 |

| | |
|--|-----|
| 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 66 |
| 8. ANEXO..... | 77 |
| 8.1 Manuscrito- Riederer <i>et al.</i> 2021, artigo submetido, 2021..... | 77 |
| 8.2 Abstract..... | 80 |
| 8.3 Introduction..... | 81 |
| 8.4 Results..... | 82 |
| 8.5 Discussion..... | 89 |
| 8.6 Figure titles and legends | 96 |
| 8.7 Methods | 101 |
| 8.8 Supplemental Information titles and legends..... | 106 |
| 8.9 References..... | 107 |

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1.1: Estrutura do músculo esquelético..... | 3 |
| Figura 1.2: Localização anatômica células satélites..... | 5 |
| Figura 1.3: Fatores de transcrição que regulam a linhagem miogênica. | 7 |
| Figura 1.4: Desenho esquemático da estrutura e difentes isoformas de LM..... | 10 |
| Figura 1.5: Potencial de distribuição global pelo ZIKV..... | 13 |
| Figura 1.6: Estrutura esquemática e organização do genoma do ZIKV..... | 16 |
| Figura 1.7: Replicação do ZIKV na célula hospedeira..... | 18 |
| Figura 1.8: Susceptibilidade de diferentes tecidos a infecção pelo ZIKV..... | 20 |
| Figura 3.1: Desenho esquemático representando o momento de infecção pelo ZIKV em mioblastos <i>in vitro</i> | 25 |
| Figura 3.2: Desenho esquemático representando o momento de infecção pelo ZIKV em mioblastos <i>in vitro</i> | 26 |
| Figura 4.1: Mioblastos humanos LHCN M2 são miogênicos..... | 32 |
| Figura 4.2: Mioblastos humanos proliferam e fusionam em cultura..... | 33 |
| Figura 4.3: Infecção em células Vero pelo ZIKV..... | 34 |
| Figura 4.4: Mioblastos humanos são suscetíveis a infecção pelo ZIKV..... | 35 |
| Figura 4.5: Infecção pelo ZIKV afeta o celular em mioblastos humanos..... | 36 |
| Figura 4.6: Infecção pelo ZIKV modula a diferenciação de mioblastos humanos..... | 38 |
| Figura 4.7: A infecção pelo ZIKV não modula a expressão de integrinas em mioblastos humanos..... | 40 |
| Figura 4.8: O bloqueio do receptor de LM integrina $\alpha 6$ não inibiu infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos..... | 41 |
| Figura 4.9: Análise de enriquecimento de termos baseado nas anotações GO para processos biológicos após tratamento de mioblastos e miotubos com ZIKV..... | 43 |
| Figura 4.10: Análise de enriquecimento de categorias baseadas em anotações do Reactome em mioblastos infectados pelo ZIKV..... | 46 |
| Figura 4.11: Expressão diferencial de genes relacionados à restrição viral em mioblastos e miotubos expostos ao ZIKV..... | 48 |
| Figura 4.12: Análise de enriquecimento de função baseado em anotações do Reactome indicando desregulação no ciclo celular..... | 50 |
| Figura 4.13: Análise de enriquecimento de função mostra a modulação nas vias de morte celular em mioblastos infectados pelo ZIKV..... | 52 |
| Figura 4.14: A: Diagrama adaptado do banco de dados KEGG, representa os genes relacionados a via “ECM-receptor interaction” (hsa04512) na comparação entre mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK..... | 55 |
| Figura 4.15: Diagrama adaptado do banco de dados KEGG representa os genes relacionados a via “ECM-receptor interaction” na comparação entre miotubos ZIKV vs miotubos MOCK (hsa04512)..... | 56 |

ÍNDICE DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 3.1: Reagentes utilizados para o meio de cultivo de proliferação e diferenciação celular..... | 24 |
| Tabela 3.2: Reagentes e anticorpos utilizados para marcação em imunofluorescência e citometria de fluxo..... | 28 |

ABREVIATURAS E SIGLAS

- APOBEC- Gene codificante para uma família de proteínas citidina desaminases.
- AXL- receptor de tirosina quinase.
- CASP- caspase.
- CCL5/Rantes- Ligante 5 de quimiocina CC.
- CD34 - Cluster de diferenciação 34, do inglês *Cluster of Differentiation 34*.
- CD56/NCAM - Molécula de adesão neural (agrupamento de diferenciação 56).
- CSZ - Síndrome Congênita de Zika, do inglês *Congenital Zika Syndrome*.
- DMEM - Meio de Eagle modificado por Dubelco, do inglês *Dulbecco's modified Eagles médium*.
- ECM - Matriz extracelular, do inglês *extracellular matrix*.
- ER - Retículo endoplasmático, do inglês *endoplasmatic reticulum*.
- ESPIN- Emergência de Saúde Pública Internacional.
- FAPs- Progenitores fibroadipogênitos.
- FGF- Fator de crescimento de fibroblastos, do inglês *Fibroblast growth fator*.
- GBP2/3- Gene codificante para proteínas de ligação ao guanilato, do inglês “guanylate binding protein 2”.
- GO- *Gene Ontology*, análise de enriquecimento de genes.
- HGF- Fator de crescimento de hepatócitos, do inglês *Hepatocyte growth fator*.
- ICAM- molécula de adesão intracelular.
- IFN- Interferon.
- IGF- Fator de crescimento semelhante a insulina, do inglês *Insulin-like growth fator*.
- IL1A- interleucina 1 alfa.
- ISG- Genes induzíveis por interferon, do inglês *interferon induced genes*.
- ISG15- Gene estimulado por interferon 15.
- ITGA7- Gene que codifica integrina alfa 7.
- KEGG - Enciclopédia de genes e genomas, do inglês *Kyoto encyclopedia of genes and genomes*.
- KMEM- meio de cultivo para proliferação celular, composto por DMEM mais fatores de crescimento.
- LM - Laminina.
- MAVs – Proteína adaptadora de sinal.
- MB - Membrana basal.

MDA5- Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma, do inglês *melanoma differentiation-associated protein 5*.

MMPs - Metaloproteinases.

MOI - Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*.

MRF - Fatores reguladores miogênicos, do inglês, *myogenic regulatory factors*.

MRF4- Fatores regulação miogênico 4, do inglês *Myogenic fator 4*.

Myf5 - Fator de regulação miogênico, do inglês *Myogenic fator*.

MYHC- Cadeia pesada de miosina.

MyoD- Fator de determinação miogênico 1, do inglês *Myogenic determination factor 1*.

OAS- Gene que codifica uma família de enzimas 2'5'oligoadenilato sintase 1.

PAX3/7- Fatores de transcrição 3 e 7 da família *paired box*.

PDGF - Fator de crescimento derivado de plaquetas, do inglês *Platelet-derived growth fator*.

RIG1- Receptores semelhantes ao gene 1 induzíveis por ácido retinóico, do inglês *retinoic acid-inducible gene-I-like receptors*.

SC - Células satélites, do inglês *satellite cells*.

STAT- Transdutor de sinal e ativador de transdução 1, do inglês *Signal transducer and activation of transcription 1*.

TAM- Receptores da família TAM, nome derivado da primeira letra dos constituintes (Tyro3, AXL e Mer).

TGN- Rede Trans-Golgi.

TIM- Receptores TIM domínio de imunoglobulina, do inglês *T Cell immunoglobulin and mucin domain protein 1*.

TMEM173/STING- Estimulador de genes por interferon.

TNF- Fator de necrose tumoral

TRIM- Família de motivo tripartido, do inglês *tripartite modifi-containig*.

VCAM- Molécula de adesão vascular.

VEGF- Fator de crescimento vascular endotelial.

ZIKV – Vírus Zika.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Músculo Estriado esquelético

O músculo esquelético é o tecido mais abundante do corpo, representando aproximadamente 50% do peso corporal e desempenha papéis fundamentais na regulação e homeostase do organismo. O músculo é composto por água (75%), proteínas (20%) e outras substâncias como sais inorgânicos, minerais e carboidratos (5%). O músculo esquelético fornece equilíbrio, movimentação, postura, respiração, manutenção da temperatura corporal, e regulação de movimento de líquidos corporais (Frontera & Ochala 2014). Além disso, o músculo desempenha um importante papel no metabolismo energético e de proteínas do corpo. É o principal reservatório de aminoácidos para a manutenção da síntese de proteínas de tecidos e órgãos vitais como pele, coração, cérebro e fígado. Ainda, é local de captação e armazenamento de glicose, contribuindo para a manutenção dos níveis deste carboidrato (Argilés *et al.* 2016). De forma relevante, o músculo esquelético funciona como um órgão endócrino, ele pode secretar centenas de miocinas, que são citocinas, peptídeos produzidos pelas células musculares em resposta à contração, e possuem função endócrina e parácrina. Essas miocinas medeiam a comunicação entre o músculo e diferentes órgãos, incluindo cérebro, osso, intestino, pâncreas, pele, tecido adiposo e vasculatura. Essas miocinas exercem seus efeitos sobre diferentes mecanismos, como metabolismo de glicose, formação óssea, estrutura da pele, hipertrofia, neurogênese, lipólise (Severinsen & Pedersen 2020).

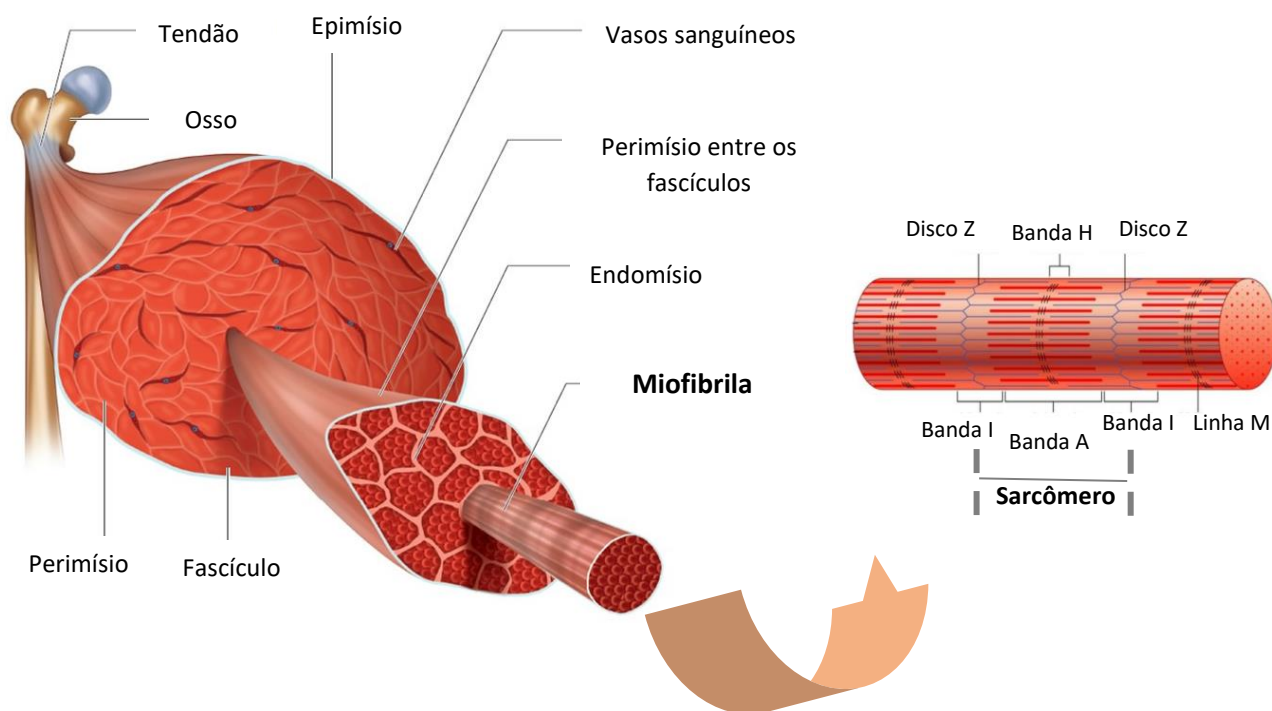
O músculo esquelético é um tecido organizado, constituído predominantemente por feixes de fibras musculares cilíndricas que geram força para contração muscular, e são formadas após diferenciação e fusão de células progenitoras musculares. As fibras musculares estão envolvidas por camadas de tecido conjuntivo, e são conectadas ao tendão, estrutura responsável pela inserção do músculo ao osso. O epimísio é a camada de tecido conjuntivo mais externa que circunda o músculo, que permite movimentação corporal e mantém sua integridade, além de separar o músculo de outros tecidos. Cada fibra muscular é composta por 10-100 feixes de fibras, denominadas fascículos, que são envolvidos pela camada intermediária, o perimísio. Dentro dos fascículos, encontram-se as fibras musculares individualizadas, envolvidas pela camada de tecido conjuntivo mais interna, o endomísio (Figura 1.1) (Dave *et al.* 2019). No perimísio, epimísio e endomísio encontramos o fluído extracelular e nutrientes para a fibra muscular fornecidos pela corrente sanguínea. Entre as fibras musculares, ainda são encontradas populações de células residentes musculares como as células progenitoras miogênicas e células

não miogênicas, incluindo pericitos, células endoteliais, macrófagos intersticiais (Ausems *et al.* 2021).

As fibras musculares são compostas predominantemente por miofibrilas, arranjos de miofilamentos, cuja unidade funcional são os sarcômeros, que se repetem e formam a unidade contrátil do músculo. As miofibrilas são compostas por uma rede de proteínas do citoesqueleto que se agrupam e formam os filamentos proteicos, que dão a fibra muscular a aparência estriada e coordenam a contração muscular. Os miofilamentos de actina (filamentos finos) e de miosina (filamentos espessos), são responsáveis por gerar força e contração muscular. O sarcômero é delimitado por duas linhas Z, uma em cada extremidade. As faixas mais distantes e claras são chamadas de banda I, uma região localizada em ambos os lados do disco Z, composta pelos filamentos de actina. No meio do sarcômero está localizada a banda A, composta pela região que se estende por todo o comprimento de filamentos de miosina. A parte central é a banda H, onde a zona dos filamentos espessos de miosina não está sobreposta sobre os filamentos de actina. A linha M, que está localizada no centro da banda A, é a região na qual os filamentos de miosina estão conectados (Figura 1.1) (Trovato *et al.* 2016; Henderson *et al.* 2018; Mukund & Subramaniam 2020). A interação dos filamentos de actina e miosina é importante para gerar a contração. A contração muscular é iniciada quando íons de Cálcio (Ca^+) se ligam à troponina permitindo o deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina, que puxa os discos Z em direção a banda M levando ao encurtamento do sarcômero (Trovato *et al.* 2016).

As fibras musculares são células multinucleadas e pós-mitóticas, e normalmente grandes, com diâmetro variando entre 20 e 100 μm , e comprimento que pode chegar a centímetros em humanos. Esses sincícios estão envolvidos por uma membrana plasmática denominada de sarcolema que forma invaginações que se inserem no citoplasma (Qusairi & Laporte 2011; Frontera & Ochala 2014). Nos vertebrados, o músculo esquelético é derivado de células precursoras mesodérmicas que circundam o tubo neural. O mesoderma paraxial sofre diferenciação originando os somitos (Buckingham *et al.* 2003). É nos somitos que ocorre o desenvolvimento e origem do músculo esquelético. Os somitos em desenvolvimento sofrem transformação epitelial em dermomiótomo, miótomo e esclerótomo. O dermomiótomo é a estrutura que contém células progenitoras miogênicas e dérmicas. Posteriormente, se desenvolvem em miótomo (estrutura muscular primitiva), essa é a primeira massa muscular esquelética que se forma no embrião; dermatômo (estrutura primitiva da derme) e esclerótomo mensequinal (contém células precursoras das cartilagens e ossos) (Buckingham *et al.* 2003). As células indiferenciadas do miótomo recebem estímulos e sinalização de moléculas que resultam na separação e migração dessas células para as áreas apropriadas, e assim gerar as células

progenitoras musculares em proliferação celular, denominadas mioblastos (Buckingham *et al.* 2003; Bentzinger *et al.* 2012; Chal & Pourquie 2017).



1.1: Estrutura do músculo esquelético. O músculo esquelético é envolvido pelo epimísio, camada de tecido conjuntivo mais externa. Fibras musculares são reunidas em feixes de fascículos que são envolvidos pelo perimísio. A fibra muscular individualizada, envolvida pelo endomísio, é formada por unidades repetitivas organizadas em sarcômeros, a unidade contrátil do músculo. Os sarcômeros, por sua vez, são formados por um complexo de proteínas, entre os filamentos de actina e miosina e delimitado por disco Z. Fonte: Adaptado da © Encyclopedia Britannica, 2015. Sarcômero criado por Anatomy and Physiology I, A. Araújo. <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01067940>.

2.1 Miogênese

A miogênese é o processo de desenvolvimento da fibra muscular madura com capacidade contrátil, que envolve inicialmente a proliferação de mioblastos, parada do ciclo celular, seguido de diferenciação e fusão com formação dos sincícios polinucleares que expressam proteínas características do músculo (Trovato *et al.* 2016). A miogênese ocorre durante o desenvolvimento embrionário, bem como no crescimento e regeneração muscular pós-natal. Todo esse processo de formação do músculo esquelético e regeneração muscular podem ser observados em estudos *in vivo* e *in vitro* (Fu *et al.* 2015; Wang *et al.* 2021). Esse processo de transição de células precursoras mesodérmicas para linhagem miogênica é regulado pelas vias

de sinalização WNT, Notch (sinal inibitório), fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e pela expressão de fatores reguladores miogênicos (do inglês *myogenic regulators factors* - MRFs), fatores de transcrição membros da família PAX (*Paired box*) e sinais secretados no microambiente (discutidos em seguida). Essa sinalização induz o comprometimento miogênico das células progenitoras e posterior diferenciação em músculo maduro (Tajbakhsh 2009; Mukund & Subramaniam 2020).

A miogênese termina quando ocorre maturação das fibras musculares, caracterizada pelo aparecimento de bandas transversais e sarcômeros que posteriormente se tornam capazes de contrair. Depois que o músculo amadurece, uma parte da população progenitora entra em quiescência, um estado de repouso (Fase G0 do ciclo celular) e residem em um microambiente especializado, o nicho da célula satélite (SC). Estas células-tronco musculares (SC), possuem potencial proliferativo, e podem diferenciar e fundir-se, formando novas fibras musculares. As SC são responsáveis pelo crescimento do músculo pós-natal e são essenciais para a regeneração muscular após injúria (Sambasivan *et al.* 2011; Von Maltzahn *et al.* 2013).

2.3 Células satélites e regeneração muscular

A regeneração muscular é um processo importante para a manutenção da homeostase do tecido muscular adulto, que após o desenvolvimento, possui notável capacidade de regeneração em respostas a diferentes estímulos. As SC constituem uma população de células tronco encontradas em adultos, derivadas de células progenitoras embrionárias. Devido a sua grande atividade mitogênica, as SC contribuem para o crescimento da fibra muscular pós-natal, reparo da fibra danificada e manutenção do músculo esquelético adulto. Possui um papel essencial no processo adaptativo e regeneração muscular, este processo envolve ativação, migração, proliferação e diferenciação celular (Sambasivan *et al.* 2011; Von Maltzahn *et al.* 2013). As SC representam uma população heterogênea, devido seu potencial de linhagem, padrões de expressão e potencial de diferenciação miogênica (Mukund & Subramaniam 2020). As SC foram inicialmente identificadas por Alexander Mauro (1961), e posteriormente foram descritas como principal fonte de novos mionúcleos no músculo esquelético pós-natal. A origem da nomenclatura “células satélites” vem da sua localização anatômica, onde residem em um ambiente especializado entre o sarcolema, e a membrana basal (MB) que envolve a fibra muscular (Reznik 1969) (Figura 1.2).

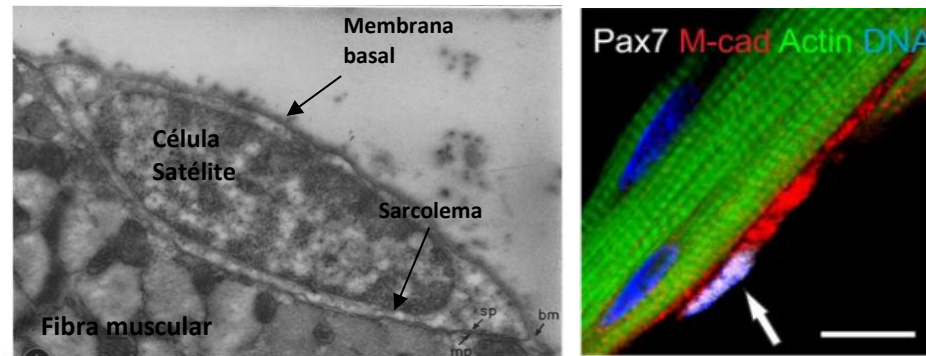


Figura 1.2: Localização anatômica das células satélites. À esquerda: imagem de microscopia eletrônica mostrando as células satélites localizadas entre a lâmina basal e o sarcolema da fibra muscular. À direita: Imagem da célula satélite por imunofluorescência. A célula satélite encontra-se na parte superior da fibra, em branco (PAX7). Em azul, os núcleos da fibra (dapi), actina em verde, M-caderina em vermelho. Fonte: (Mauro 1961; Tiburcy *et al.* 2019).

As SC são células indiferenciadas, mononucleadas, e possuem morfologia distinta. Quando quiescentes, as SC são geralmente fusiformes, com pouco citoplasma e menor conteúdo de organelas, tamanho de núcleo ligeiramente reduzido quando comparado aos núcleos da fibra muscular, exibem quantidades aumentadas de cromatina condensada, características que indicam células que as SC são mitoticamente quiescentes, ou seja, encontram-se no estágio não proliferativo (G0) no músculo esquelético adulto e saudável (B. P. Chargé & Rudnicki 2003). No estágio neonatal essas células representam 30-35% dos núcleos da miofibra de murinos, e na idade adulta, esse número diminui para 2-7% dos núcleos da fibra muscular, quantidade que pode variar dependendo da idade e do tipo do músculo (Allbrook *et al.* 1971; Fu *et al.* 2015).

A linhagem miogênica é regulada através da expressão de fatores de transcrição. Desta forma, as SC apresentam perfis específicos de expressão gênica que diferem quando essas células estão ativadas e entram na miogênese. Na quiescência, essas células podem ser identificadas através da expressão de marcadores de superfície, entre eles, M-Caderina, CD56/NCAM (molécula de adesão neural), c-Met, CD34, integrina $\alpha 7$, além de fatores de transcrição como PAX3 e PAX7 (Snijders *et al.* 2015). O fator de transcrição PAX7 é essencial para a manutenção da função das SC durante a miogênese (Maltzahn *et al.* 2013). Em resposta a um estímulo ou lesão, as SC são ativadas, entram em ciclo celular. Nessa fase proliferativa, essas células são denominadas de mioblastos, uma população com capacidade de diferenciar e fundir-se para formar as fibras musculares maduras, ou regenerar as fibras danificadas, todo esse processo ocorre durante a regeneração muscular (Figura 1.3). Após um insulto, diferentes sinais são gerados na área das miofibras danificadas e contribuem para ativação das SC, incluindo a destruição do sarcolema, que permite influxo de Ca^{+} e liberação do fator de crescimento de hepatócitos (HGF), que fica “estocado” na matriz extracelular (ECM) que envolve a fibra. A interação do HGF, com o seu receptor c-Met presente nas SC, é o primeiro

sinal para ativação destas células. Além disso, uma combinação de sinais contribui para ativação das SC, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, incluindo fatores de crescimento- PDGF (Fator de crescimento derivado de plaquetas), VEGF (Fator de crescimento vascular endotelial), IGF (Fator de crescimento semelhante à insulina), FGF (Fator de crescimento de fibroblastos), NO (óxido nítrico liberados pelo infiltrado inflamatório (Fu et al. 2015a).

Os mioblastos, a progênie das SC em proliferação, apresentam morfologia e expressão de marcadores distintos das células quiescentes. São maiores, citoplasma expandido, apresentam mais organelas, e são caracterizados pela expressão de fatores reguladores miogênicos, entre eles, o Myf5 marcador inicial do comprometimento miogênico, seguido pela expressão de MyoD, expresso na maioria das células ativadas (Figura 1.3) (Kitzmann *et al.* 1998; Chargé & Rudnicki 2003). Camundongos geneticamente modificados, deficientes de MyoD e Myf5, apresentam falha na regeneração muscular por não sofrerem diferenciação. Esses dados mostram que a expressão dos fatores MyoD e Myf5 conferem identidade miogênica e capacidade de diferenciação muscular (Yamamoto *et al.* 2018). A expressão do MyoD nos mioblastos induz a saída do ciclo celular e posterior diferenciação. Nesse estágio são conhecidos como miócitos (Zhang *et al.* 2010).

Durante a diferenciação dos mioblastos ocorre perda de expressão de PAX 7 e MYf5, e passam a expressar MRF4 e miogenina (MYOG) (Figura 1.3). Nessa fase também ocorre a síntese de proteínas miofibrilares, que induz o crescimento da fibra muscular, incluindo actina, miosina e troponina. Além disso, o aumento de atividades de enzimas como creatina fosfoquinase, glicogênio fosforilase e síntese do receptor de Acetilcolina (AchR) são características da diferenciação e desenvolvimento da fibra muscular (Devlin & Emerson 1978; Peziński *et al.* 2020). Uma vez diferenciados, os mioblastos fusionados são capazes de formar os miotubos, as fibras musculares maduras multinucleadas, nessa fase, as células multinucleadas também expressam MyHC (cadeia pesada de miosina). Durante o processo de fusão dos mioblastos, as células aderem, migram em direção à célula parceira, ocorre produção de complexos pré-fusão envolvendo a fragmentação da membrana celular e rearranjo do citoesqueleto. Seguido do acúmulo de actina e pela formação de poros na membrana, que permite a troca de materiais citoplasmáticos (Kim *et al.* 2015).

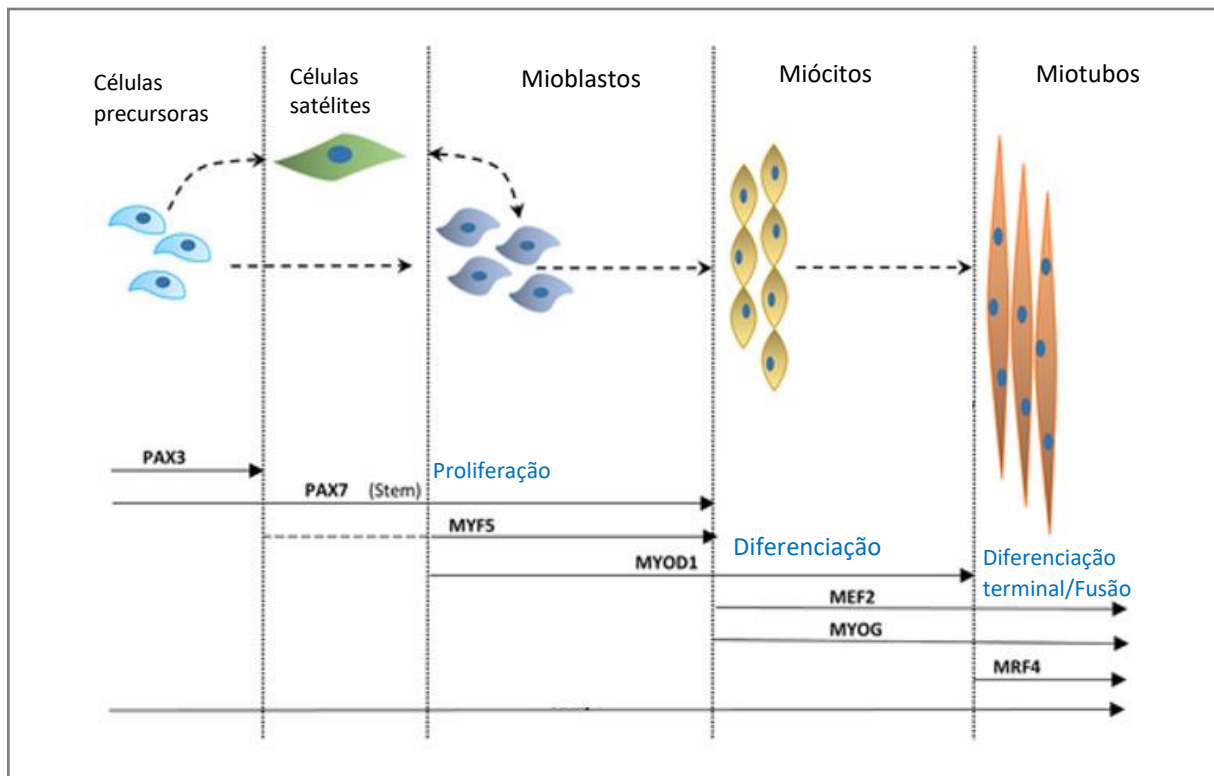


Figura 1.3: Fatores de transcrição que regulam a linhagem miogênica. As células satélites (SC) musculares expressam PAX7 e são derivadas dos progenitores que expressam PAX3/PAX7. Após um estímulo/lesão, as SC são ativadas, entram em proliferação, e nessa fase são chamadas mioblastos, expressando MYF5 e MYOD1. As células em seguida param de proliferar e iniciam o processo de diferenciação, expressando MEF2 e MYOG, sendo chamadas de miócitos. Posteriormente, essas células fusionam-se para formar as fibras musculares maduras e multinucleadas expressando MRF4. Fonte: (Adaptado de Mukund & Subramaniam 2020).

Além de produzir uma progênie destinada a diferenciação, as SC mantêm sua população progenitora por um processo de auto renovação, o que caracteriza e as define como células-tronco (Schmidt *et al.* 2019). Durante a regeneração, uma pequena população de SC ativadas se autorrenova, e dessa forma mantem o pool de células satélites no estágio quiescente, necessárias para homeostase e reparo do músculo. Para manter essa população, as SC ativadas sofrem divisões assimétricas, na qual, duas células filhas distintas são geradas, uma é destinada à auto renovação e outra é comprometida com a diferenciação. Divisões assimétricas são indispensáveis para a renovação de células-tronco bem como capacidade de diferenciação de mioblastos (Almeida *et al.* 2016; Schmidt *et al.* 2019). Para que haja manutenção das SC e homeostase do tecido torna-se necessário o balanço entre auto renovação e diferenciação. Qualquer disfunção nesse estágio pode levar à diminuição da capacidade de auto renovação do nicho de SC (Kuang & Rudnicki 2008).

A manutenção das SC no estado quiescente é determinada por sua interação com o microambiente especializado, o chamado nicho da SC, localizado entre o sarcolema e a membrana basal (MB) que envolve individualmente cada fibra muscular. Esse nicho é um

ambiente especializado, necessário para manter as células progenitoras musculares em estado de repouso, mas também responsável por ativá-las, através da sinalização necessária para proliferação e diferenciação em resposta a uma lesão/insulto. Como descrito anteriormente, as SC residem entre a MB e o sarcolema da fibra muscular, nesse local, interagem com componentes da matriz extracelular (ECM), fatores de crescimento, integrinas. Durante a ativação das SC (que ocorre em resposta a uma lesão), componentes da ECM são degradados por proteases da matriz, que resulta na liberação de moléculas que induzem a sinalização para proliferação. Durante esse evento, o nicho é composto também por componentes celulares; células residentes como fibroblastos, adipócitos, células imunes, progenitores estromais, progenitores fibroadipogênicos (FAPs), além de citocinas, quimiocinas (Fu *et al.* 2015a; Thomas *et al.* 2015)

2.4 Membrana basal e Matriz extracelular

A matriz extracelular (ECM) é uma rede de moléculas secretadas por células, que fornece suporte bioquímico e estrutural às células e tecidos. Entre os seus componentes estão proteoglicanos e glicosaminoglicanos, e ainda proteínas fibrosas como colágeno, elastina e glicoproteínas adesivas como laminina (LM), fibronectina, tenascina e entactina (nidogênio). (Lebleu *et al.* 2007). As fibras musculares são revestidas pela camada de ECM denominada de endomísio, e em contato direto com o sarcolema encontramos a MB (Sanes 2003). A MB é composta predominantemente por colágeno do tipo IV e LM, atribui propriedades elásticas ao tecido, e fornece suporte mecânico para nervos e vasos presentes no tecido, e determina barreira espacial entre o endotélio e superfície das células musculares. A ECM também fornece estrutura mecânica durante a contração muscular, e ainda serve como reservatório para fatores solúveis e citocinas, que estão prontos para serem liberados em situações apropriadas. A ECM estimula a sinalização intracelular nas células musculares, com importante papel na embriogênese, crescimento, cicatrização de feridas e reparo do tecido (Calve *et al.* 2010; Thorsteinsdottir *et al.* 2011; Grzelkowska-kowalczyk 2016; Ahmad *et al.* 2020). Em resposta à uma lesão, componentes da MB são degradados por proteases da matriz, evento que resulta na liberação de moléculas de sinalização que atuam na ativação e proliferação das SC (Laumonier & Menetrey 2016).

A LM é um importante componente da MB, e conseqüentemente, um importante componente do nicho das SC. É amplamente expressa pelos tecidos, e possui importantes funções no desenvolvimento embrionário inicial, onde influenciam o microambiente através da sinalização celular, como adesão, proliferação, diferenciação e migração celular, além de

fornecer estrutura do tecido (Domogatskaya *et al.* 2012). A LM é uma glicoproteína heterotrimérica, formada por cadeias polipeptídicas nomeadas pelas letras gregas α (~ 400 kDa), β (~ 200 kDa) e γ (~ 200 kDa) que se associam em forma de crucifixo (Figura 1.4). O genoma de mamífero codifica cinco cadeias α , três cadeias β e três cadeias γ . Essas isoformas são classificadas com base na composição de suas cadeias, por exemplo, a LM111 é composta pelas cadeias $\alpha 1$, $\beta 1$ e $\gamma 1$ (Hohenester 2019). Atualmente, 16 isoformas foram descritas em mamíferos (Figura 1.4). A distribuição dessas isoformas é tecido-específica, ou seja, sua expressão ocorre diferencialmente nos tecidos, e é determinada pela variação na expressão de cadeias α . Os diferentes padrões de expressão das cadeias α conferem heterogeneidade molecular e contribuem para diferentes funções. Como exemplos dessa distribuição específica nos tecidos podemos ressaltar a LM111, descrita principalmente no epitélio embrionário e não expressa na fase adulta. A cadeia $\alpha 1$ de LM é expressa durante o estágio embrionário e desaparece progressivamente das MBs durante o desenvolvimento até fase adulta (Durbeej 2010; Aumailley 2013).

As isoformas de LM contendo a cadeia $\alpha 2$ (LM221 e LM211) foram descritas no sistema neuromuscular, enquanto a LM332 é a isoforma mais abundante na pele. As isoformas contendo a cadeia $\alpha 4$ (LM411 e LM421) são associadas ao desenvolvimento muscular embrionário e estão abundantes nas membranas basais dos endotélios. Isoformas contendo a cadeia $\alpha 5$, como a LM511 e LM521 também são descritas no desenvolvimento embrionário, e distribuídas por todo o corpo (Durbeej 2010). Os braços curtos da LM contêm um domínio N-terminal na parte distal da LM, localizado nas cadeias α , β e γ . Os braços curtos interagem com outras LM e com componentes da MB. O colágeno IV se liga à LM via entactina, também conhecida como nidogênio, formando uma rede na MB. Juntas, essas macromoléculas levam a formação de polímeros e promovem a montagem e integridade da MB na superfície celular. Essa polimerização na MB requer também o braço longo de LM que auxilia a concentrar a LM na superfície da célula. O braço longo da LM é uma estrutura espiral helicoidal e conservada, formada pela união das três cadeias. A longa espiral se estende até o domínio C-Terminal nas cadeias β e γ , enquanto a cadeia α é seguida por cinco domínios globulares homólogos (domínios LG). Essa região constitui um local de ligação a receptores de superfície celular (Domogatskaya *et al.* 2012; Hohenester 2019).

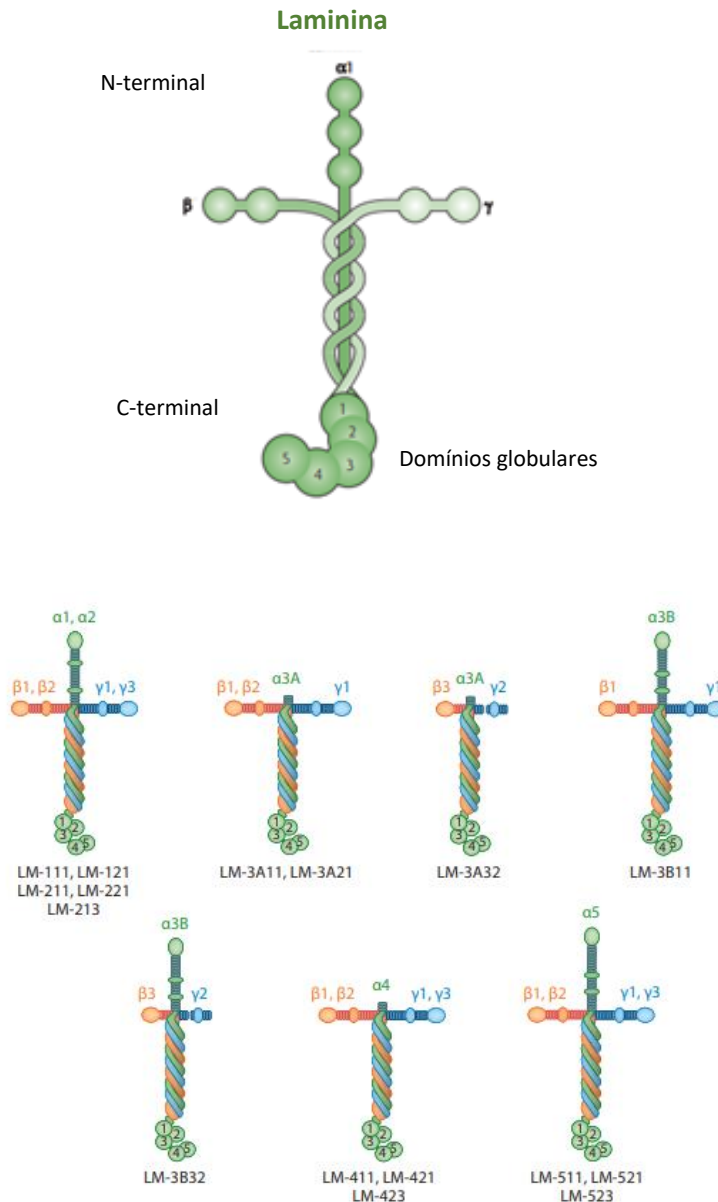


Figura 1.4: Desenho esquemático da estrutura de diferentes isoformas de laminina (LM). A LM é composta pelas cadeias α , β e γ . A região N-terminal é formada pelos braços curtos da molécula, que possuem domínios globulares. O braço longo é formado pela união das cadeias em formato helicoidal, que se estendem até a região C-terminal formada pelos domínios globulares (LG1-LG5). As cadeias de LM podem formar até 16 isoformas. Fonte: (Adaptado de Domogatskaya *et al.* 2012).

A LM exerce suas funções biológicas através da sua ligação à receptores de superfície celular. A LM se liga aos receptores através dos domínios globulares na porção C-Terminal com receptores integrinas e não integrinas, estimulando vias de sinalização celular através da ativação desses receptores. Os receptores não integrinas incluem os distroglicanos, sidecanos e a glicoproteína do grupo sanguíneo Lutheran (Durbeej 2010; Yurchenco 2015). Integrinas são os principais receptores de adesão à ECM, essa interação ocorre através da ligação entre estas

e proteínas do citoesqueleto, um processo chamado adesão focal. Integrinas são proteínas transmembranares compostas pelas subunidades α (18 unidades) e β (8 unidades), formando 24 heterodímeros ligadas por ligações não covalentes (Boppart & Mahmassani 2019). Estruturalmente, cada subunidade de integrina contém um domínio extracelular, domínio transmembranar e um domínio citoplasmático. A maioria das integrinas envolvidas na adesão com a ECM compartilha a subunidade $\beta 1$, dentre elas as integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$. Todas têm capacidade de ligação a LM, no entanto as integrinas $\alpha 1\beta 1$, $\alpha 6\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ e $\alpha 6\beta 4$ são as que possuem maior especificidade, enquanto as integrinas $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$ se ligam preferencialmente a fibronectina. (Papers & Mayer 2003; Riederer *et al.* 2015; Yurchenco 2015).

2.5 Músculo esquelético é um tecido alvo para infecções virais

Alterações musculares são bastante comuns em infecções por diferentes arboviroses e outros vírus de importância clínica. O tecido muscular é descrito em infecções pelo CHIKV, DENV, Nilo Ocidental, Coronavírus, associados a miosite e rabdomiólise (Leis *et al.* 2003; Ozden *et al.* 2007; Ali & Kunugi 2021). De forma relevante, infecções virais podem contribuir para a redução da regeneração muscular, manutenção do tecido, e desregulação da homeostase (Liu & Conboy 2017). Os sintomas encontrados na fase aguda da maioria das arboviroses são conhecidos como “síndrome dengue-like”, e a mialgia é um sintoma frequentemente relatado. A frequência de mialgias entre arboviroses causadas pelos vírus CHIKV, SINV e DENV pode variar entre 40 - 90% entre os pacientes sintomáticos (Filippone *et al.* 2019). Durante a infecção pelo vírus Zika (ZIKV), a mialgia foi relatada entre 50 e 70% dos pacientes no Brasil (Brasil *et al.* 2016). A dor muscular não é apenas restrita na fase aguda da infecção, e alterações musculares persistem por anos após infecção com o vírus Sinbdis. Nas infecções pelo CHIKV e DENV, esses sintomas podem persistir até meses após o início dos sintomas (Adouchief *et al.* 2016).

Consistente com a dor muscular, a detecção de antígenos virais foi observada em biópsias musculares, modelo animal de infecção e ensaios *in vitro*, apontando o músculo como alvo viral para diferentes arboviroses como CHIKV, DENV, Febre amarela e ZIKV (Ozden *et al.* 2007; Warke *et al.* 2008; Chan *et al.* 2016). Durante a infecção pelo ZIKV, foi detectado a presença do RNA viral no tecido muscular com infiltrado inflamatório e degeneração das fibras. Além disso, a persistência do RNA viral foi observada no tecido muscular de macaco Rhesus até 35 dias após o início dos sintomas (Aliota *et al.* 2016) (Hirsch *et al.* 2017). Atrofia muscular ainda foi observada em biópsia de recém-nascidos que morreram devido às alterações congênitas

induzidas pelo ZIKV (Chimelli *et al.*, 2017). Infecções virais podem causar importantes alterações musculares e podem prejudicar o desenvolvimento do tecido.

2.6 Vírus Zika: epidemiologia e transmissão

O ZIKV pertence ao gênero flavivírus, membro da família *Flaviridae*, uma família composta por grande número de vírus transmitidos por artrópodes como mosquitos e carrapatos, além de existirem vetores ainda desconhecidos, muitos destes são patogênicos e com disseminação global. O gênero flavivírus consiste em mais de 53 espécies de vírus, incluindo o vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV), vírus da encefalite japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV), entre outros (Gubler *et al.* 2017; Neufeldt *et al.* 2018). O ZIKV foi isolado pela primeira vez na floresta Uganda em 1947 por Alexander Hadow e George Dick durante uma investigação de febre amarela em macacos Rhesus, com transmissão enzoótica entre primatas não humanos (Dick 1952). O primeiro caso de infecção em humanos foi relatado na Nigéria em 1954. O vírus migrou para a Ásia onde foi detectado em 1966 com a primeira evidência de transmissão por um vetor urbano, o mosquito *Ae. Aegypti*. Poucos casos foram relatados após a descoberta, e as infecções pelo ZIKV eram consideradas de distribuição geográfica limitada. O primeiro grande surto fora da África ocorreu em 2007 na ilha Yap, nos Estados Federados da Micronésia, onde cerca de 73% da população foi infectada (Duffy *et al.* 2009). Os casos se caracterizavam por erupções cutâneas, febre, conjuntivite e artralgia.

Em 2013, o vírus se espalhou pela Ásia, primeiro nas Ilhas do Pacífico onde vários casos de infecção foram relatados, indicando rápida disseminação (Musso *et al.* 2014). Nas Américas, a circulação autóctone do ZIKV tem sido relatada desde 2014 (WHO, 2015). O primeiro caso autóctone no Brasil foi relatado em 2015 na Bahia, embora estudos sobre a origem filogenética sugerem a circulação do ZIKV no país desde dezembro de 2013 (Zanluca *et al.* 2015; Costa *et al.* 2021). O vírus então se espalhou rapidamente pelo país, e várias regiões no mundo (Campos *et al.* 2015; Faria *et al.*, 2016; Gorshkov *et al.* 2019). O surto nas Américas atingiu o pico em 2016, e nesse período foram confirmados mais de 199614, sendo confirmados 128793 (60,7%) casos somente no Brasil (PAHO, 2016). Apesar da diminuição na taxa de infecção a partir de 2017, a transmissão ainda persiste com baixos níveis de transmissão (WHO, 2019). Um relatório epidemiológico mostra que um total de 87 países e territórios apresentaram evidências de transmissão autóctone de ZIKV em julho de 2019. Casos relatados de infecção pelo ZIKV em diferentes territórios e regiões do mundo apontam o potencial de propagação do vírus onde haja a presença do vetor (Figura 1.5) (WHO, 2019).

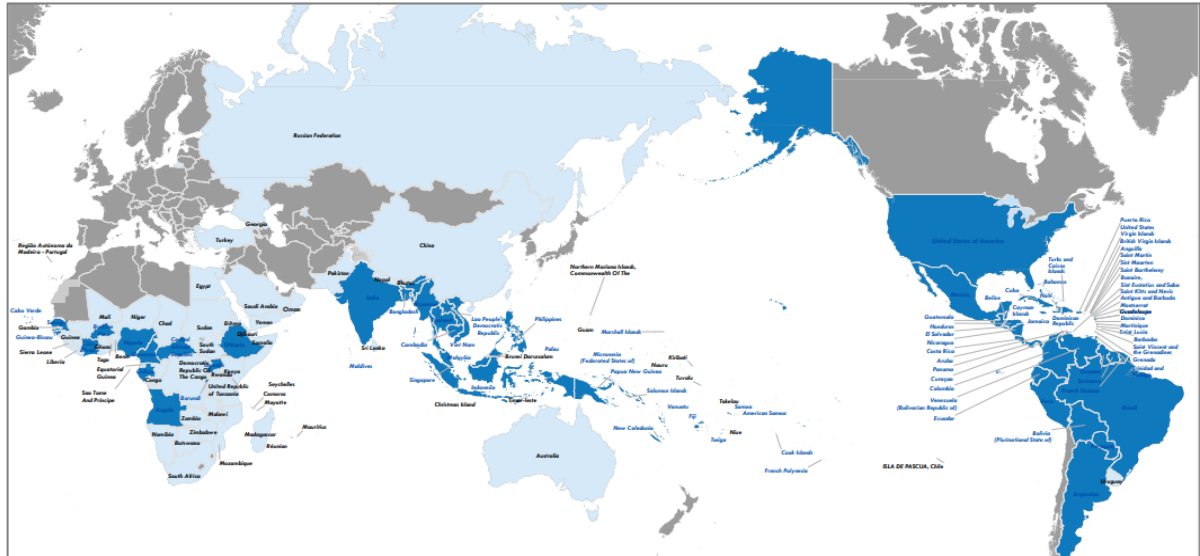


Figura 1.5: Distribuição global do vírus Zika. Países ou territórios que apresentam evidências de transmissão autóctone do ZIKV estão em azul escuro. Países ou territórios com vetor estabelecido, mas sem casos de transmissão autóctone do ZIKV estão em azul claro. Países ou territórios sem casos conhecidos de infecção pelo ZIKV e sem vetor estabelecido estão em cinza escuro. Fonte: WHO, 2019.

O ZIKV possui um único sorotipo, todavia, análises de sequências filogenéticas descrevem duas linhagens principais classificadas em linhagem africana e asiática, com base nas sequências do genoma. Essas análises mostram que variantes do ZIKV isolados da Polinésia Francesa, Camboja e Ilha Yap estão ligados à linhagem asiática do ZIKV, conhecida como cepa americana, e são responsáveis pelas epidemias recentes, inclusive no Brasil (Wang *et al.* 2017). Apesar disso, recentemente um estudo identificou a linhagem africana do ZIKV no Brasil, até então inédita no país e a possibilidade do surgimento de nova epidemia (Kasprzykowski *et al.* 2020). A transmissão vetorial do ZIKV ocorre durante o repasto sanguíneo do mosquito *Aedes* fêmea, quando injeta o vírus na pele humana. Além disso, outras formas de transmissão também são descritas na infecção pelo ZIKV, incluindo: transmissão vertical, sexual e transfusão sanguínea (Barjas-Castro *et al.* 2016; Aagaard *et al.* 2017; Mead *et al.* 2018). O ZIKV ainda pode ser detectado no leite materno, saliva e urina, no entanto, não há evidências de transmissão por meio desses fluidos biológicos (Gourinat *et al.* 2015; Musso *et al.* 2015; Cavalcanti *et al.* 2017).

Semelhante a outros flavivírus, a infecção pelo ZIKV é frequentemente assintomática em aproximadamente 80% dos casos. Quando sintomática, se manifesta com sintomas leves e moderados, muitas vezes confundidos com sintomas de outras infecções como Dengue e Chikungunya, e tais sintomas são conhecidos como Síndrome Dengue-like (doenças semelhantes à Dengue). Os principais sintomas encontrados são febre moderada, dor de cabeça, artralgia, mialgia, erupções cutâneas e conjuntivite, com um período de incubação de

aproximadamente 7 dias (Brasil *et al.* 2016). Alguns pacientes apresentam vômitos, diarreia, fraqueza, dores abdominais, perda de apetite, que, no entanto, são raramente observados (Pielnaa *et al.* 2020). Sintomas graves associados à infecção pelo ZIKV foram raramente observados (Carteaux *et al.* 2016; Karimi *et al.* 2016; Swaminathan *et al.* 2016).

Apesar da doença resultante da infecção pelo ZIKV ser geralmente leve e autolimitada, uma característica marcante da epidemia no Brasil foi o surgimento de complicações neurológicas graves associadas ao ZIKV (Blázquez & Saiz 2016). A Síndrome de Guillain-Barré foi identificada pela primeira vez durante o surto de ZIKV na Polinésia Francesa em 2013 e mais tarde nas Américas. A síndrome de Guillain-Barré (GBS), é uma doença autoimune na qual o sistema imunológico ataca as células nervosas causando perda de mielina, o que resulta em fraqueza muscular, mialgia e paralisia, podendo inclusive levar ao óbito (Pielnaa *et al.* 2020). No Brasil, foi observado aumento na síndrome de Guillain-Barré durante as ondas de 2015 e 2016. Em 2015 foi relatado aumento de 19% nos casos de GBS com comparação aos anos anteriores (WHO, 2017).

Em 2015, o surto de ZIKV no Brasil causou preocupação mundial devido à associação da infecção com aumento de casos de microcefalia. Infecções pelo ZIKV foram associadas a complicações neurológicas denominada síndrome congênita do vírus Zika (CZS), caracterizada por anormalidades cerebrais, incluindo a microcefalia, anormalidades no desenvolvimento do cérebro, anormalidades oculares, músculo esqueléticas, calcificações cerebrais e outras manifestações neurológicas em recém-nascidos cujas mães foram infectadas pelo ZIKV (Barros Miranda-Filho *et al.* 2016). O número de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV aumentou consideravelmente em mulheres grávidas de 2576 casos em 2015 para 23195 casos em 2016 (Oliveira *et al.* 2017). A alta taxa de infecção na população afetada foi um importante fator que contribuiu para a detecção de complicações associadas ao vírus.

O ZIKV atraiu atenção internacional devido a sua rápida expansão mundial, e aumento do número de casos e padrão atípico de ocorrência de microcefalia no Brasil. Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional (ESPIN), encerrada em maio de 2017 (Ministério da Saúde, 2017). Embora o número de infecções pelo ZIKV tenha diminuído nos últimos anos em todo o mundo, o vírus continua sendo uma ameaça à saúde pública devido ao seu potencial de reemergência e ausência de tratamentos (Pierson & Diamond 2020). Dessa forma torna-se importante o conhecimento sobre o vírus e estudos sobre terapias seguras eficazes. Até o momento não há tratamentos antivirais ou vacinas disponíveis para o ZIKV, apenas cuidados paliativos para o alívio dos sintomas como a febre e dores (Petersen *et al.* 2016).

2.7 Biologia do ZIKV

O ZIKV é uma partícula de aproximadamente 50nm, estruturalmente é semelhante a outros membros da família Flavivírus, organizado por um envelope viral composto por uma bicamada lipídica derivada de células hospedeiras e proteínas de membrana. O envelope viral envolve o capsídeo proteico de forma icosaédrica que ancora o material genético. O material genético do ZIKV é constituído por uma fita simples de RNA com polaridade positiva de aproximadamente 11kb de comprimento (Figura 1.6). O RNA viral é composto por duas regiões não codificantes UTR (do inglês *untranslated region*): a extremidade 5' altamente conservada, e uma extremidade 3'. Estas flanqueiam uma única sequência de leitura fase aberta – ORF (do inglês *open reading frame*) que codifica uma única poliproteína, clivada por proteases do hospedeiro do tipo furina, que estão presentes no Golgi, e proteases virais para produzir três proteínas estruturais: Capsídeo (C), membrana (M), envelope (E) e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5, envolvidas na montagem do vírus e replicação viral respectivamente (Figura 1.6) (Liu *et al.* 2010; Heinz & Stiasny 2017).

A superfície da partícula viral é composta por duas proteínas estruturais que atuam na montagem viral, as proteínas M e E presentes na partícula viral madura, e as proteínas prM (precursor de membrana) na partícula viral imatura (Heinz & Stiasny 2017; Sirohi & Kuhn 2017). A proteína E é a principal proteína de superfície do vírion, está envolvida na ligação ao receptor da célula hospedeira, processo de fusão viral, e é um importante fator que determina o tropismo ao tecido, representando um importante fator da patogênese viral (Hasan *et al.* 2018; Valente & Moraes 2019). A proteína C está envolvida no empacotamento do genoma viral, formando o nucleocapsídeo (NC), uma estrutura composta pelo capsídeo e material genético do ZIKV (Tan *et al.* 2020). As proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 estão envolvidas na replicação do RNA viral, se reúnem no retículo endoplasmático (ER) para formar o complexo de replicação viral (VRC) (Nagy & Pogany 2012). Diferentes funções são descritas para as proteínas não estruturais, como virulência e patogenicidade do vírus, e ainda podem desempenhar papel no antagonismo da resposta imune do hospedeiro (Hasan *et al.* 2018; Serman & Gack 2019).

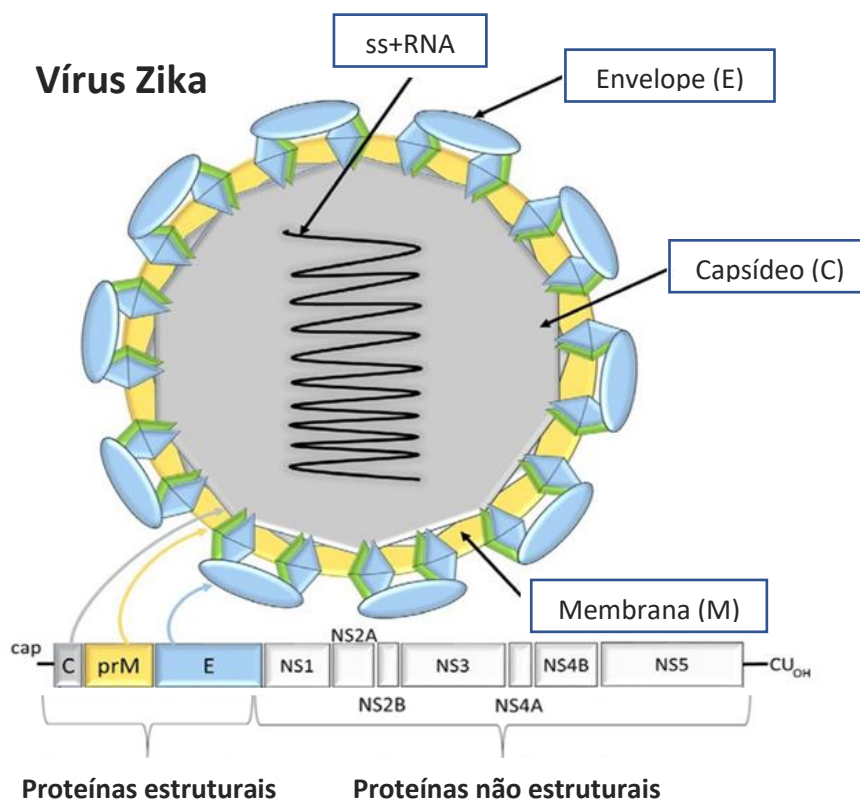


Figura 1.6: Estrutura esquemática e organização do genoma do ZIKV. O vírus Zika é um vírus envelopado, seu genoma é composto por RNA de fita simples, que codifica três proteínas estruturais: capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E), presentes na superfície e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 envolvidas na replicação viral. Fonte: (Adaptado de Alaniz 2019).

2.8 Ciclo de replicação viral na célula hospedeira

O sucesso da infecção viral depende da capacidade do vírus se replicar na célula hospedeira. Esse processo leva a uma reprogramação do metabolismo da célula hospedeira, permitindo que os vírus escapem dos mecanismos de defesa do hospedeiro (Nagy & Pogany 2012). Os flavivírus possuem capacidade de infectar diferentes tipos celulares através da ligação da proteína E com glicosaminoglicanos, proteoglicanos, receptores do tipo integrinas, ou ainda interações entre o envelope lipídico do vírus com receptores de fosfatidilserina (família TAM) e receptores do domínio de imunoglobulina (TIM) presentes na célula hospedeira. Essa interação inicia uma resposta imune no hospedeiro (Lecoin *et al.* 2013).

A replicação do ZIKV é semelhante a outros flavivírus, onde os vírions são internalizados por endocitose mediada via clatrina, que entrega partículas dos vírus ao endossomo. O pH baixo dos endossomos favorece mudanças conformacionais da glicoproteína E resultando em fusão

viral com as membranas da célula hospedeira (Figura 1.8). Após a fusão, ocorre a desmontagem da partícula viral e a proteína do capsídeo é dissociada. Posteriormente o RNA viral de sentido positivo é liberado no citoplasma, transportado para o ER (retículo endoplasmático), onde ocorre a tradução através dos ribossomos da célula hospedeira. A tradução e processamento da poliproteína geram as proteínas envolvidas na replicação viral necessárias para a formação de um complexo replicativo nas membranas do RE e proteínas envolvidas na montagem viral (Neufeldt *et al.* 2018; Pierson & Diamond 2020).

As proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) recrutam o RNA de sentido positivo (RNA⁽⁺⁾), formando um complexo de replicação viral. A replicação é iniciada com a síntese de um RNA intermediário, uma pequena quantidade de RNA de sentido negativo (RNA⁽⁻⁾), gerando intermediários de fita dupla (dsRNA). O RNA⁽⁻⁾ serve como fita molde para a produção de novas fitas de RNA⁽⁺⁾ (RNA genômico) (Nagy & Pogany 2012). A montagem do vírus ocorre no lúmen do RE com proteínas não estruturais e o RNA recém-sintetizado, levando a formação de partículas virais imaturas que contém o precursor de membrana (prM). As partículas imaturas se agrupam e são transportados para o Complexo de Golgi, onde encontram um ambiente ácido que induz alterações conformacionais que levam a reorganização da proteína E, e clivagens da proteína prM (pré membrana) presentes na partícula imatura, gerando a forma madura M necessária para a infectividade do vírion. Esse processo gera partículas virais maduras que serão posteriormente liberadas por exocitose prontas para infectar células vizinhas (Sirohi & Kuhn 2017; Hasan *et al.* 2018; Lee & Shin 2019).

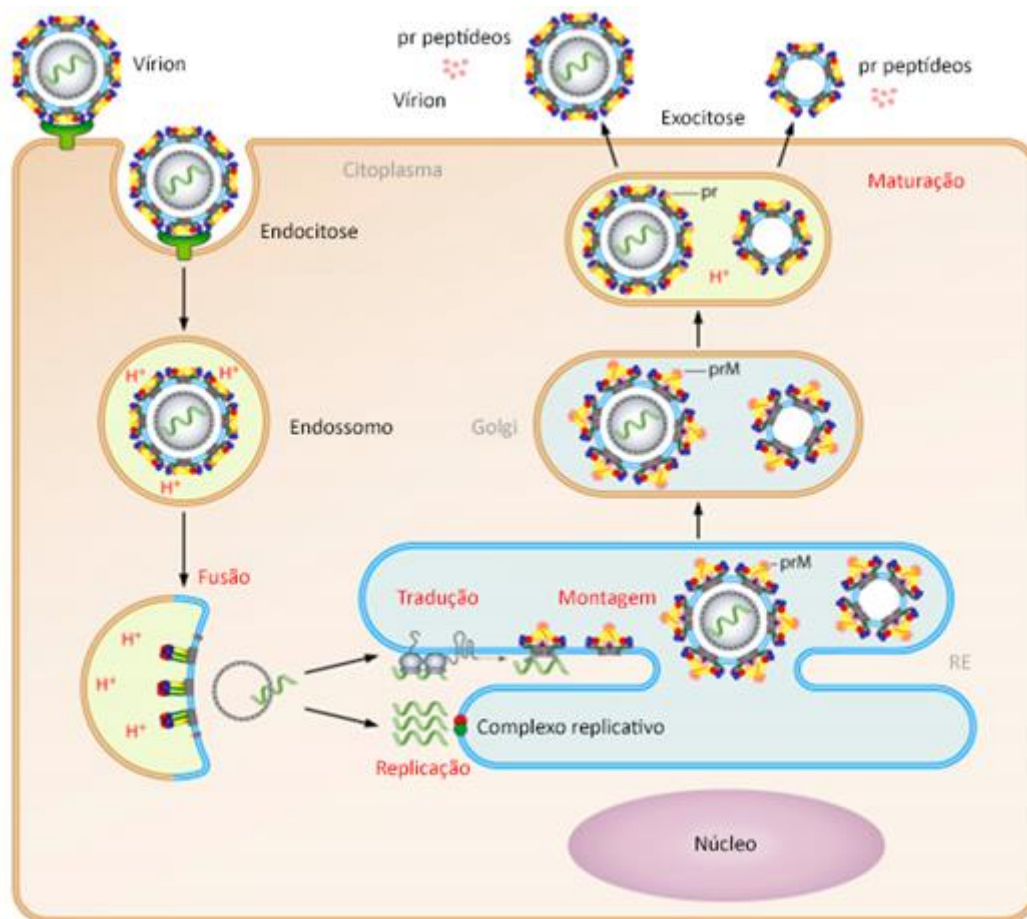


Figura 1.7: Replicação do ZIKV na célula hospedeira. O vírus entra na célula hospedeira por endocitose mediada por receptores. Ocorre fusão da membrana viral desencadeada pelo pH ácido do endossomo e liberação do RNA do vírus no citoplasma da célula, que em seguida é traduzido nas membranas intracelulares. A montagem do vírus ocorre na membrana do retículo endoplasmático (RE), com a formação de víriões imaturos (que expressam a proteína pré membrana -prM). Estes são transportados para o complexo de Golgi onde ocorre a maturação através de clivagens pela protease furina, formando partículas virais maduras que serão liberadas da célula por exocitose. Fonte: (Adaptado de Heinz & Stiasnt *et al.*, 2017).

2.9 Tropismo do ZIKV por diferentes células e tecidos

O que determina o tropismo de um vírus é a expressão diferencial de receptores de superfície celular, e a presença de fatores celulares na célula hospedeira. O ZIKV possui capacidade de infectar diferentes tipos de células de diferentes tecidos, e fluídos corporais (Figura 1.9). A permanência do vírus nesses tecidos contribui para manifestações clínicas e epidemiológicas observadas durante a epidemia (Miner & Diamond 2017). As células alvo iniciais estão localizadas na pele humana onde o vírus é injetado, através da picada do mosquito *Aedes*. Desde modo, a pele representa a primeira linha de defesa, gerando uma resposta imune contra flavivírus (Garcia *et al.* 2017). O ZIKV pode se replicar em queratinócitos, fibroblastos, células de Langerhans (um tipo de células dendríticas especializadas da pele) (Hamel *et al.* 2015). Após ativação, células de Langerhans infectadas migram para os linfonodos onde o vírus

é amplificado, levando ao recrutamento de células mononucleadas (monócitos e macrófagos) que se tornam alvos da infecção viral. Desta forma, a infecção pode se disseminar pelo sistema linfático, resultando em viremia e disseminação do vírus em diferentes órgãos e tecidos (Johnston *et al.* 2000; Garcia *et al.* 2017).

As alterações congênicas associadas ao ZIKV sugerem que o vírus atravessa a barreira placentária. Diferentes estudos mostram a infecção pelo ZIKV em células da placenta humana, entre elas, trofoblastos, células endoteliais fetais, células de Hofbauer (os macrófagos placentários), reduzindo a barreira imunológica placentária e permitindo que o vírus seja transferido para o feto (Bayer *et al.* 2016; Tabata *et al.* 2016; Simoni *et al.* 2017; Wen *et al.* 2017). O ZIKV também infecta células progenitoras neurais induzindo alterações celulares como perturbação do crescimento do sistema neural humano, o que explica sua capacidade de prejudicar o desenvolvimento do cérebro fetal e causar microcefalia em neonatos durante a infecção pela via de transmissão vertical (Tang *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016).

Uma característica da infecção pelo ZIKV é a persistência do vírus em diferentes órgãos. Dentre a capacidade de replicação do ZIKV em diferentes tipos celulares está a capacidade de se replicar de forma persistente nas células oculares, o que pode causar conjuntivite, maculopatia e uveíte. A persistência do ZIKV em células oculares humanas e em modelos animais foi detectada em até 30 dias (Miner & Diamond 2017; Tan *et al.* 2017; Manangeeswaran *et al.* 2018). A persistência do ZIKV também foi relatada em células do trato reprodutor masculino. O RNA do ZIKV foi detectado em espermatozoides e sêmem, com persistência do RNA viral por até 6 meses após o início dos sintomas (Nicastri *et al.* 2016). A infecção pelo ZIKV foi descrita em células dos testículos, incluindo espermatogônias, células de Sertoli, o que resulta na redução da contagem de espermatozoides, destruição da arquitetura testicular, e baixos níveis de hormônios, sugerindo a infecção pelo ZIKV pode não somente afetar a fertilidade, mas também levar à transmissão sexual (Joguet *et al.* 2017; Kumar *et al.* 2018; Mead *et al.* 2018). A persistência do ZIKV ainda é relatada em secreções vaginais e sangue total (Murray *et al.* 2017).

Um estudo de Chan e colaboradores (2016) caracterizou a susceptibilidade de diferentes linhagens de células à infecção pelo ZIKV. Nesse estudo a replicação viral e efeitos citopáticos do ZIKV ocorreram em células neuronais, da placenta, retina, sistema reprodutor e músculo. Recentemente, nosso grupo participou de um trabalho que demonstrou a susceptibilidade de células musculares humanas à infecção pelo ZIKV, dependente do estado de diferenciação (Legros *et al.* 2020).

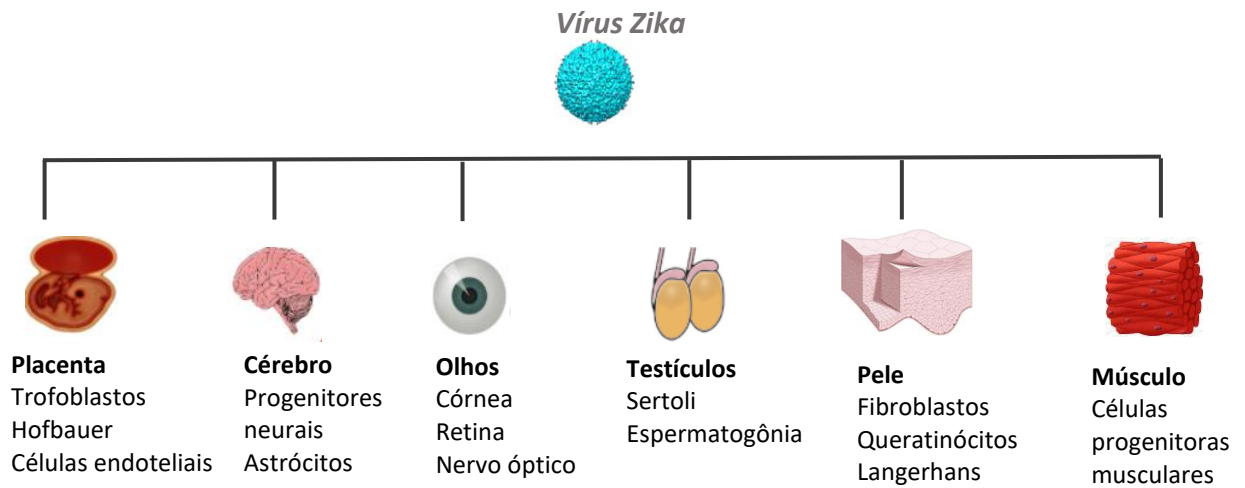


Figura 1.8: ZIKV infecta diferentes tecidos. Estudos com amostras clínicas humanas, modelos animais e análises *in vitro* mostram que o ZIKV infecta células do sistema nervoso, placenta, olhos, pele, trato reprodutivo e músculo esquelético, entre outros. Fonte: (Adaptado de Miner & Diamond, 2017).

1.10 Justificativa

O vírus Zika é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, desde a introdução do vírus nas Américas, se espalhou rapidamente causando milhares de infecções e tornou-se um risco à saúde pública global devido sua capacidade de gerar epidemias explosivas e causar complicações neurológicas, particularmente preocupante as associações da infecção com o aumento de casos da síndrome de Guillain-Barré e microcefalia. Até o momento, não existe terapia aprovada para tratamento de infecções causadas pelo ZIKV (Metsky *et al.* 2017), e ao contrário de outros flavivírus, outras formas de transmissão foram relatadas, tais como a transmissão vertical, sexual e a transfusão sanguínea. Além disso, o extenso tropismo por diferentes células e tecidos, e ainda a persistência do ZIKV nesses locais (Miner & Diamond 2017), demonstram a complexidade desta patologia e a necessidade de melhor conhecer as alterações fisiológicas que o vírus induz, e também melhor compreender como esse vírus infecta e se replica, e quais as vias antivirais que poderiam inibir sua replicação.

Visto que a mialgia é uma característica comum durante a infecção sintomática pelo ZIKV, e que o músculo é um órgão altamente metabólico e produtor de citocinas musculares (miocinas) (Liu & Conboy 2017), processos que “conversam” com outros tecidos e sistemas (como o sistema nervoso central, onde as manifestações da infecção pelo ZIKV parecem ser mais graves), decidimos avaliar o efeito do vírus em células musculares humanas.

Recentemente, em um projeto colaborativo com o Dr. Ciccaldi do Instituto Pasteur (Paris, França. Programa internacional FIOCRUZ-PASTEUR), nosso grupo demonstrou uma susceptibilidade de células musculares humanas à infecção pelo ZIKV, dependente do estágio de diferenciação. As células progenitoras musculares em proliferação (mioblastos), apresentaram infecção produtiva pelo ZIKV, com a detecção da glicoproteína e RNA viral, produção de partículas infecciosas e morte celular programada (Paraptose). Por outro lado, os miotubos (células diferenciadas e fusionadas), foram resistentes à infecção (Legros *et al.*, 2020). Mioblastos em proliferação podem se diferenciar e regenerar uma fibra danificada, mas também podem retornar ao estágio progenitor quiescente (SC). Assim, a infecção não só poderia afetar o processo de diferenciação, como também poderia servir como um reservatório para o vírus. Neste contexto, gostaríamos de avaliar se o ZIKV poderia alterar a sobrevivência, capacidade proliferativa e de diferenciação das células musculares humanas.

Em uma análise de detecção das fitas do RNA viral com polaridade positiva e negativa, observamos a detecção de ambas as fitas em mioblastos infectados pelo ZIKV, enquanto nos miotubos, observamos apenas a fita positiva, sugerindo ausência de replicação do ZIKV nessas

células (Riederer *et al.* Submetido). Esse resultado sugere estudarmos as diferenças nas vias imunes e antivirais entre esses dois tipos celulares.

Para infectar a fibra muscular, o vírus necessariamente atravessa a membrana basal, antes de interagir com componentes da superfície celular. Além disso, alguns patógenos utilizam ligantes e receptores da matriz extracelular para infectar os tecidos (Feire *et al.* 2004; Rajan *et al.* 2018). Dados preliminares do nosso grupo mostram que o ZIKV não utiliza os receptores clássicos, como o AXL para infectar os mioblastos, mas é o receptor do ZIKV para internalização em células epiteliais tínicas (Messias *et al.* 2020). Dados também preliminares mostram uma importante redução da infectividade de mioblastos quando cultivados sobre a isoforma de LM511. Dessa forma pretendemos também avaliar se integrinas, receptores de moléculas da ECM, particularmente a LM, poderiam mediar a entrada do ZIKV nas células musculares.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

Investigar alterações miogênicas e regulação de genes relacionados a respostas imunes antivirais em mioblastos e miotubos humanos expostos ao ZIKV - cepa RIO U1.

2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da infecção pelo ZIKV na proliferação de mioblastos humanos;
- Avaliar o efeito da exposição ao ZIKV na diferenciação de mioblastos humanos;
- Avaliar a expressão de receptores de ECM em mioblastos humanos infectados e o papel da integrina alpha6 na internalização do ZIKV;
- Avaliar genes e vias envolvidos na biologia de mioblastos e miotubos após exposição ao ZIKV;

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Cultivo celular:

Mioblastos humanos imortalizados, foram gentilmente cedidos pelo grupo colaborador francês, coordenado pelo Dr. Vincent Mouly (Paris, França). Os mioblastos da linhagem LHCN-M2 foram cultivados em meio de cultura composto por 4 partes de DMEM e uma parte de meio 199, e fatores de crescimento: dexametasona, fator de crescimento epidérmico (EGF), fetuína, e gentamicina como antibiótico. Esse meio, suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), é o meio de proliferação das LHCN-M2, denominado de KMEM. Para a indução da diferenciação celular (fusão dos mioblastos e formação de miotubos), as células foram cultivadas em meio KMEM + 20% de SFB até atingirem alta confluência, e posteriormente o meio de proliferação (KMEM) foi substituído pelo meio de diferenciação, composto pelo meio DMEM sem SFB, suplementado com insulina recombinante humana.

As células LHCN-M2, mantidas em nitrogênio líquido, foram descongeladas em banho-maria a 37°C e ressuspensas em meio KMEM suplementado com 20% de SFB. As células foram cultivadas em temperatura de 37°C e 5% de CO₂ atmosférico em placas de Petri de 100mm para obtenção da confluência. Durante a manutenção dos mioblastos, a passagem ocorreu a cada 3 dias e foram cultivados na concentração de 2x10⁵ células/placa. Os mioblastos (células em proliferação celular) foram mantidos em aproximadamente 70% de confluência a fim de evitar a diferenciação celular. Para a formação de miotubos, o meio de proliferação celular foi substituído pelo meio de diferenciação celular após a cultura atingir alta confluência.

| Reagentes | Concentração | Nº Catálogo/fabricante |
|---------------------------------|--------------|------------------------|
| Meio DMEM high glucose | 4 partes | Cat.10566 - Gibco |
| Meio 199 | 1 parte | BR300006 05 - LGC |
| EGF recombinante humano | 5ng/mL | PHG0023 ThermoFisher |
| bFGF recombinante humano | 0,5ng/mL | PHG0024 ThermoFisher |
| Fetuína | 25µg/mL | 10344 026 – Gibco |
| Dexametasona | 0,2µg/mL | D4902 – Sigma |
| Soro fetal bovino | 20% | 12657029- Gibco |
| Gentamicina | 50µg/mL | 15750060- ThermoFisher |
| Insulina | 5 µg/mL | 91077C-1G- Sigma |

Tabela 3.1: Reagentes utilizados na produção de meio de cultura para proliferação e diferenciação celular.

3.2 Infecção em células Vero:

A cepa do ZIKV Rio-U1 utilizada neste estudo foi isolada da urina de um paciente no Rio de Janeiro, em 2016 (Bonaldo *et al.* 2016), e foi gentilmente cedida pela Dr^a Myrna Bonaldo (Laboratório de Biologia Molecular de Flavivírus – IOC/Fiocruz). Células Vero foram mantidas em meio RPMI 10% de SBF e cultivadas em placas de 6 poços com 2×10^5 células por poço. Alíquotas do vírus foram diluídas nos MOIs 0,1 e 1, em meio RPMI sem SBF e adicionados às células. As placas foram incubadas durante 1 hora em 37°C. Em seguida, foi removido o sobrenadante e células foram mantidas em meio RPMI com 2,5% de SFB. Após 72 horas de infecção foi realizada a análise por citometria de fluxo.

3.3 Infecção em mioblastos humanos pelo ZIKV:

Mioblastos foram cultivados em placa de 6 poços na concentração de 4×10^4 células por poço em meio de proliferação (KMEM+20% SFB) e após 24h amostras do ZIKV (nas multiplicidades de infecção (MOI) 0,1 ou 1) foram diluídas em meio KMEM contendo 4 partes de DMEM e 1 parte do meio 199, com 5% de SFB (soro fetal bovino) e adicionadas às células. As placas foram incubadas durante 2 horas a 37°C. Em seguida, o sobrenadante com o vírus não adsorvido foi removido e o meio KMEM com 20% de soro bovino fetal foi adicionado e as células expostas aos ZIKV mantidas a 37°C. Após 72 horas de infecção, foram realizadas as análises por citometria de fluxo. Como controle (denominado MOCK), as células foram cultivadas nas mesmas condições descritas acima, sem a exposição ao vírus.

3.4 Infecção em miotubos (mioblastos diferenciados) e análise de fusão:

Os mioblastos foram cultivados em alta confluência (concentração de 5×10^5 células/poço) em placas *Lab Teks permanox* de 8 poços em meio de proliferação celular. Para indução de formação de miotubos, o meio de proliferação celular foi substituído pelo meio de diferenciação celular 24 horas após o cultivo das células. Após 3 dias nas condições de diferenciação celular, as células em diferenciação foram expostas ao ZIKV no MOI 0,1 (alíquotas diluídas em meio KMEM como descrito acima) por 2 horas. Após 72 horas, foram realizadas as análises por Imunofluorescência. Para análise do índice de fusão celular, os miotubos foram corados com anticorpo anti-cadeia pesada de miosina para a marcação de células diferenciadas e DAPI para visualização nuclear. O índice de fusão foi calculado pela relação de núcleos presentes em células positivas para miosina e núcleos totais no campo.

Para facilitar o entendimento dos protocolos de cinética de cultivo e tratamento com o vírus, foi realizado um desenho experimental:

Infecção em mioblastos:

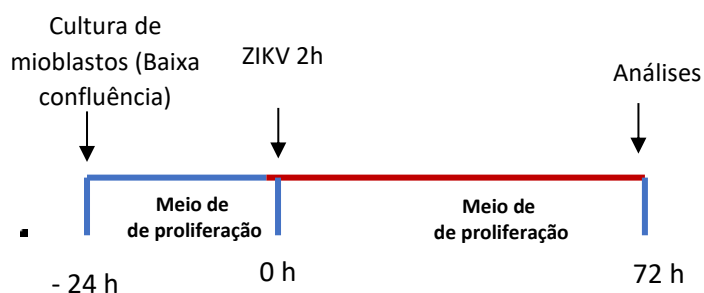


Figura 3.1: Desenho esquemático representando o momento de infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos *in vitro* e ponto de análise. MOI 0,1 ou 1 de infecção.

Infecção em miotubos:

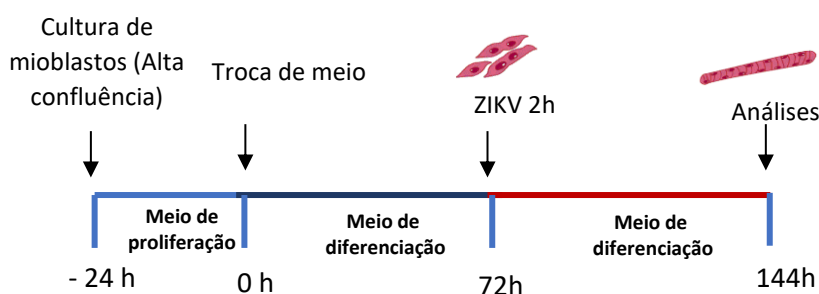


Figura 3.2: Desenho esquemático representando o momento de infecção pelo ZIKV em miotubos (3 dias diferenciação) *in vitro* e ponto de análise. MOI 0,1 e 1 de infecção.

3.5 Imunofluorescência para análises da miogenicidade em cultura e diferenciação celular após exposição pelo ZIKV:

Mioblastos e miotubos foram cultivados em Lab-Teks permanox de 8 poços e infectados nas condições descritas anteriormente. Após 72 horas de infecção, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS por 15 minutos em temperatura ambiente e permeabilizadas com tampão de permeabilização (0,1% de saponina + 1% BSA em PBS) por 20 minutos. Em seguida, as células foram incubadas em solução de bloqueio (0,3% Triton, 2% BSA, 0,2% soro de cabra) por 20 minutos em temperatura ambiente. Logo após, as amostras foram incubadas com anticorpo primário 4G2 ou Anti-desmina por 1 hora e anticorpo secundário Alexa Flúor 488 e Alexa Flúor 546 por 30 minutos. Para a marcação nuclear foi utilizado o intercalante de DNA Dapi (Life) por 10 minutos. Para a detecção de proliferação e diferenciação, foram utilizados anticorpos anti-ki67 (Conjugado com fluoróforo - Alexa flúor

488) durante 30 minutos de incubação, e anti-cadeia pesada de miosina (clone MF20), e 4G2 para detecção do antígeno viral (1 hora de incubação). A coloração foi revelada com anticorpo secundário Alexa flúor 488 e Alexa flúor 546 respectivamente. Após coloração, as células foram lavadas com tampão de permeabilização seguida da coloração para marcação nuclear com DAPI por 10 minutos. Após as lavagens, as lâminas foram montadas utilizando Prolong Gold antifade e analisadas por microscopia de fluorescência. Os controles negativos foram marcados com anticorpo secundário apenas, ou controle isotipo que não geram coloração significativa. Para a análise microscópica das reações de imunofluorescência, imagens foram obtidas em microscópio confocal Leica (TCS SP8) e microscópio Axio imager A2. Foram analisados 5 campos de cada experimento em triplicata. As análises foram realizadas através do software Image/J.

3.6 Citometria de fluxo para análises de proliferação e detecção de integrinas:

Após infecção, mioblastos foram tripsinizados (Trypsina/EDTA) para remoção das células aderentes e transferidos para placa de 96 poços com fundo U. Em seguida, foram centrifugados a 400G, em temperatura de 4°C, durante 5 minutos e lavados com PBS 1X. Para a marcação de antígenos intracelulares, mioblastos foram fixados utilizando o tampão de fator de transcrição nuclear True-nuclear (Biolegend) por 40 minutos a 4°C e lavados utilizando tampão de permeabilização Perm Buffer (Biolegend). Após o bloqueio com soro humano por 20 minutos, as células foram incubadas com o anticorpo primário 4G2 (Biomanguinhos/Fiocruz, RJ) por 1 hora e anticorpo secundário anti-mouse Alexa fluor 546 por 30 minutos em temperatura de 4°C. O anticorpo 4G2 reconhece a glicoproteína E do envelope do vírus. Para detectar a expressão do marcador de proliferação celular, mioblastos foram incubados com o anticorpo anti-ki67 Alexa flúor 488 (BD Biosciences) por 30 minutos a 4°C.

Para a marcação de moléculas de superfície, visando a detecção da expressão dos receptores de matriz extracelular após centrifugação nas condições descritas acima, mioblastos foram lavados com PBS e incubados por 30 minutos a 4°C com anticorpos anti-integrinas α 3-CD49c PE, α 4-CD49d PE, α 5-CD49e PE e α 6-CD49F PE (BD Biosciences). Para a detecção da molécula N-CAM foi utilizado o anticorpo CD56 PE (BD Biosciences) em incubação por 30 minutos a 4°C. Células foram ressuspensas em formaldeído 2% para aquisição no citômetro FACS Canto II (BD Biosciences). Os resultados foram analisados através do Software FlowJo V10.

| Anticorpos/reagentes | Concentração | N° Catálogo/fabricante |
|---------------------------------|------------------------------------|--|
| 4G2 Anticorpo monoclonal | 1/200 | 160916S000H4G2P Biomanguinhos/Fiocruz |
| Anti-ki67 human AF488 | 1/20 | BDB55861 |
| Anti-human CD49c | 1/5 | BD556025 |
| Anti-human CD49d | 1/10 | BD560972 |
| Anti-human CD49e | 1/10 | BD555617 |
| Anti-human DC49f | 1/5 | BD55536 |
| Anti-CD56 human | 1/25 | BD555516 |
| Kit Fix & Perm | Fix Perm: 1/4 Perm Buffer: 1/10 | BioLegend 424401 |
| Dapi | 1/20000 | D9542-Sigma |
| Anti-desmina | 1/100 | AB1520-Abcam |
| CD56 PE | 1/2,5 | 555516-BD |
| Alexa Flúor 488 | 1/200 | AF11001 |
| Alexa Flúor 546 | 1/200 | AF11003 |

Tabela 3.2: Anticorpos e reagentes utilizados para marcações por citometria de fluxo e imunofluorescência.

3.7 Bloqueio do receptor integrina alpha-6:

Mioblastos foram cultivados em placas de 12 poços na concentração de 10^4 células por poço e infectados como descrito acima. O bloqueio da subunidade de integrina $\alpha 6$ foi realizado na presença do anticorpo monoclonal específico (GoH3 $10\mu\text{g/mL}$ BD) por 30 minutos, a fim de bloquear a interação da integrina $\alpha 6$ com a LM. Em seguida, mioblastos foram infectados no MOI 0,1 com ZIKV nas condições mencionadas anteriormente. Após 72 horas foi realizada análise da infecção por citometria de fluxo.

3.8 Extração de RNA:

Mioblastos foram cultivados em placas de Petri 150mm na concentração de 10^6 células e infectadas pelo ZIKV após 24 horas conforme descrito anteriormente. Após 72 horas de infecção, foi realizado a extração de RNA em mioblastos MOCK e infectados utilizando o RNAeasy Plus Mini kit (Qiagen) seguindo instruções do fabricante. A pureza e concentração do RNA foram detectadas pelo espectrofotômetro Nanodrop. A integridade do RNA foi verificada através do Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

3.9 Preparação e sequenciamento do transcriptoma:

O sequenciamento do RNA foi realizado para comparar o perfil de expressão de mioblastos e miotubos após a exposição pelo ZIKV e seus controles MOCK. O preparo das bibliotecas e sequenciamento foram realizadas no Laboratório de computação científica (LNCC). Do RNA total, 1 µg foi usado para preparar 12 pequenas bibliotecas de RNA com o kit TruSeq Small RNA Library Prep (Illumina, EUA). O protocolo foi seguido conforme descrito pelo fabricante, com exceção da etapa de purificação de construção de cDNA, que foi realizada usando cassete de gel de agarose a 3% para alvos entre 100 bp - 250 bp em um sistema BluePippin (Sage Science, EUA). 500 ng dos mesmos RNAs totais foram usados para preparar 12 bibliotecas de transcriptoma com o Kit de preparação de amostra de RNA total de cadeia TruSeq com Ribo-Zero Gold (Illumina). Para verificar os tamanhos das bibliotecas, foi usado um sistema 2100 Bioanalyzer com o kit Agilent High Sensitivity DNA (Agilent). As bibliotecas foram quantificadas por qPCR usando um KAPA Library Quantification Kits para plataformas Illumina (KAPA Biosystems, EUA). O sequenciamento foi realizado em um sistema NextSeq 500 (Illumina). Para as pequenas bibliotecas de RNA, foi usado um kit NextSeq 500/550 High Output v2 (75 ciclos) e foram obtidas leituras de extremidade única de 1x50 bp. Para as bibliotecas de transcriptoma, usamos um kit NextSeq 500/550 High Output v2 (150 ciclos) e foram obtidas leituras emparelhadas de 2x75 bp.

4.10 Análise do transcriptoma: A análise do transcriptoma foi realizada no Laboratório de computação científica (LNCC). A qualidade das leituras foi inspecionada por FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) e o filtro de qualidade e corte das leituras foi realizado utilizando o programa Trimmomatic (Bolger *et al.* 2014). A ferramenta STAR- versão 2.6 (Dobin *et al.* 2012), foi usada para mapear as bibliotecas de transcriptoma no genoma humano (GRCH38.p12) do banco de dados ENSEMBL (<https://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) utilizando os parâmetros padrão. As pequenas bibliotecas de RNA foram mapeadas nos precursores de microRNA (versão 22 de miRBase) (<https://www.mirbase.org/>) com a ferramenta Bowtie2- versão 2.2.1 (Langmead, B & Slazberg, 2012), usando os parâmetros “very-sensitive-local” e “norc”. O pacote DESeq2 (Love, M. I. Huber, W. & Anders. S. 2014) de R foi usado para análise de expressão diferencial de genes utilizando três réplicas biológicas.

3.11 Análise de enriquecimento de função: A maioria das análises de enriquecimento foram realizadas graças ao desenvolvimento de uma plataforma de análises pelo LNCC (<https://biotools.labinfo.lncc.br/muscle.zika>), em colaboração com o grupo da Dr^a Ana Tereza Vasconcelos. A mesma estará disponível após a publicação do artigo submetido em anexo.

Pacotes do R estão listados na plataforma (GOstats, Reactome PA) possibilitando a análise de enriquecimento de função. Para avaliar as propriedades em um conjunto de genes, as análises de enriquecimento de função foram realizadas usando anotações do GO (do inglês *Gene ontology*) (Ahsburner et al. 2000), KEGG (do inglês *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) e Via Reactome (Reactome Pathway) (Fabregat et al. 2018). Essas análises permitem verificar se os genes aplicados no experimento biológico são funcionalmente relevantes, bem como, descobrir funções realizadas entre esses genes (Glass & Girvan 2014). A análise de enriquecimento baseado em termos GO permite identificar o enriquecimento em aspectos da biologia incluindo, processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares. Esta identifica a hierarquia entre os genes classificados em diferentes categorias, mas não possibilita a identificação da relação funcional dos genes no mesmo termo. Enquanto as análises de enriquecimento baseadas em anotações KEGG e Reactome permitem identificar o enriquecimento de função nas vias biológicas, estabelecendo hierarquia entre os genes pertencentes à mesma via biológica, e identificação funcional dos genes relacionados às mesmas vias. Para tal, as análises foram realizadas utilizando o método do valor p ajustado através do método de Benjamini & Hochberg (BH) e os cortes para p-valor em 0,01 e p-valor ajustado em 0,05.

3.12 Análise estatística de dados – citometria de fluxo e imunofluorescência: Após obtenção dos resultados, os dados brutos foram reunidos em tabelas no programa Excel. A análise dos resultados dos valores obtidos estatisticamente foi realizada utilizando o teste T-test, foram considerados significativos o P-valor menor que 0,05 ($p < 0,05$). As análises foram realizadas através do programa GraphPad Prism8.

4. RESULTADOS

4.1 Avaliação da miogenicidade, proliferação e diferenciação dos mioblastos humanos LHCN-M2 *in vitro*

Para investigar as alterações biológicas e os mecanismos de suscetibilidade e resistência do músculo esquelético à infecção pelo ZIKV, utilizamos um modelo *in vitro* de miogênese muscular humana, no qual os mioblastos em proliferação podem ser diferenciados em miotubos. Para tal, utilizamos a linhagem de mioblastos humanos LHCN-M2, imortalizada pelo grupo do Dr. Vincent Mouly (Instituto de Miologia Sorbonne Université, Paris, França) (Zhu *et al.* 2007). Inicialmente, avaliamos a pureza miogênica desta linhagem celular, a fim de confirmar a manutenção da sua miogenicidade e excluir possíveis contaminantes na cultura, como fibroblastos. Para tal, foi analisada a expressão dos marcadores CD56 e desmina, ambos os marcadores miogênicos ausentes em fibroblastos (Illa *et al.* 1992; Paulin *et al.* 2004). O anticorpo CD56 detecta a molécula N-CAM, uma molécula de adesão neural presente em mioblastos e miotubos (Illa *et al.* 1992). Desmina é uma proteína do citoesqueleto, um filamento intermediário exclusivo das células musculares (Paulin *et al.* 2004). A figura 4.1A representa a estratégia de análise utilizada para exclusão de agregados celulares, e separação da população de mioblastos pelo tamanho e granulosidade. A figura 4.1 B mostra a expressão de CD56 na população de mioblastos selecionada na figura 4.1A. Os resultados indicam a expressão positiva para CD56 em aproximadamente 95% das células (Figura 4.1 B). Além disso, observamos a expressão de desmina por imunofluorescência (Figura 4.1 C-E), confirmando o perfil miogênico dos mioblastos imortalizados – LHCN-M2.

Uma vez definida a qualidade miogênica das nossas culturas, fomos avaliar, por imunofluorescência, a capacidade de proliferação e diferenciação celular dos mioblastos humanos. Os mioblastos LHCN-M2 fazem uma média de 0,7 divisões por dia quando em meio de proliferação. A figura 4.2 A mostra que a maioria desses mioblastos se encontra em ciclo celular, visto a positividade para o marcador KI67 (verde). KI67 é uma proteína nuclear expressa durante as fases do ciclo celular S, G2 e principalmente mitose, mas ausente na fase G0, que define as células em quiescência (Dzulkifli *et al.* 2018).

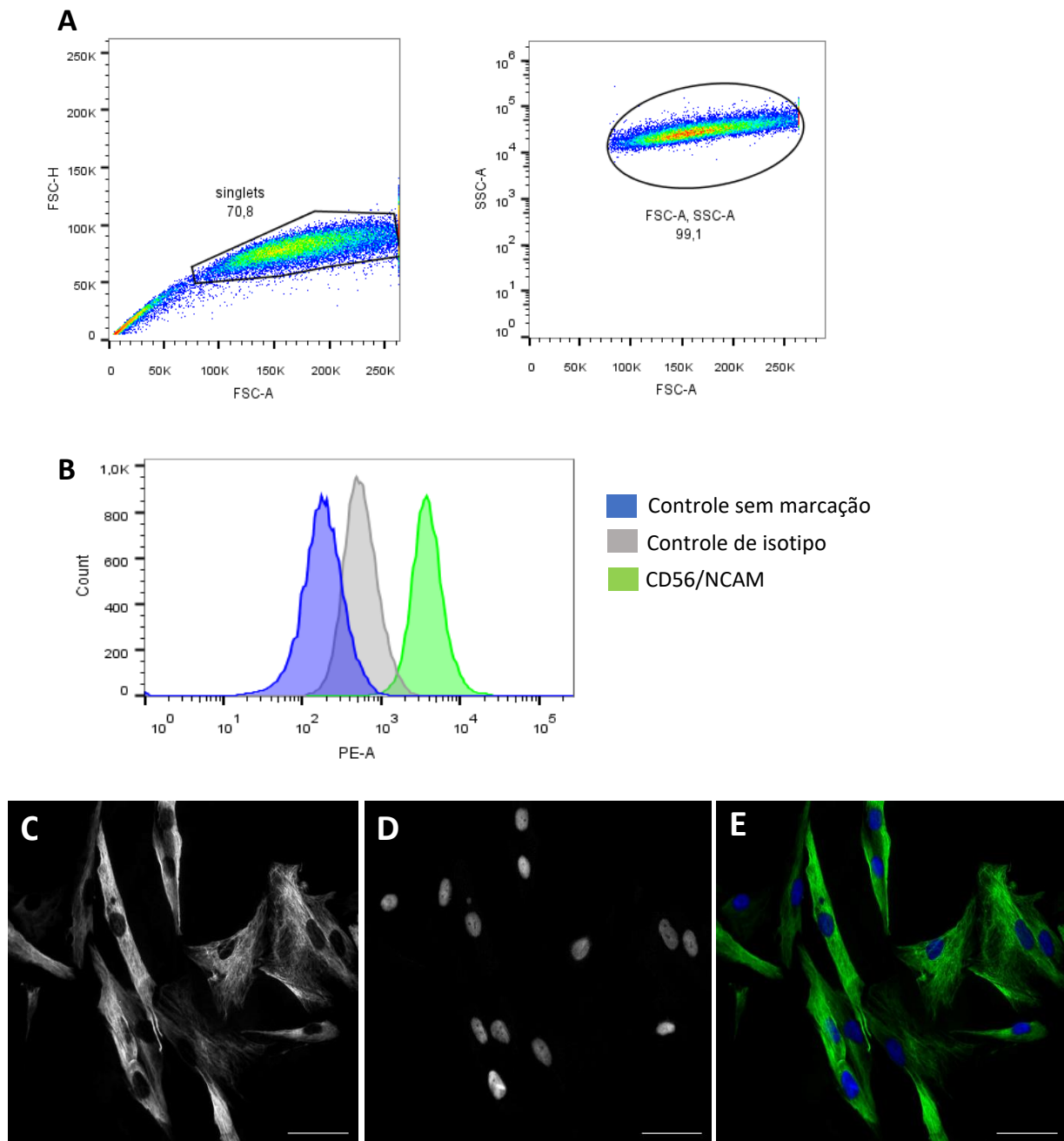


Figura 4.1: Miogenicidade de mioblastos humanos LHCN M2. A-B: Figuras representativas da análise dos mioblastos por citometria de fluxo. A: O dotplot da esquerda mostra a região utilizada para seleção de células não agregadas (singlets), e consequente exclusão de agregados celulares. O dotplot da direita mostra a região utilizada para a seleção da população de mioblastos através dos parâmetros de tamanho e granulidade. B: Histograma mostrando a marcação para CD56/NCAM (verde), o controle de isotipo (cinza) e o controle sem marcação (azul). C-D: Imunofluorescência para detecção de desmina em mioblastos. C: Expressão de desmina; D: Marcação dos núcleos celulares; E: Sobreposição das imagens C e D mostrando a marcação de desmina em verde e os núcleos corados com DAPI em azul. Barras de escala: 50µm.

Para avaliar se essas células são capazes de se diferenciar e se fundir, mioblastos foram cultivados em alta confluência em meio de proliferação celular, e posteriormente foram cultivados por 5 dias em meio de diferenciação. Utilizando o anticorpo monoclonal MF20, que reconhece a cadeia pesada de miosina no músculo, que é expresso em células musculares

diferenciadas (Liu *et al.* 2019). Observamos que essas células se diferenciam e formam grandes e multinucleados miotubos, confirmando a capacidade miogênica dessa linhagem (Figura 4.2 B).

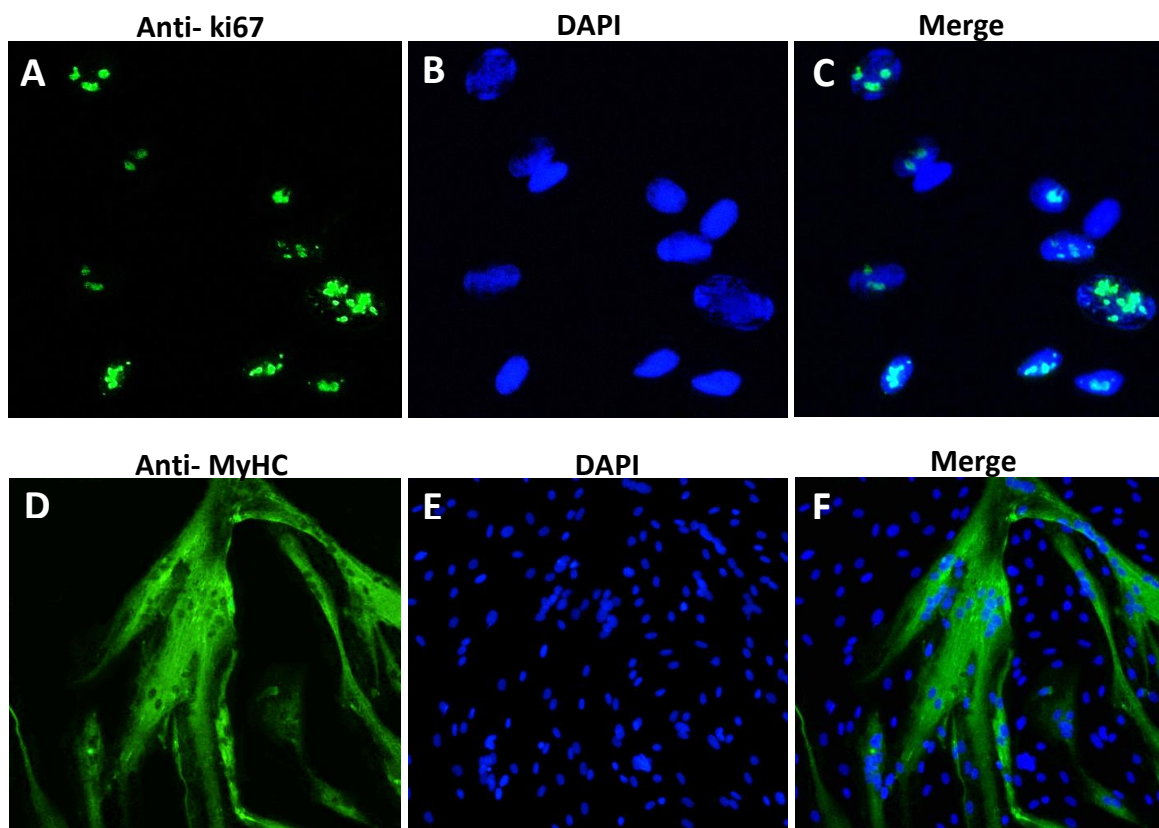


Figura 4.2: Mioblastos humanos proliferam e fusionam em cultura. A-C: Imunofluorescência mostrando a marcação para ki67 em verde (A) e núcleos corados em azul (B) em mioblastos humanos cultivados por 24 horas em meio de proliferação. C: Sobreposição das imagens A e B. Magnificação 400x. D-F: Imunofluorescência mostrando a marcação para cadeia pesada da miosina (anticorpo anti-MyHC) após 5 dias de diferenciação celular respectivamente. D: miosina em verde; E: núcleos corados com DAPI em azul; F: sobreposição das imagens D e E. Magnificação 200x.

4.2 Mioblastos humanos são susceptíveis à infecção pelo ZIKV

Para os experimentos de infecção pelo ZIKV, realizamos inicialmente uma padronização em células Vero (que são utilizadas como controle positivo de infecção nesse estudo). Sabe-se que essas células são permissíveis a infecções virais, incluindo o ZIKV (Chan *et al.* 2016). Células Vero são células epiteliais derivadas dos rins de macacos verdes africanos, e são frequentemente utilizadas para produção viral devido sua alta capacidade para reprodutibilidade viral (Prescott *et al.* 2010). Para tal objetivo, células vero foram incubadas com ZIKV durante 1 hora com os MOIs (Multiplicidade de infecção) 0,1. A proteína de envelope viral foi detectada

após 24 horas de infecção por citometria de fluxo, utilizando o anticorpo monoclonal 4G2 que reconhece epítomos da glicoproteína E no ZIKV e outros flavivírus. Nossos resultados mostram a positividade da expressão para o marcador viral 4G2, com mais de 70% de taxa de infecção (Figura 4.3).

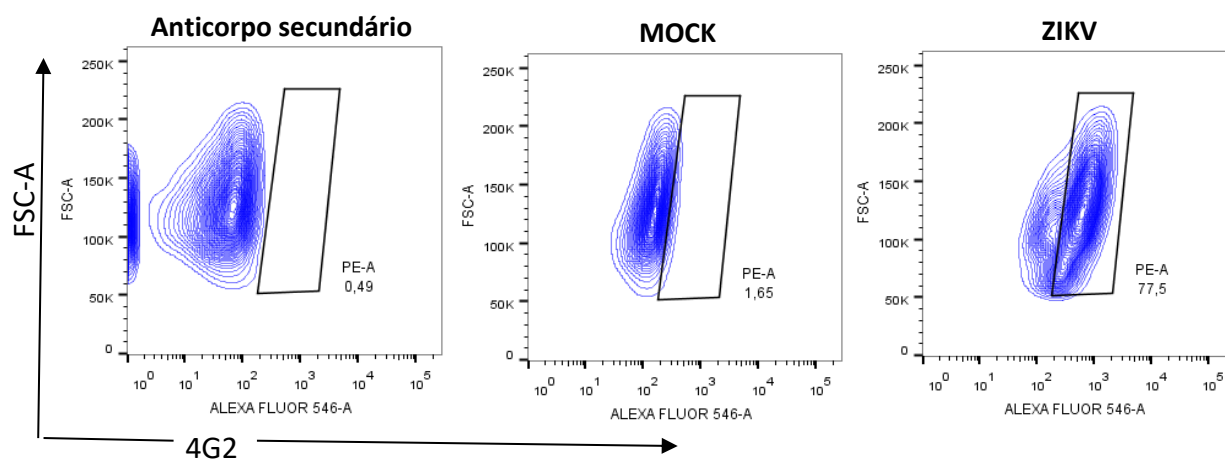


Figura 4.3: Infecção de células Vero pelo ZIKV. Dotplot representativo da marcação da glicoproteína E do envelope viral (marcada com o anticorpo 4G2) nas células controles MOCK (dotplot central), e nas células infectadas pelo ZIKV (dotplot à direita). O dotplot a esquerda mostra o controle de marcação do anticorpo secundário sem a presença do anticorpo 4G2. As células foram analisadas por citometria de fluxo após 24 horas de infecção (MOI 0,1). N=2.

Uma vez confirmada a capacidade miogênica dos mioblastos humanos LHCN-M2 e o potencial de infectividade do isolado Rio-U1, decidimos padronizar o modelo de infecção do ZIKV em mioblastos humanos LHCN-M2. Os mioblastos foram incubados com o ZIKV durante 2 horas nos MOIs 0,1 e 1. Após 72 horas, a expressão da proteína E do envelope viral foi avaliada por citometria de fluxo através da marcação com anticorpo 4G2. Observamos que mioblastos humanos são suscetíveis à infecção pelo ZIKV, através da marcação da proteína viral com anticorpo 4G2, com um percentual acima de 50% de infecção em ambos os MOIs utilizados (Figura 4.4 A, B), corroborando dados anteriores do nosso grupo (Legros *et al*, 2020).

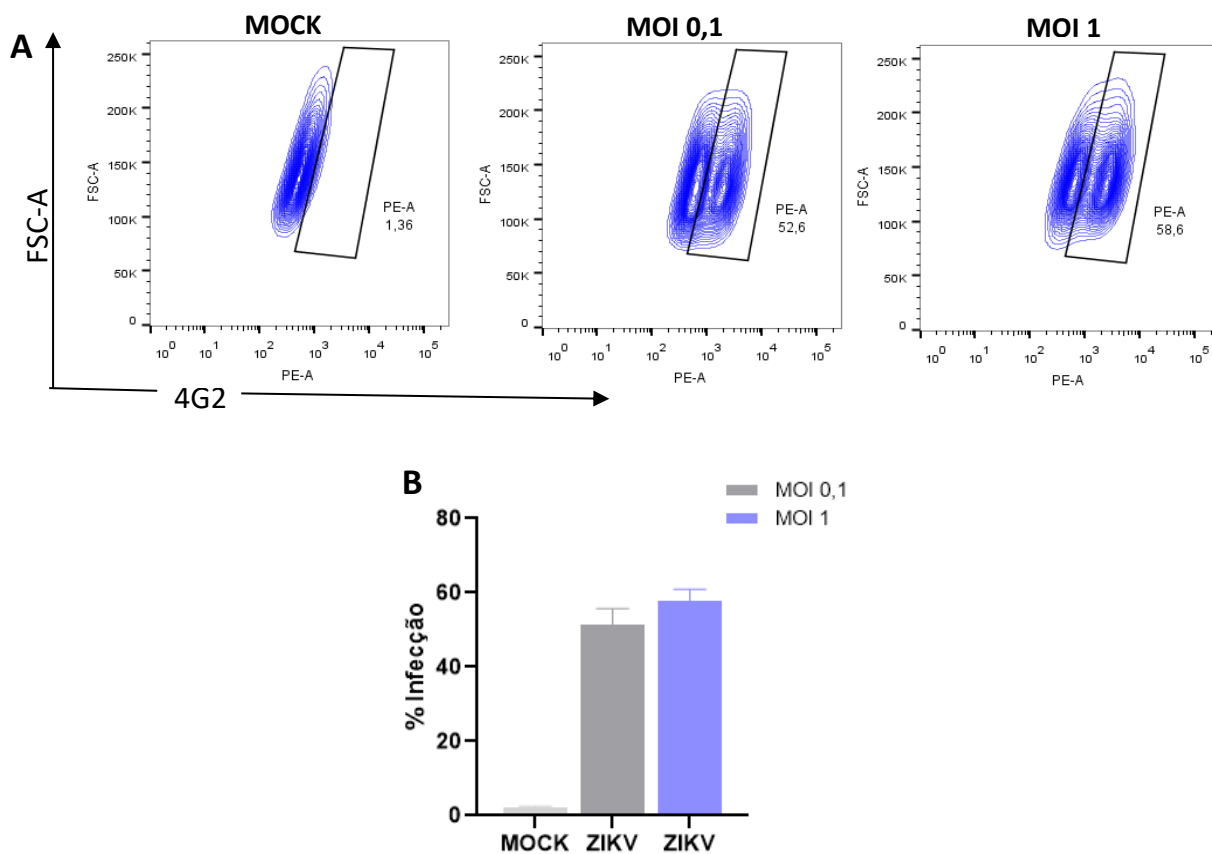


Figura 4.4: Mioblastos humanos são suscetíveis a infecção pelo ZIKV. **A:** Mioblastos foram infectados com diferentes diluições do ZIKV (MOI 0,1 e 1) e analisados por citometria de fluxo 72h pós infecção. **A:** Dotplots representativos da marcação da glicoproteína E do envelope viral (com anticorpo 4G2) nas células controles MOCK (dotplot à esquerda), e nas populações de células infectadas com os MOIs de 0,1 (dotplot do meio) e 1 (dotplot da direita). **B:** Gráfico de barras mostrando a média (\pm desvio padrão) do percentual de infecção dos mioblastos. N=2.

4.3 Infecção pelo ZIKV afeta o ciclo celular em mioblastos humanos

A infecção pelo ZIKV induz, além das respostas antivirais, mudanças em diferentes respostas celulares, tais como sobrevivência, morte, metabolismo e proliferação (Tang *et al.* 2016; Zhang *et al.* 2016; Messias *et al.* 2020; Muthuraj *et al.* 2021). Observamos em nossos ensaios que os mioblastos infectados não apresentaram alterações morfológicas evidentes. Para determinar se a infecção pelo ZIKV altera a capacidade regenerativa dos mioblastos humanos, decidimos avaliar a expressão do marcador Ki67 nos mioblastos infectados. O Ki67 é ausente nas células satélites (quiescentes), e dessa forma poderíamos avaliar se o ZIKV também seria capaz de interferir no processo de renovação do pool de células progenitoras, além de prover indícios de que essas células poderiam servir como um reservatório para o ZIKV. Para tal objetivo, os mioblastos foram infectados em diferentes MOI de infecção (0,1 e 1) e analisados quanto à expressão do marcador de proliferação celular ki67, após 72 horas de infecção pelo

ZIKV. Observamos uma redução da população $ki67^{high}$ dentre os mioblastos infectados quando comparados aos controles MOCK (Figura 4.5 A, B). Observamos ainda a redução da intensidade média de fluorescência (MFI) para o marcador Ki67 nos mioblastos infectados quando comparados ao controle MOCK em ambos MOIs de infecção (Figura 4.5 C). Em conjunto, esses dados sugerem que a infecção pelo ZIKV pode levar à redução da proliferação celular em mioblastos humanos. A redução da população $Ki67^{high}$ nas células LHCN-M2 sugere que o ZIKV esteja interferindo na fase de mitose do ciclo celular (Dzulkipli *et al.* 2018), dessa forma retardando ou impedindo a divisão celular

. Esses achados corroboram com a literatura, que aponta, entre as consequências da infecção pelo ZIKV, a inibição da proliferação e parada do ciclo celular, resultando em desregulação do crescimento em tecidos neurais e tímicos (Tang *et al.* 2016; Messias *et al.* 2020).

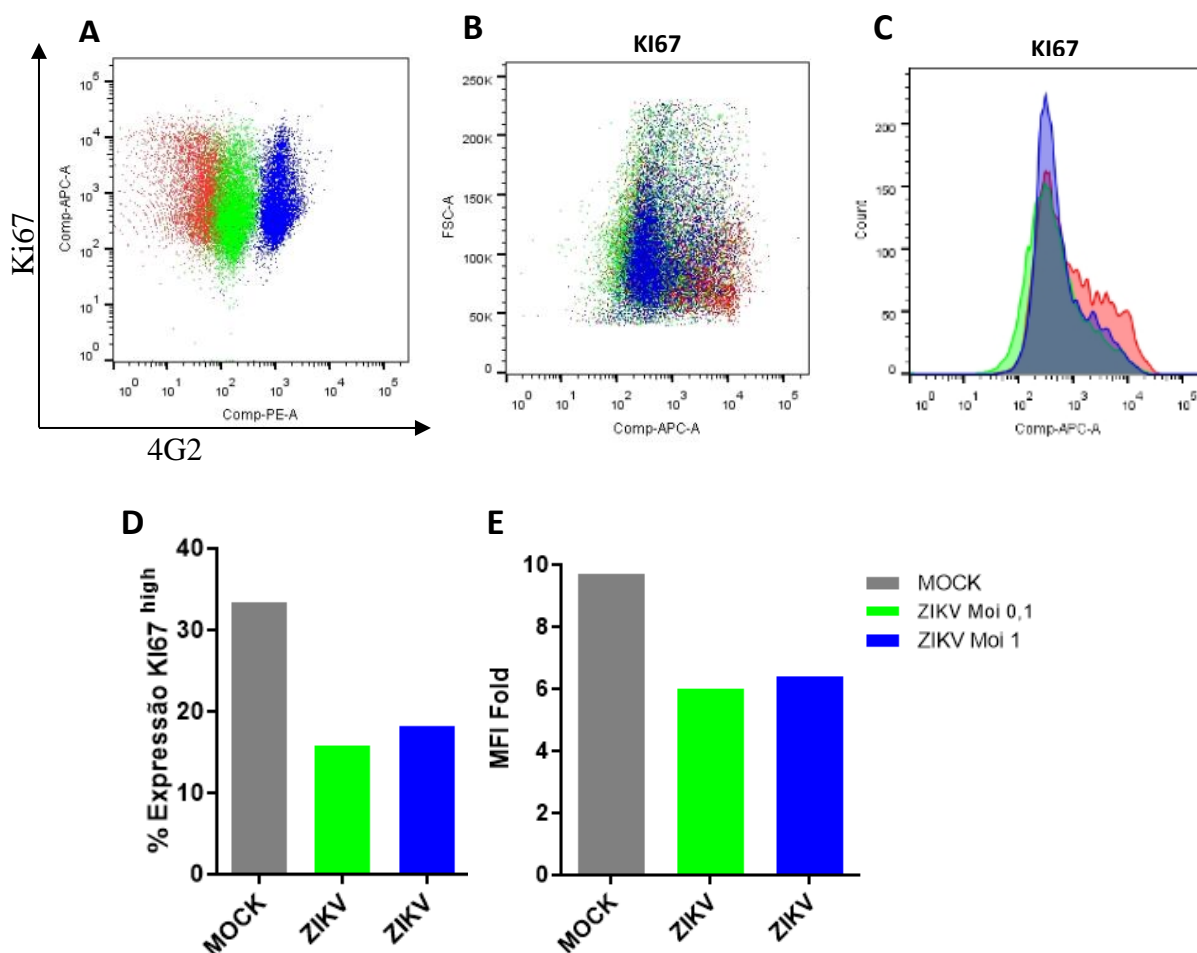


Figura 4.5: Infecção pelo ZIKV afeta o ciclo celular em mioblastos humanos. Mioblastos foram infectados no MOI 0,1 (verde) e 1 (azul) e analisados após 72 horas de infecção por citometria de fluxo. A proteína viral e o marcador de proliferação foram detectados utilizando anticorpos 4G2 (secundário Alexa Flúor 546) e anti-ki67 APC por citometria de fluxo. MOCK (vermelho). **A:** Dotplot representativo mostrando população positiva para o marcador viral 4G2 e o marcador de proliferação celular ki67. **B:** População positiva para ki67 em mioblastos infectados e MOCK. **C:** Overlay representativo para população ki67 positiva. **D:** Porcentagem da expressão da população $ki67^{high}$ em mioblastos infectados (MOI 0,1 e 1) e MOCK **E:** Mediana da intensidade de fluorescência (fold change) nas células infectadas pelo ZIKV (MOI 0,1 e 1) e MOCK em 72hpi. N=1

4.4 Infecção pelo ZIKV modula a diferenciação de mioblastos humanos

A diferenciação e fusão dos mioblastos é um passo crítico na miogênese, capaz de gerar fibras maduras multinucleadas, um processo chave na adaptação e reparação do músculo (Demonbreun *et al.* 2015). Entre as alterações celulares induzidas pelo ZIKV está descrita a capacidade de interferir na diferenciação de células progenitoras neurais e organoides (Ferraris *et al.* 2019). A fim de investigar o efeito da infecção pelo ZIKV nos mioblastos diferenciados, realizamos a análise das células musculares após a sua exposição ao ZIKV. Para tal, mioblastos foram cultivados em alta confluência por 24 horas, e posteriormente o meio de cultura de proliferação foi substituído pelo meio de indução de diferenciação celular, ou seja, o meio de cultura sem SFB, mas suplementado com insulina, para induzir a fusão das células musculares. As células permaneceram durante 72 horas nas condições de diferenciação celular, nessa etapa as células diferenciadas foram expostas ao ZIKV no MOI 0,1 e 1, e após mais 72 horas, as células foram analisadas. As células foram analisadas totalizando 6 dias de diferenciação celular.

Observamos que os miotubos expostos ao ZIKV não apresentaram a expressão da proteína viral 4G2 (Figura 4.6 A, Riederer *et al.*, 2021, artigo submetido, em anexo), corroborando dados anteriores do nosso grupo (Legros *et al.* 2020). Ao realizar as análises morfológicas nas células diferenciadas que foram incubadas com o ZIKV durante a diferenciação, não observamos efeitos citopáticos na cultura, mesmo quando expostos ao MOI 1 (Figura 4.6 B, C). Além disso, aparentemente, os miotubos das culturas incubadas com ZIKV eram maiores ou mais fusionados (figura 4.6 A). Para confirmar esse efeito, os miotubos expostos ao ZIKV, assim como o controle MOCK, foram analisados por imunofluorescência, para avaliar a expressão do marcador de diferenciação celular utilizando-se o anticorpo anti-MyHC (MF20), que reconhece a miosina do músculo (Figura 4.6 D, E). A figura 4.6 F mostra o índice de fusão de miotubos incubados com ZIKV em relação ao MOCK. Ao realizar a contagem de número de núcleos por miotubos, ou seja, os núcleos fusionados, observamos aumento da formação de miotubos maiores (contendo acima de 100 núcleos) e uma diminuição de pequenos miotubos (contendo de 2 a 5 núcleos) nas culturas expostas ao ZIKV. Não foram observadas diferenças na quantidade de núcleos totais nas culturas diferenciadas expostas ao ZIKV quando comparada ao controle MOCK. Em conjunto, esses dados indicam aumento de fusão, e não uma maior quantidade de mioblastos que poderiam gerar mais células diferenciadas (Figura 4.6 G, H).

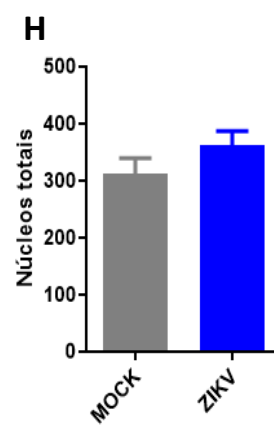
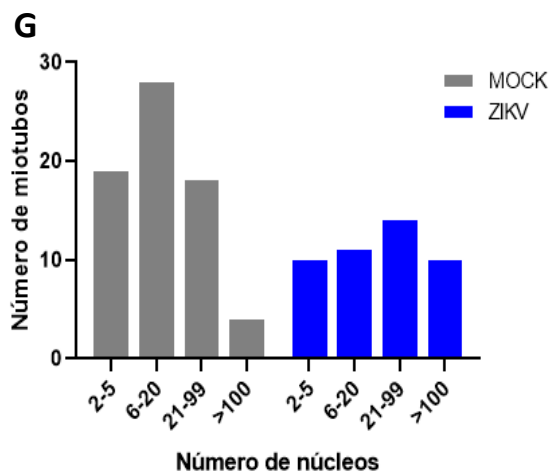
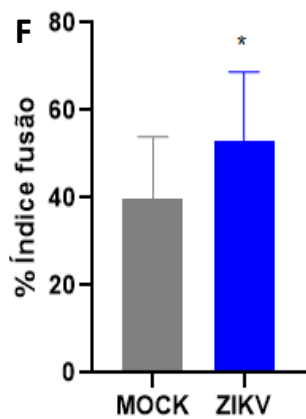
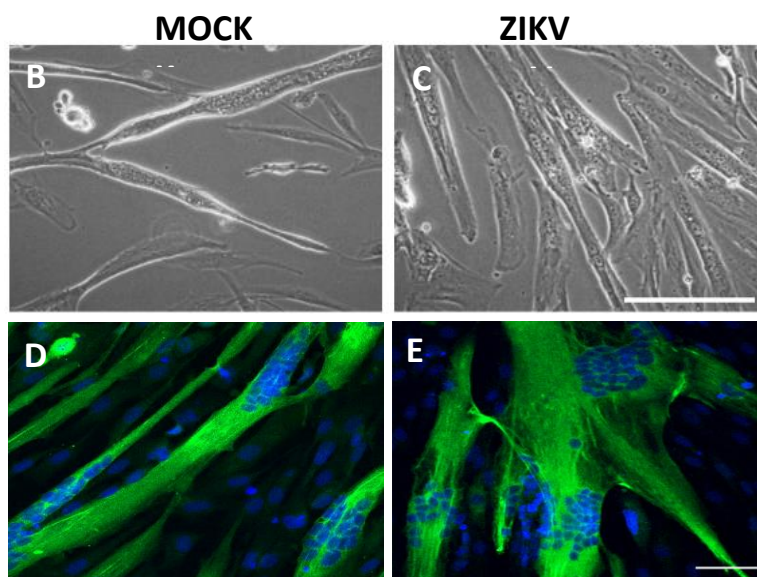
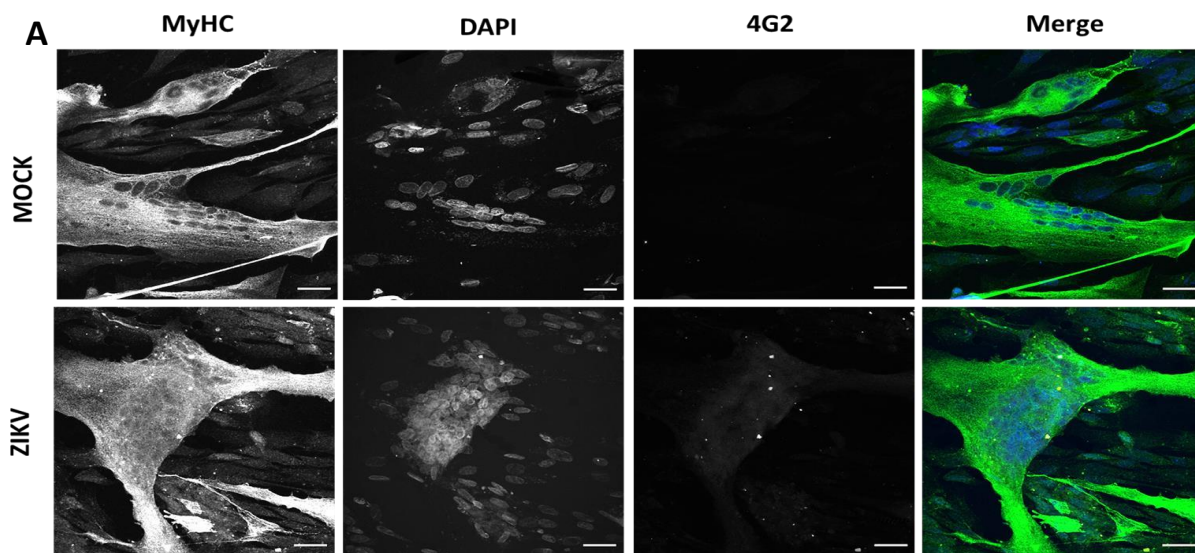


Figura 4.6: Fusão dos mioblastos após infecção pelo ZIKV *in vitro*. **A:** Miotubos em diferenciação por 72 h foram expostos ao ZIKV (MOI 0,1) e mantidos por mais 72h em diferenciação. A imunofluorescência mostra miotubos diferenciados identificados com o anticorpo anti-cadeia pesada de miosina (MyHC) em verde, e ausência de proteínas virais (que estariam em vermelho pela marcação com anticorpo 4G2). Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (em azul). Barra de escala: 100µm. **B-C:** Morfologia de miotubos MOCK e expostos ao ZIKV por microscopia óptica observada em campo claro. Magnificação: 400x. Barra de escala: 100µm **D-E:** Imagens representativas de miotubos expostos ao ZIKV identificados com o anticorpo anti-MyHC em verde. Os núcleos celulares foram marcados com DAPI (em azul). Magnificação: 200x. Barra de escala: 100µm. **E:** Gráfico de barras mostrando a média (\pm desvio padrão) do percentual do índice de fusão dos miotubos expostos ao ZIKV e MOCK. O índice fusão foi calculado através da contagem dos núcleos dentro dos miotubos em relação ao número total de núcleos. **F:** Relação de núcleos por miotubos em células expostas ao ZIKV e MOCK. Análise realizada em triplicata com o auxílio do programa Image J. N=1.

4.5 Infecção pelo ZIKV não modula a expressão de integrinas em mioblastos

A Integrina $\alpha7\beta1$ é um dos principais receptores de LM no músculo. A ausência da cadeia $\alpha2$ de LM, componente das isoformas 211 e 221, ou da cadeia $\alpha7$ de integrina, causam graves distrofias musculares em humanos e modelos animais (Santer *et al.* 1997; Sframeli *et al.* 2017). Um resultado preliminar do nosso grupo mostrou que mioblastos cultivados sobre a isoforma de LM-511, que é expressa predominantemente em miotubos, tiveram uma importante redução na taxa de infecção pelo ZIKV. A interação da célula com a ECM, via receptores de superfície como as integrinas, estimula diversos efeitos biológicos nas células, incluindo aumento da sobrevivência (Yurchenco 2015). Além disso, integrinas são moléculas que atuam como receptores ou correceptores na internalização de diferentes vírus, incluindo herpesvírus, hantavírus, rotavírus, adenovírus, ebola, entre outros (Za *et al.* 2000; Feire *et al.* 2004; Hussein *et al.* 2015; Rajan *et al.* 2018).

Tendo em vista estes relatos sobre interação viral com integrinas, além da importância dessas moléculas na fisiologia muscular, decidimos investigar a expressão de integrinas em mioblastos humanos infectados. As LHCN-M2 foram analisadas após 72 horas de infecção (MOI 0,1) por citometria de fluxo. Contudo, não observamos diferença na expressão das cadeias $\alpha3$ e $\alpha6$, que podem formar as integrinas VLA-3 e VLA-6 (receptores para LM), e as cadeias $\alpha4$ e $\alpha5$, que podem formar as integrinas VLA-4, VLA-5 (receptores de Fibronectina- FN) em mioblastos infectados pelo ZIKV, quando comparados às células controles não infectados (grupo MOCK) (Figura 4.7). Esses dados sugerem que a expressão dessas integrinas não é afetada em mioblastos humanos após a infecção pelo ZIKV. Porém, será também importante avaliar o perfil de ativação das integrinas, visto que não só a quantidade, mas também a mudança conformacional dos receptores, que é importante para desencadear a sinalização intracelular, necessária para que ocorra uma dada função efetora.

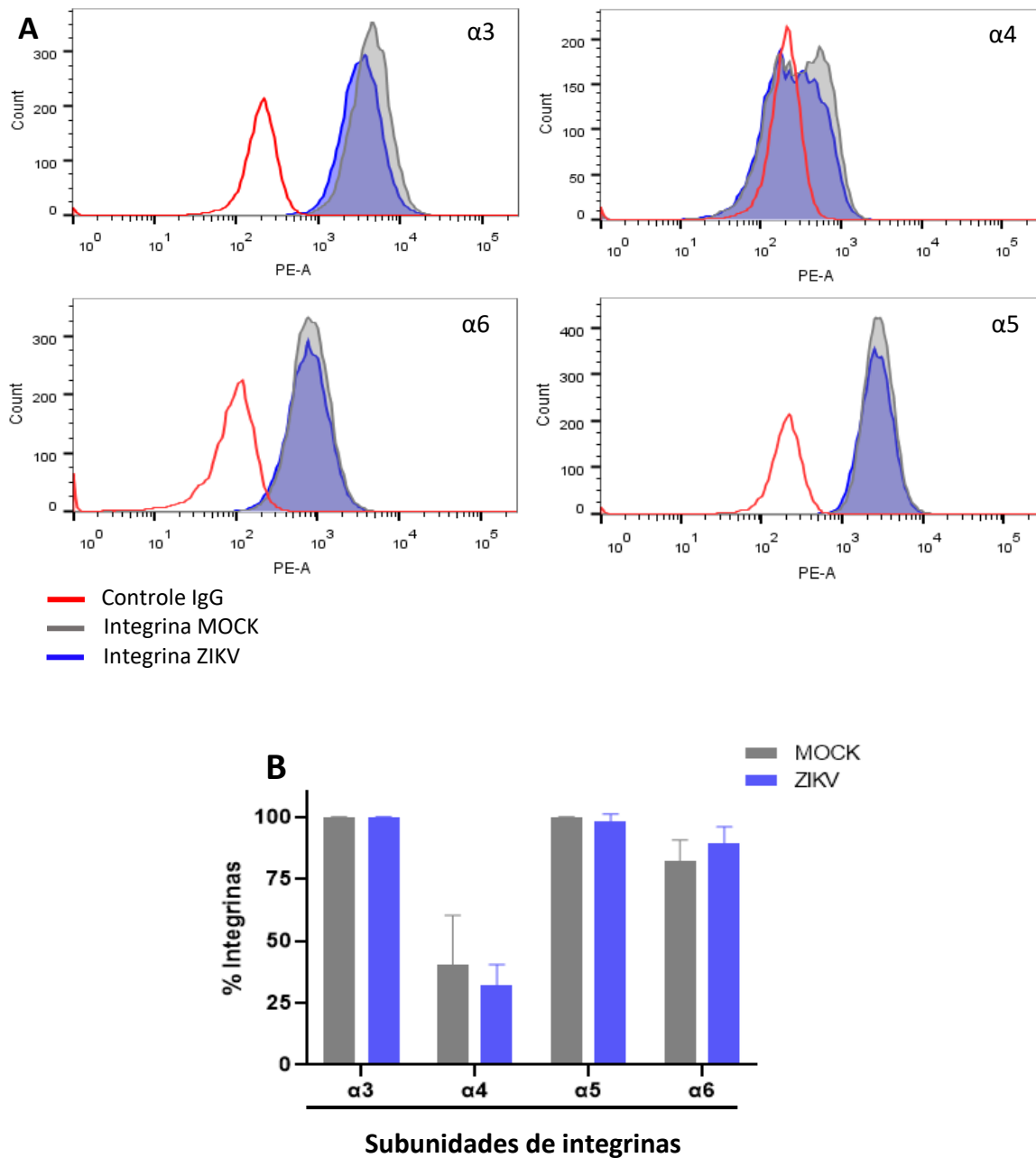
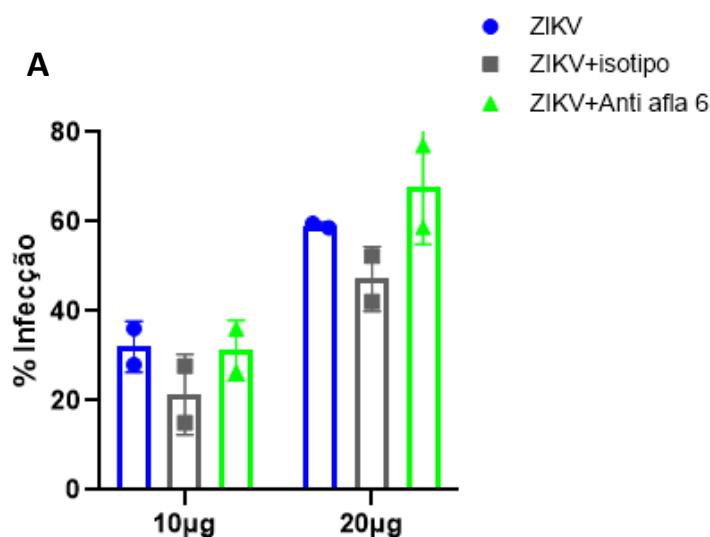


Figura 4.7: A Infecção pelo ZIKV não modula a expressão de integrinas em mioblastos humanos. A: Histogramas representativos da expressão de sub-unidades de integrinas analisadas por citometria de fluxo, utilizando os anticorpos CD49c-PE (cadeia $\alpha 3$), CD49d-PE (cadeia $\alpha 4$), CD49e-PE (cadeia $\alpha 5$), CD49f-PE (cadeia $\alpha 6$) após 72 horas de infecção em mioblastos. **B:** Porcentagem de mioblastos expressando as cadeias $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ e $\alpha 6$ de integrina após 72h de infecção (MOI 0,1). Dados representados pela média (\pm desvio padrão) do percentual. N=3.

4.6 O bloqueio do receptor de LM integrina $\alpha 6$ não inibiu a infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos

O reconhecimento do vírus pelas células alvo, e sua entrada na célula, dependem da interação entre proteínas de superfície do vírus e componentes da membrana plasmática da célula. A permissividade de uma célula à infecção viral é determinada pela presença de receptores e vias de entrada, mas também pela presença de proteínas e outros fatores celulares que favorecem ou inibem a replicação viral (Filippone *et al.* 2020). Buscando avaliar quais os receptores estariam envolvidos na infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos, nosso grupo observou que mioblastos LHCN-M2 expressam o receptor AXL, mas o bloqueio deste receptor, com anticorpo monoclonal bloqueador, não inibiu a infecção indicando que AXL não é responsável pela entrada do ZIKV nos mioblastos humanos (Dado não publicado).

Visto que a integrina $\alpha 6$ é a molécula mais pleiotrópica entre os receptores de LM, podendo se ligar à maioria das isoformas, decidimos avaliar se o bloqueio dessa interação modula a infectividade pelo ZIKV em mioblastos humanos. Mioblastos humanos foram pré-tratados com o anticorpo monoclonal anti-integrina $\alpha 6$ (clone GoH3) nas concentrações 10 μ g/mL e 20 μ g/mL e posteriormente as células foram infectadas pelo ZIKV (MOI 0,1). Como controle, as células foram tratadas com controle de isotipo, ou não receberam nenhum tratamento. Após 72 horas de infecção, a porcentagem da população positiva para o marcador viral 4G2 foi analisada por citometria de fluxo. Não observamos diferenças na morfologia e na porcentagem da infecção nos mioblastos após bloqueio do receptor integrina $\alpha 6$ em relação aos grupos controles infectados; sem tratamento e controle de isotipo, em ambas as concentrações analisadas (Figura 4.8).



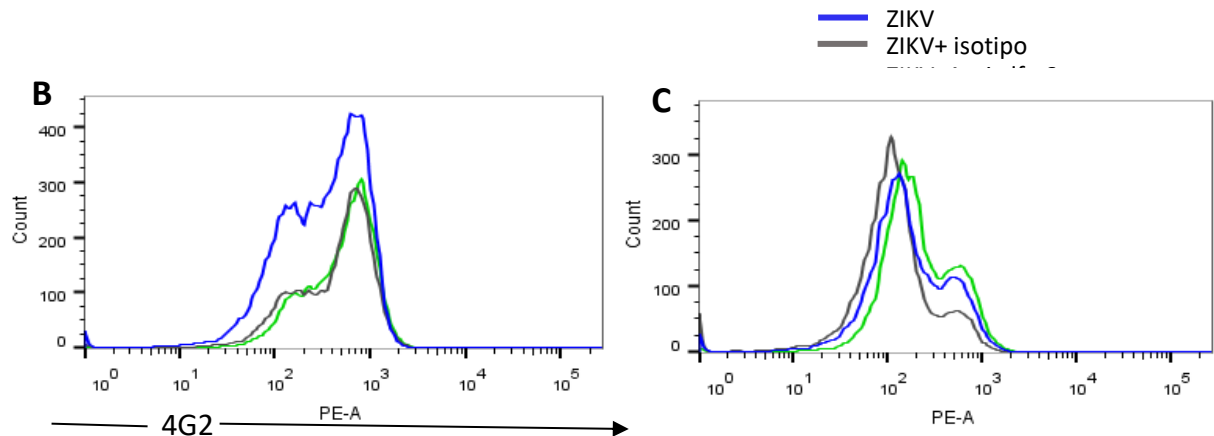


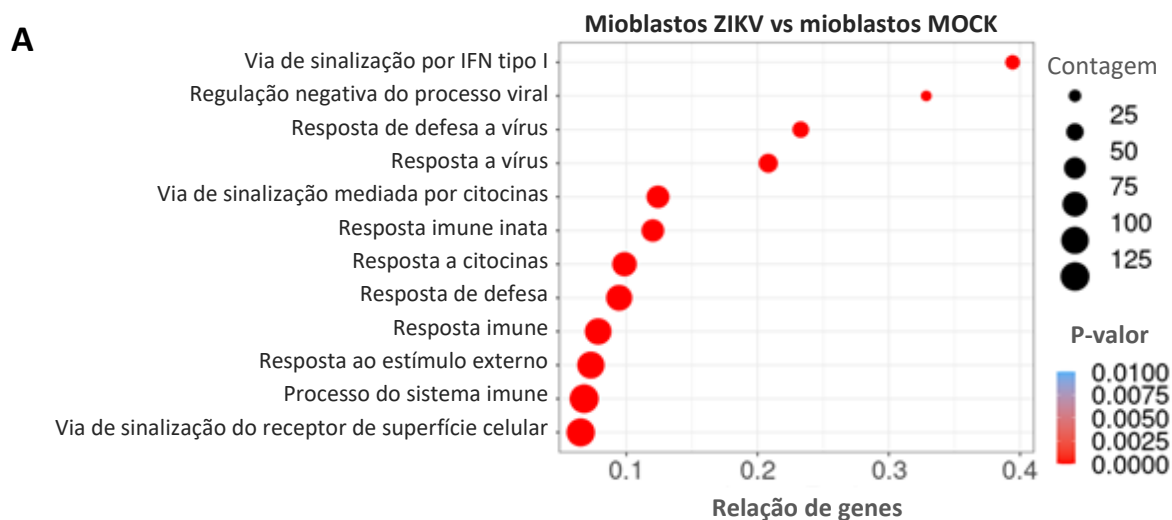
Figura 4.8: O bloqueio da integrina $\alpha 6$ não inibiu a infecção de mioblastos humanos pelo ZIKV. Mioblastos foram pré-tratados com anticorpo bloqueador anti- $\alpha 6$ por 30 minutos nas doses de $10\mu\text{g/mL}$ e $20\mu\text{g/mL}$, infectados com ZIKV (MOI 0,1), e analisados por citometria de fluxo após 72 horas. **A:** Média (\pm desvio padrão) do percentual de mioblastos infectados pós-tratamento com anticorpo anti- $\alpha 6$ ou controles que receberam tratamento com IgG não relacionada ou sem tratamento. Os pontos representam os resultados de experimentos independentes. **B-C:** Histogramas representativos mostrando a marcação com anticorpo 4G2 em mioblastos infectados pelo ZIKV após bloqueio com anti- $\alpha 6$ a $10\mu\text{g/mL}$ (**B**) e $20\mu\text{g/mL}$ (**C**) (verde), e os controles infectados sem tratamento (azul) e tratados com isotipo (cinza).

4.7 ZIKV induz alterações nos perfis transcricionais em mioblastos e miotubos relacionados com a resposta imune antiviral

Como mencionado anteriormente, nosso grupo participou de um estudo que mostrou que células musculares esqueléticas são infectadas pelo ZIKV. Além disso, foi demonstrado que a infecção é dependente do estado de diferenciação da célula muscular, onde células indiferenciadas em proliferação (mioblastos) são susceptíveis, enquanto células diferenciadas e fusionadas (miotubos) são resistentes (Legros *et al.* 2020). A partir dessas observações, resolvemos investigar o perfil transcricional dos dois tipos celulares, mioblastos e miotubos, após exposição ao ZIKV, e seus controles, a fim de não só entender alterações fisiológicas que o ZIKV pode causar nas células musculares, mas também encontrar pistas que possam explicar a resistência/permisividade destas células. Nesse cenário, foi realizado o sequenciamento do RNA total em mioblastos e miotubos expostos ao ZIKV (MOI 0,1) e controles MOCK. O perfil transcricional foi analisado 72 horas após a exposição de mioblastos e miotubos ao ZIKV. Identificamos grande número de genes diferencialmente expressos (DEGs) após a infecção pelo ZIKV, com p-valor ajustado $<0,01$ e \log_2 Fold Change >1 , nas comparações entre mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK e miotubos ZIKV vs miotubos MOCK. Um total de 509 genes foram regulados positivamente em mioblastos infectados e 1,390 genes foram regulados positivamente em miotubos expostos ao ZIKV, quando comparados aos seus controles MOCK.

Por outro lado, 206 foram regulados negativamente em mioblastos infectados e 589 genes em miotubos (Riederer et al. submetido).

Para identificar processos biológicos alterados em mioblastos e miotubos após a exposição pelo ZIKV, analisamos o enriquecimento de função com base nas anotações de termos GO (do inglês Gene Ontology). Os genes diferencialmente expressos foram divididos em dois grupos baseados na modulação de expressão (positiva ou negativa) e submetidos separadamente a uma análise de enriquecimento de função. Tais análises foram realizadas na plataforma do LNCC (http://biotools.labinfo.lncc.br/muscle_zika), e permitiram identificar 194 termos enriquecidos nos genes regulados positivamente em mioblastos infectados e 548 termos em miotubos expostos ao ZIKV. Escolhemos os 12 termos mais significativamente enriquecidos, com maior confiabilidade estatística, para avaliar as principais alterações dos processos biológicos enriquecidos em mioblastos e miotubos expostos ao vírus. Observamos um enriquecimento de termos relacionados à resposta de interferon tipo I, resposta a citocinas, resposta imune inata, resposta a estímulos externos, e processos do sistema imune em mioblastos expostos ao ZIKV (Figura 4.9 A). Surpreendentemente, esses mesmos termos também foram detectados entre os 12 mais enriquecidos em miotubos expostos ao ZIKV (Figura 4.9 B). Dentre os termos enriquecidos relacionados à resposta de defesa, resposta imune e processos do sistema imunológico, foram encontrados mais genes diferencialmente expressos nos miotubos expostos ao ZIKV (Figura 4.9).



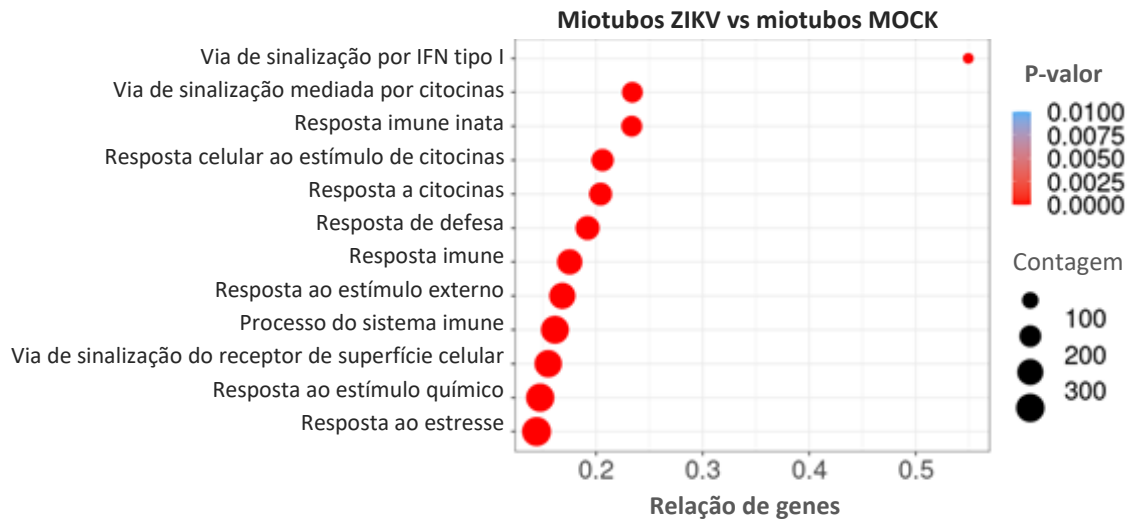
B

Figura 4.9: Análise de enriquecimento de termos baseados nas anotações do Gene Ontology (GO) em mioblastos e miotubos expostos ao ZIKV. Os 12 termos do GO mais enriquecidos nos genes com regulação positiva na comparação entre (A) mioblastos infectados pelo ZIKV vs mioblastos MOCK e a comparação entre (B) miotubos ZIKV e miotubos MOCK. O tamanho dos círculos representa o número de genes diferencialmente expressos em cada termo, representado pela cor preta, e vermelha representa o p-valor nas comparações.

O perfil de expressão gênica revela que a infecção pelo ZIKV induz forte resposta imune e antiviral, particularmente a via de interferon do tipo I, que foi o termo GO enriquecido nos genes modulados positivamente em ambas as células musculares. Porém, mesmo na ausência de infecção produtiva, miotubos expostos ao ZIKV apresentam maior número de genes diferencialmente expressos e processos biológicos modulados, quando comparados com mioblastos infectados. De fato, ao quantificarmos o RNA do ZIKV nos miotubos, observamos somente o RNA de polaridade positiva, indicando a entrada do vírus. Porém, não foi detectada a expressão da fita negativa (Riederer *et al.* submetido, Figura 4A), uma fita intermediária produzida durante a replicação do genoma viral (Nagy & Pogany 2012), o que explicaria a ausência da proteína 4G2 nessas células (Riederer *et al.* submetido). Esse resultado indica que nas células diferenciadas, a replicação viral é controlada, ao contrário dos mioblastos, que no dia 3 pós-infecção apresentam uma taxa de infecção acima de 50% (Figura 1.4).

Com o objetivo de identificar moléculas-chave associadas à patogênese da infecção pelo ZIKV em mioblastos e miotubos, analisamos o enriquecimento de função baseado em anotações do Reactome. Os genes foram divididos com base na modulação positiva e negativa, e submetidos separadamente a uma análise de enriquecimento de função. Essa análise permitiu identificar 43 vias enriquecidas nos genes regulados positivamente em mioblastos ZIKV e 178 vias enriquecidas nos genes regulados positivamente em miotubos expostos ao vírus. Para uma avaliação das vias, utilizamos a ferramenta Cnetplot que permite a visualização do

enriquecimento de função através de uma rede de associação entre genes e categorias enriquecidas.

Observamos que as cinco vias de maior confiabilidade estatística de enriquecimento nos genes regulados positivamente em mioblastos infectados, assim como as vias dos termos GO, estavam relacionadas às respostas inflamatórias e antivirais: “sinalização por interleucinas”, “mecanismos antivirais por genes induzidos por IFN”, “sinalização de Interferon”, “sinalização por interferon alfa/beta”, “sinalização por interferon gama” (Figura 4.10 A). Interessantemente, que as 3 últimas vias citadas anteriormente em mioblastos infectados também estavam enriquecidas nos genes regulados positivamente em miotubos expostos ao ZIKV, além das vias “organização da matriz extracelular” e “formação de colágeno”. Também pudemos observar que a rede formada pelas 5 vias de maior confiabilidade estatística de enriquecimento nos genes regulados positivamente em miotubos ZIKV é formada por mais genes e maior logFC quando comparado com os mioblastos infectados (Figura 4.10 B). Além disso, existem alguns genes que se destacam ao fazer as interações entre as vias, como os genes VCAM1 e ICAM1, codificantes para moléculas de adesão celular. Esses genes também podem ser alvos interessantes em estudos futuros.

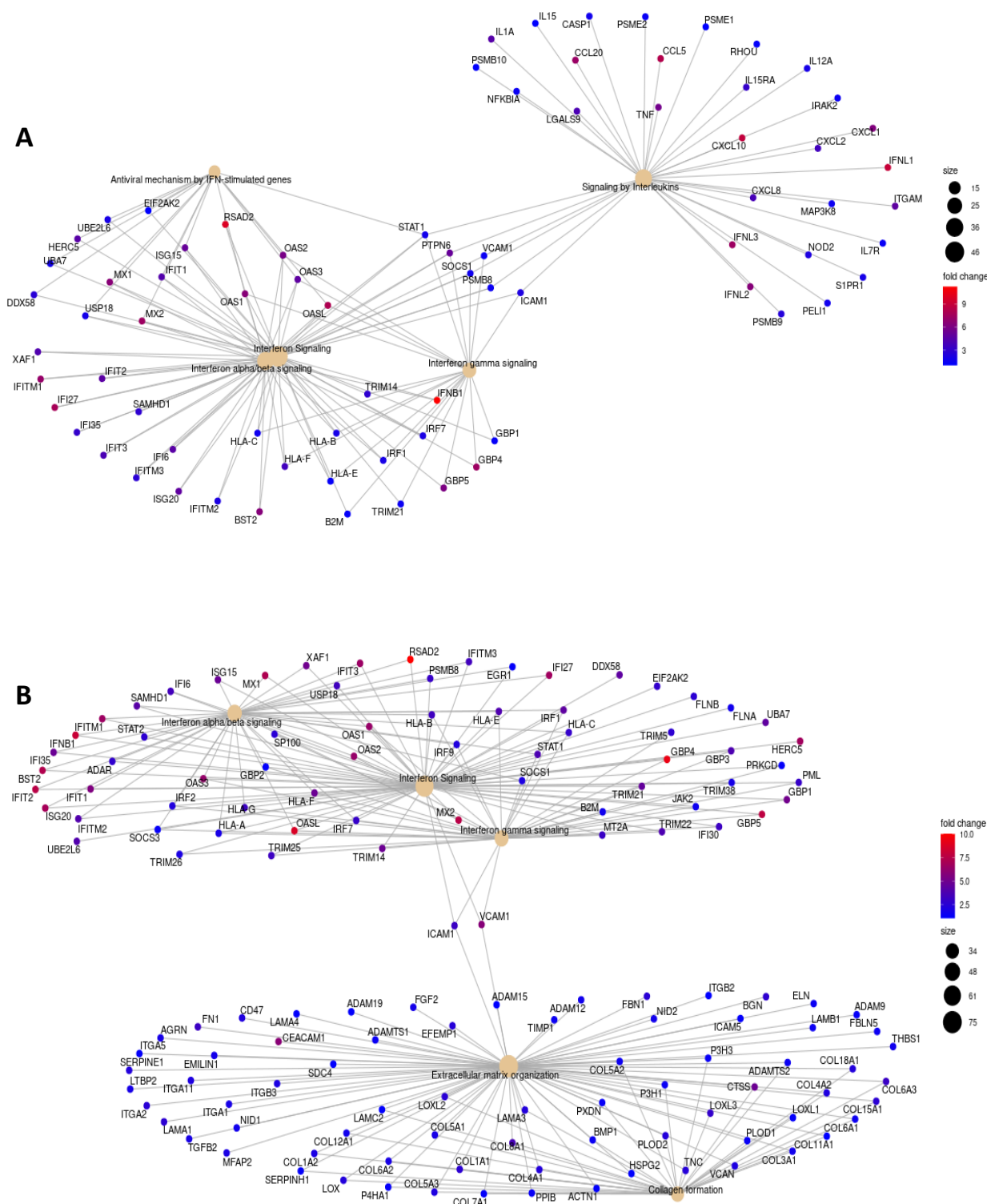
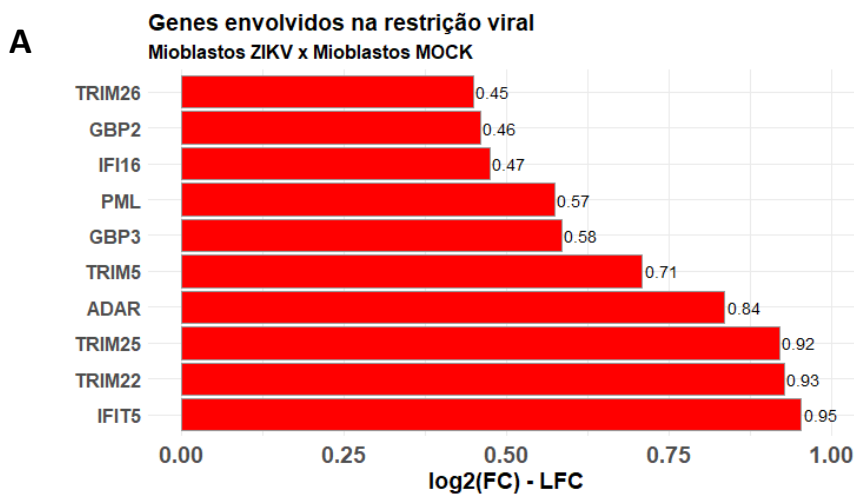


Figura 4.10: Análise de enriquecimento de função baseada em anotações do Reactome em células musculares expostas ao ZIKV. Cnetplot mostrando as 5 vias mais enriquecidas nos genes com regulação positiva na comparação entre (A) mioblastos infectados com ZIKV vs mioblastos MOCK e (B) miotubos infectados vs miotubos MOCK. As alterações do Log₂ fold-change são indicadas pelas cores dos pontos, as cores mais quentes indicam maior expressão do gene.

Em mioblastos infectados destacam-se os genes IFNB1, IFNL1, IFNL2, IFNL3, TNF, CCL5, CXCL10, CCL20, IFITM1, RSAD2, MX1, RSAD2, OAS1, OAS2, OASL, que apresentam as cores vermelho e roxo, mais distante do azul, uma escala que representa o logFC. A regulação em destaque desses genes sugere que a infecção pelo ZIKV em mioblastos induz uma resposta inflamatória robusta dominada pela expressão de genes codificantes de quimiocinas, citocinas inflamatórias, e indução de genes induzidos por IFN (elementos das respostas imunes inata e adaptativa). Importante ressaltar que os miotubos, resistentes à infecção produtiva, exibem maior modulação de vias e genes relacionadas à resposta antiviral, sendo que muitos genes antivirais diferencialmente expressos em ambos os tipos celulares, apresentaram um logFC maior nos miotubos (Riederer *et al.* submetido, figura suplementar 5). Em particular, destacam-se nos miotubos expostos ao ZIKV, os genes IFNB1, RSAD2, ISG15, GBP4, GBP5, OASL, BST2, IFIT2, VCAM1, MX2, IFI27, IFITM1, HERC5, TRIM21 que apresentam tonalidade entre vermelho e roxo mostrando o logFC maior nesses genes. Indicando que nessas células, a expressão diferencial de genes é caracterizada pela regulação da resposta antiviral, observada pelo destaque dos ISGs (genes induzidos por IFN) que codificam fatores de restrição viral. Além disso, os genes antivirais ADAR, TRIM5, não foram modulados nas vias mais enriquecidas nos mioblastos infectados. Também chama atenção nos miotubos expostos ao ZIKV, a regulação de genes relacionados a ECM incluindo LAMA1, LAMA3, LAMA4, LAMB1, que são genes codificantes para cadeias de laminina $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$ respectivamente, FBN1, que é codificante para fibronectina, além de genes codificantes para diferentes tipos de colágeno como COL4A1 e COL4A2.

Como a comparação entre miotubos ZIKV vs miotubos MOCK aponta para um aumento no número de genes diferencialmente expressos e de vias antivirais enriquecidas em relação a comparação entre mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK, buscamos investigar mecanismos que poderiam explicar a resistência de miotubos à infecção. Identificamos diferentes genes com conhecida propriedade antiviral, altamente modulados na comparação entre miotubos ou ligeiramente ou não modulados na comparação entre mioblastos conforme observados pelos valores de expressão normalizados nas diferentes comparações (Riederer *et al.* 2021- artigo em anexo, Figura 4F). Uma análise dos genes diferencialmente expressos utilizando um filtro com p-valor ajustado $\leq 0,05$ e $\log_2FC > 0$, mostra além do ADAR e TRIM5 (descritos anteriormente), os genes TRIM26, TRIM56, TMEM173/STING, GBP2, GBP3, APOBEC3B e APOBEC3F com modulação superior ao \log_2FC superior a 1 na comparação entre miotubos ($\log_2FC \geq 1$) (Figura 4.11 A). Enquanto na comparação entre mioblastos, alguns desses genes apresentaram pouca modulação ($\log_2FC < 1$), ou não apareceram nesta seleção (Figura 4.11

B). Esses genes são codificantes para fatores de restrição viral que podem atuar em diferentes etapas do ciclo replicativo (Riederer *et al.* submetido). A família de proteínas TRIM pode impedir o ciclo replicativo antes da integração viral, na transcrição ou montagem viral (Ozato *et al.* 2008). O gene APOBEC codifica uma família de enzimas citosinas desaminases que geram uma hipermutação na sequência de nucleotídeos, enzimas de edição citosina para uracila C-U. ADAR e APOBEC são responsáveis por mutações na posição de nucleotídeos dentro da estrutura do códon no genoma do ZIKV e outros vírus (Lindley & Hall 2018; Chemudupati *et al.* 2019). TMEM73/STING estimulador de genes de IFN coordena ativação de genes inflamatórios para induzir a expressão de IFN e o estabelecimento da ação antiviral (Barber 2015). GBP2 também exibe atividade antiviral, e reduz o processamento de glicoproteínas virais do ZIKV mediado por furinas do hospedeiro (Braun *et al.* 2019). PML e IFI6 inibem a produção de partículas virais e síntese de proteínas (Scherer & Stamminger 2016; Sajid *et al.* 2021). Acreditamos que genes altamente regulados ou apenas regulados na comparação entre miotubos possam fornecer pistas que expliquem a resistência dos miotubos à infecção pelo ZIKV.



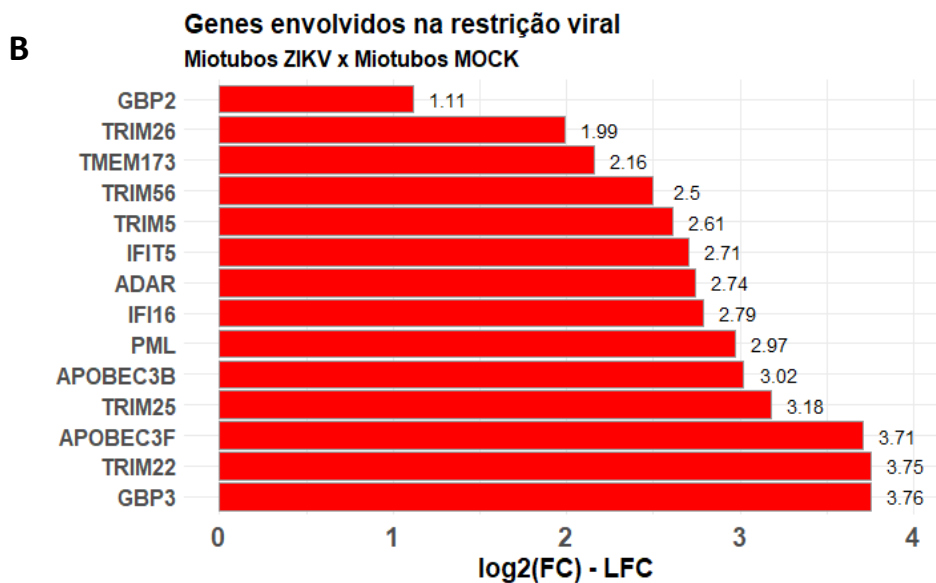


Figura 4.11: Expressão diferencial de genes relacionados à restrição viral em mioblastos e miotubos expostos ao ZIKV. Gráfico de barras mostrando o log₂FC para os genes relacionados às vias antivirais mediadas por IFN do tipo I, na comparação entre (A) mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK e (B) miotubos ZIKV vs miotubos MOCK. Genes diferencialmente expressos log₂FC ≥ 1.

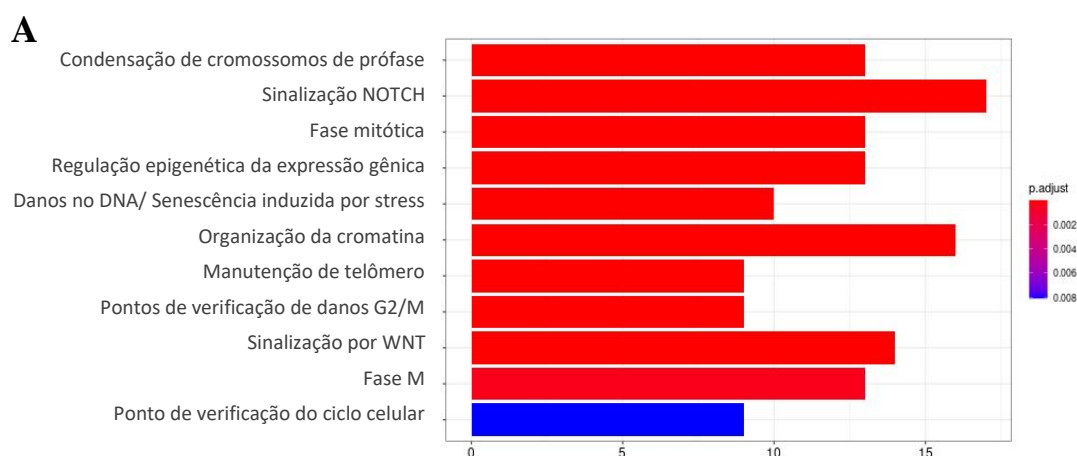
4.8 ZIKV induz alterações nos perfis transcricionais em mioblastos e miotubos relacionados com funções biológicas do sistema muscular esquelético

Como esperado, demonstramos que as células musculares infectadas pelo ZIKV exibem uma resposta imune robusta, com muitas vias e processos biológicos modulados, principalmente as respostas relacionadas com a via do interferon do tipo I (Figura 4.9). É importante ressaltar que o músculo esquelético tem uma capacidade de regeneração, além do músculo ser um tecido altamente metabólico e produtor de miocinas, que podem ter ação sistêmica e interagir com praticamente todos os demais tecidos e órgãos (Bay & Pedersen 2020). Assim, é fundamental compreender os efeitos que a infecção promove na biologia das células musculares. É possível que o ZIKV perturbe a capacidade regenerativa dos mioblastos, e afete vias metabólicas ou a produção de miocinas essenciais para o organismo, e dessa forma, a infecção do tecido muscular poderia afetar todo o organismo.

A proliferação das células progenitoras musculares é fundamental no processo da miogênese (Schmidt *et al.* 2019). A análise de transcriptoma em células infectadas pelo ZIKV resulta na desregulação de vias relacionadas ao ciclo celular em progenitores neurais, organoides, epitélio da retina, cérebro fetal murino (Tang *et al.* 2016; Ferraris *et al.* 2019). A fim de identificar o impacto da infecção em mioblastos, foi realizado o enriquecimento de função baseada em anotações do Reactome nos genes regulados negativamente. Tal análise

permitiu identificar 119 vias enriquecidas nos genes regulados negativamente em mioblastos infectados. Foi possível observar vias relacionadas ao ciclo celular em mioblastos infectados pelo ZIKV, tais como, “condensação de cromossomos”, “ponto de verificação G2/M” (responsável pela estabilidade genômica para entrada da mitose), a “fase prófase da mitose”, “fase M “(mitose), “condensação de cromossomos”, além das vias “sinalização NOTCH” e sinalização “WNT” (Figura 4.12 A).

Ao analisar os genes relacionados a essas vias desreguladas, observamos a modulação de genes que codificam histonas, entre elas as histonas de mamíferos H2A, H2B, H3 e H4 nos mioblastos infectados e genes e relacionados a via de “danos do DNA” incluindo GADD45G, CDC25B, E2F2 estes genes são descritos em dano e reparo de do DNA, estes genes desempenham importantes papéis na progressão do ciclo celular (Tannocho *et al.* 2000; Maeda *et al.* 2002; Clijsters *et al.* 2019) (Figura 4.12 B). As histonas desempenham papel no empacotamento do DNA e ainda permitem a replicação do DNA e condensação de cromossomos (Ma *et al.* 2015). A desregulação do ciclo celular causado pelo ZIKV em mioblastos mostrado pela análise de enriquecimento de função corrobora com nossos achados por citometria de fluxo, que mostram a redução da população ki67high e redução da intensidade de fluorescência (Figura 1.5), que aponta uma possível redução de mioblastos na fase de mitose (Dzulkipli *et al.* 2018). Em conjunto, esses dados destacam o envolvimento das vias do ciclo celular na infecção pelo ZIKV em mioblastos humanos.



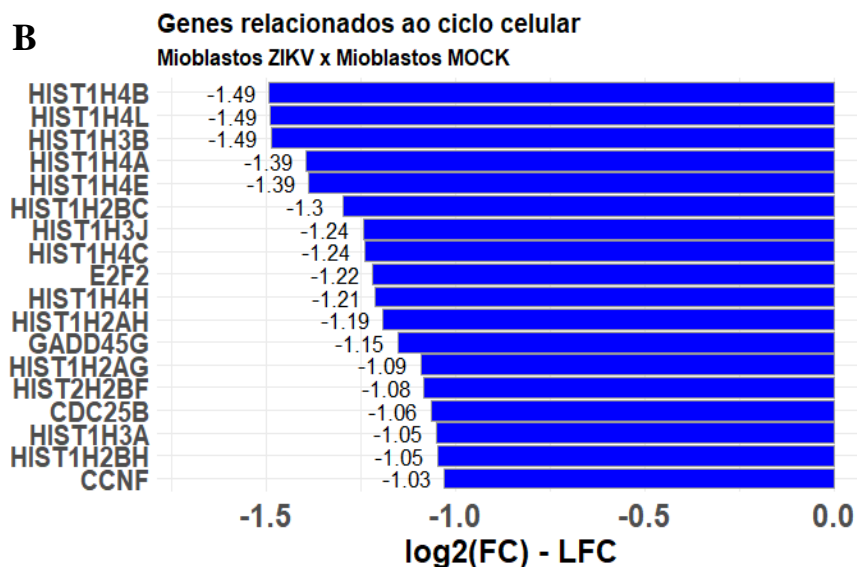
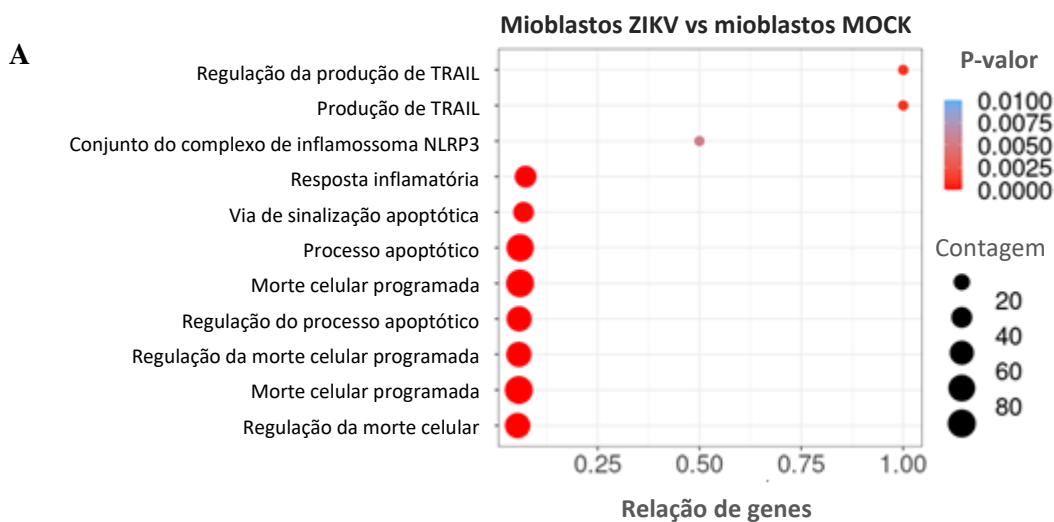


Figura 4.12: Análise de enriquecimento de função baseada em anotações do Reactome indicando desregulação no ciclo celular. **A:** Gráfico de barras mostrando as categorias enriquecidas nos genes regulados negativamente na comparação entre mioblastos infectados com ZIKV vs mioblastos MOCK. **B:** Gráfico de barras mostrando a análise de expressão diferencial de genes regulados negativamente em mioblastos infectados pelo ZIKV.

A indução da morte celular é um mecanismo utilizado pelo ZIKV e outros flavivírus para desviar de respostas antivirais e aumentar sua disseminação, em alguns casos, ainda pode impedir a replicação do vírus (Souza *et al.* 2019). Apesar de não termos realizado uma análise de viabilidade celular em nossos ensaios, não observamos diminuição da densidade celular ou sinais de morte na cultura dos mioblastos infectados. Recentemente, nosso grupo mostrou que a infecção pelo ZIKV modulou o processo de morte celular programada em mioblastos observado pela análise proteômica, que não resulta em apoptose, mas em outro processo de morte programada denominada de paraptose, caracterizada pela presença de vacúolos citoplasmáticos, além da ausência de fragmentação nuclear e ativação das caspases 3 e 7 durante a infecção pelo ZIKV (Legros *et al.* 2020). Nesse cenário, buscamos identificar associações entre assinaturas de morte celular nos mioblastos infectados pelo ZIKV. A análise do enriquecimento baseada em termos GO nos genes regulados positivamente, permitiu identificar processos biológicos relacionados à morte celular em mioblastos infectados pelo ZIKV, incluindo “produção de TRAIL”, “morte celular programada”, “regulação da morte celular programada”, “processo apoptótico”, “regulação do processo apoptótico”, e ainda “processo inflamatório” e “complexo de inflamossoma NRLP3” (Figura 4.13 A).

Escolhemos as vias “processo apoptótico” (GO0006915) e “regulação da morte celular” (GO0010941) para identificar os genes modulados nos processos relacionados à morte celular em mioblastos infectados. Curiosamente, não observamos modulação de genes codificantes das caspases efetoras, como CASP3, CASP7, corroborando dados do nosso grupo (Legros *et al.* 2020). Em contraste, encontramos a regulação positiva de genes relacionados à inibição do processo apoptótico, incluindo BIRC3, TRAF1, IFI6, IFIT3 (Wang *et al.* 1998; Liston *et al.* 2003; Kotredes & Gamero 2013; Sajid *et al.* 2021). O gene CASP10 regulado está envolvido na ativação de caspases efetoras durante o processo de apoptose (Ichim & Tait 2016). Sua função ainda é descrita na regulação negativa da morte celular mediada por CASP8 (Horn *et al.* 2017). Por outro lado, poucos genes pró-apoptóticos foram regulados positivamente, como o TNFRSF10 (TRAIL), pertencente à família TNF, codificante para receptores envolvido na ativação de sinalização da apoptose, diferentes ISGs (genes induzidos por IFN) como IFIT2 descritos na ativação da apoptose. Ainda observamos a regulação positiva do gene CASP1, envolvido na ativação da piroptose, caracterizada pelo perfil inflamatório (Miao *et al.* 2011) (Figura 4.13 B). Esses dados mostram a modulação nos processos de morte celular em mioblastos após a infecção pelo ZIKV.



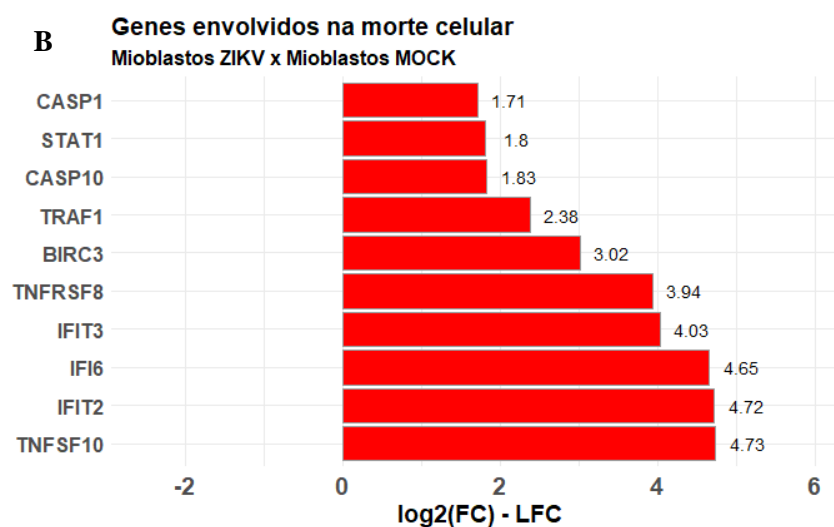


Figura 4.13: Análise de enriquecimento de função mostra a modulação nas vias de morte celular em mioblastos infectados pelo ZIKV. A: Termos do GO enriquecidos relacionados a morte celular nos genes regulados positivamente na comparação entre mioblastos infectados com ZIKV vs mioblastos MOCK. O tamanho dos círculos representa a contagem dos genes diferencialmente expressos, representados pela cor preta. E a cor vermelha do círculo representa o p-valor. **B:** Gráfico de barras mostrando os genes diferencialmente expressos relacionados ao termo “regulação da morte celular” e “processo apoptótico” na comparação entre mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK.

4.9 Interações com receptores de matriz em células musculares humanas na infecção pelo ZIKV

Os componentes da membrana basal são alvos para adesão e invasão de diferentes patógenos (Singh *et al.* 2012). Como mencionado anteriormente, dados preliminares do nosso grupo mostram que mioblastos cultivados sobre a isoforma de LM511 apresentam redução da taxa de infectividade quando comparados aos controles. Além disso, observamos que dentre 178 vias enriquecidas nos genes regulados positivamente em miotubos expostos ao ZIKV, as vias “organização da matriz extracelular” e “formação de colágeno”, estavam entre as 5 vias mais enriquecidas (Figura 4.10 B), e que não foram moduladas em mioblastos infectados. Baseado na importância da ECM no processo de regeneração tecidual, decidimos investigar alterações relacionadas a ECM durante a infecção pelo ZIKV nas células musculares.

Nesse contexto, avaliamos a modulação das interações entre ligantes e receptores da ECM, através da análise de enriquecimento de funções baseadas nas anotações KEGG. Observamos que a via “interação de receptores-ECM” (via hsa04512) estava entre as vias mais enriquecidas nos genes regulados positivamente na comparação entre miotubos ZIKV vs miotubos MOCK. Nessas células, diversas interações foram moduladas, os codificantes para integrinas ITGA1, ITGA2, ITGA5, ITGA11 e sidecano, assim como seus ligantes LM, FN

(fibronectina), tenascina, colágeno, mostrados pela cor vermelha que indica a regulação positiva dos genes (Figura 4.15). Em contraste, na comparação entre mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK, não houve enriquecimento dessa via, poucos ligantes foram regulados positivamente, como a LM, em relação aos genes codificantes para os receptores, a falta de regulação foi mais evidente (Figura 4.14). Essas análises foram consistentes como nosso ensaio por citometria de fluxo, que não mostrou modulação da expressão de integrinas em mioblastos após infecção pelo ZIKV (Figura 4.6). Em conjunto, o perfil transcricional mostra um enriquecimento na via de interação com receptores de ECM apenas nos miotubos expostos ao ZIKV.

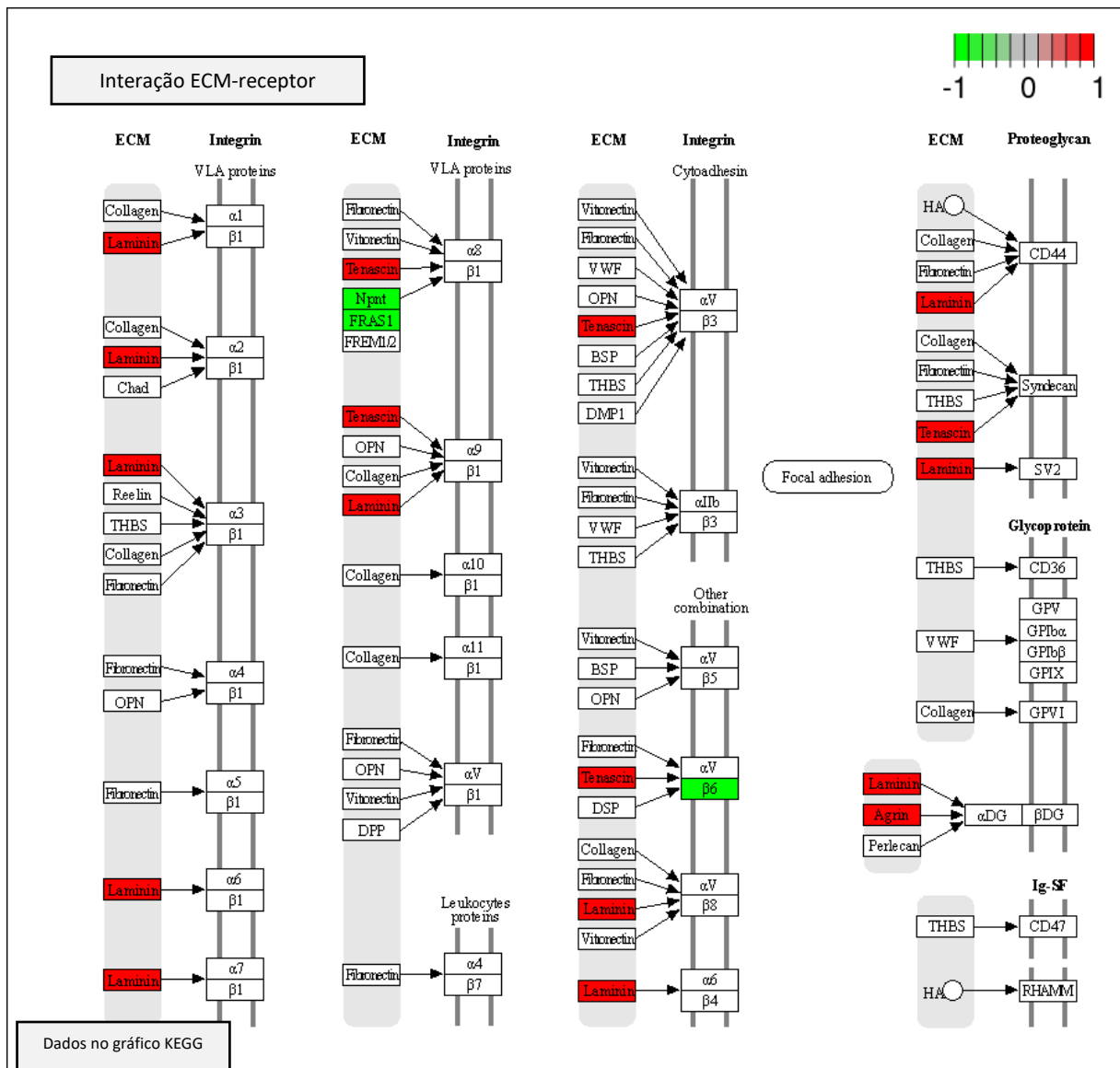


Figura 4.14: Diagrama adaptado do banco de dados KEGG, representando os genes relacionados a via “ECM-receptor interaction” (hsa04512). As cores dos retângulos representam o LogFC para os genes na comparação mioblastos ZIKV vs mioblastos MOCK. Cor vermelha mostra os genes modulados positivamente e cor verde mostra os genes regulados negativamente.

5. DISCUSSÃO

O músculo é um tecido com alta capacidade regenerativa, fenômeno possível devido a presença de células progenitoras musculares, denominadas de células satélites. Além disso, o músculo esquelético é um tecido que possui diversos processos metabólicos importantes para a contração muscular e homeostasia do organismo. Mais recentemente, várias citocinas e fatores solúveis secretados pelo músculo esquelético foram descritos (miocinas). Secretadas pelo músculo principalmente durante exercícios, as miocinas podem atuar em diferentes sistemas e tecidos. Dessa forma, patógenos que infectam o músculo podem não somente prejudicar a capacidade regenerativa deste tecido, mas poderiam também afetar processos metabólicos e secreção de miocinas, com consequências sistêmicas para o indivíduo.

As células musculares são frequentemente descritas como células alvo de muitas arboviroses como Chikungunya, Dengue, West Nilo e Zika vírus, e outros vírus de importância clínica como o vírus Influenza. A mialgia é um sintoma frequentemente relatado nessas infecções, e sintomas musculares, como mialgia podem persistir além da fase aguda da infecção (Filippone *et al.* 2020; Brasil *et al.* 2016). Durante o surto de ZIKV, a mialgia foi relatada entre aproximadamente 60-70% dos casos (Calvet *et al.* 2016). Uma característica do ZIKV é o amplo tropismo por diferentes células e tecidos, incluindo células musculares (Chan *et al.* 2016), mas pouco é descrito sobre a patologia da infecção nesse tecido.

No presente estudo, mostramos que mioblastos humanos LHCN-M2 são miogênicos e possuem capacidade de proliferar, diferenciar e fusionar-se em miotubos *in vitro*. O perfil de expressão gênica mostrou que a diferenciação de mioblastos em miotubos (comparação entre miotubos MOCK vs mioblastos MOCK) foi caracterizada pelo enriquecimento de processos biológicos relacionados a “contração muscular”, “metabolismo muscular”, “organização do sarcômero”, “desenvolvimento do tecido muscular esquelético”, “conjunto de miofibrilas” nos genes regulados positivamente. Entre os genes modulados estão os genes codificantes para proteínas miofibrilares como TTN, ACTN2, MYH3, MYH6, que são genes específicos do músculo. Essas análises mostram a diferenciação bem-sucedida de mioblastos em miotubos em nosso modelo de miogênese *in vitro* (Legros *et al.* 2021-Artigo em anexo). Observamos que os mioblastos são susceptíveis à infecção pelo ZIKV. Por outro lado, miotubos expostos ao ZIKV não apresentam proteínas virais quando detectadas por imunofluorescência. Esses achados corroboram dados recentemente publicados pelo nosso grupo mostrando a infecção preferencial nos mioblastos humanos (Legros *et al.* 2020). A infecção em células progenitoras musculares humanas também foi observado por Galvino-Leopoldino e colaboradores, no qual mioblastos

foram mais susceptíveis à infecção pelo ZIKV do que as fibras maduras. Importante ressaltar que nesse estudo as células diferenciadas e fusionadas foram infectadas pelo ZIKV no MOI5 (Gavino-Leopoldino *et al.* 2020) uma concentração bem mais alta que observada em nossos estudos.

A proliferação celular é um processo crucial para o desenvolvimento muscular e regeneração do tecido (Schmidt *et al.* 2019). Após serem ativadas, SC sofrem uma importante expansão antes de entrar na fase de diferenciação (Schmidt *et al.* 2019). Uma baixa quantidade de progenitores poderia prejudicar a recuperação de fibras danificadas e a formação de novas fibras. Um efeito observado na infecção pelo ZIKV em diferentes tipos celulares é a redução do crescimento e viabilidade celular (Tang *et al.* 2016; Souza *et al.* 2019). A observação da redução da positividade da população ki67high, e redução da intensidade de fluorescência para esse marcador nos mioblastos infectados, sugere que o ZIKV esteja interferindo na mitose, visto que nesta fase do ciclo ocorre uma maior concentração de KI67 no núcleo das células (Miller *et al.* 2010; Dzulkipli *et al.* 2018). Consistente com esses achados funcionais, a análise do perfil transcricional, revelou o enriquecimento de vias relacionadas ao ciclo celular nos genes regulados negativamente em mioblastos infectados pelo ZIKV. Com a regulação negativa de genes codificantes para histonas, e relacionados ao controle do ciclo, dano e reparo do DNA. Os genes GADD45G e CD25B estão envolvidos no “ponto de verificação G2/M”, que ocorre antes da fase mitótica, e avalia integridade do DNA e se este foi completamente copiado durante a fase S (Tannoch *et al.* 2000; Maeda *et al.* 2002; Clijsters *et al.* 2019). O gene CCNF controla a integridade do genoma durante a fase G2 do ciclo, mediando degradação do fator de transcrição E2F2. A falha nessa degradação resulta em estresse na replicação e danos no DNA (Clijsters *et al.* 2019). As histonas representam metade da massa da cromatina, e sua síntese é essencial para a replicação do DNA. São responsáveis por manter ou reprimir modificações epigenéticas durante a divisão celular (Ma *et al.* 2015). Além disso, o termo relacionado a “regulação da proliferação de mioblastos” é um dos termos mais suprimidos nos mioblastos infectados pelo ZIKV. Esses achados mostram que a infecção pelo ZIKV leva à distúrbios no ciclo celular em mioblastos humanos, e corrobora com dados da literatura que mostram o envolvimento das vias do ciclo celular na patologia induzida pelo ZIKV (Tang *et al.* 2016; Messias *et al.* 2020). A redução da proliferação miogênica

Considerando o infiltrado inflamatório que acompanha o processo de miogênese (Tidball 2017), a sobrevivência das células musculares é um importante aspecto a ser avaliado. A literatura mostra que o ZIKV pode induzir diferentes mecanismos de morte celular nas células infectadas, incluindo apoptose, necrose, piroptose, paraptose e autofagia (Souza *et al.* 2019). Nosso grupo observou que a infecção pelo ZIKA em mioblastos humanos causa morte celular

por um processo denominado de paraptose, uma forma de morte celular independente de caspases, associada à formação de vacúolos citoplasmáticos (Legros *et al.* 2020). Esse tipo de morte celular programada também já foi observado em células epiteliais, astrócitos e fibroblastos infectados pelo ZIKV (Monel *et al.* 2017; Souza *et al.* 2019). Apesar de não termos realizado uma análise de viabilidade celular durante a realização de nossos ensaios, não observamos sinais de morte na cultura dos mioblastos infectados quando infectados no MOI 0,1, mas novos experimentos serão necessários para avaliar a viabilidade, também para confirmar a morte por paraptose, descrita em mioblastos primários infectados pelo ZIKV (Legros *et al.* 2020). Apesar disso, a análise do enriquecimento de termos GO permitiu identificar o enriquecimento de processos biológicos relacionados à morte celular em mioblastos infectados pelo ZIKV, tais como: “morte celular programada”, “regulação da morte celular programada”, “processo apoptótico” e “regulação do processo apoptótico” nos genes regulados positivamente. Ao analisar a expressão diferencial de um grupo de genes relacionados às vias “regulação da morte celular” e “processo apoptótico”, foi observado principalmente a modulação de genes relacionados à inibição de apoptose, como o BIRC3, um inibidor de caspases efetoras (Silke & Meier 2013) e genes induzidos por IFN descritos na ativação e inibição da apoptose (Thyrell *et al.* 2002; Kotredes & Gamero 2013). Por outro lado, os principais genes pró-apoptóticos não foram modulados, incluindo as caspases efetoras CASP3 e CASP7. Esse perfil transcricional é consistente com a análise proteômica realizada no trabalho do nosso grupo, que mostrou a apoptose como um mecanismo de morte desregulado, apesar da ausência de efetores apoptóticos observado em mioblastos após infecção pelo ZIKV (Legros *et al.* 2020).

Miotubos expostos ao ZIKV também não apresentaram alterações morfológicas que indicassem qualquer sinal de estresse ou morte celular, pelo contrário, esses miotubos aparentavam ser maiores. De fato, observamos o aumento da formação de miotubos maiores, contendo acima de 100 núcleos, após exposição com o ZIKV. No entanto, precisamos dar continuidade a essa análise para confirmar estatisticamente esse achado. A análise do transcriptoma revelou enriquecimento vias relacionadas a diferenciação, desenvolvimento da fibra muscular, e regulação positiva de alguns genes descritos na fusão e hipertrofia. Se o efeito pró-diferenciação do ZIKV sobre as células musculares humanas for confirmado, pode ser que ele ocorra logo após a exposição do vírus às células, e uma cinética pós-infecção nos mioblastos pode ser necessária para identificar os mecanismos que estimulam a diferenciação.

Como descrito anteriormente, a fibra muscular é revestida por uma MB que é rica em LM, e no músculo adulto, predominam as isoformas LM211 e 221 (Holmberg & Durbeej 2013; Riederer *et al.* 2015). Para que um determinado patógeno interaja com a fibra muscular,

necessariamente ele terá que entrar em contato com essa estrutura de ECM. Dados preliminares do nosso grupo mostram uma redução da infectividade do ZIKV em mioblastos cultivados sobre a isoforma de LM511 recombinante. Durante a regeneração muscular (Rajan *et al.* 2018) e na miogênese *in vitro* (dados do nosso grupo), outras isoformas são expressas, incluindo a produção das cadeias $\alpha 4$ e $\alpha 5$, que podem formar as isoformas 411, 421, 511 e 521, por exemplo. Importante ressaltar que mioblastos, ao contrário dos miotubos, não expressam essas cadeias (dados do nosso grupo). Patógenos podem utilizar a LM para adesão e invasão na célula hospedeira, e seus receptores integrinas, são descritos como co-receptores na infecção por adenovírus (Singh *et al.* 2012; Rajan, *et al.* 2019). As integrinas fornecem sinais que são essenciais para regular organização do citoesqueleto e sinalização intracelular, influenciando eventos como migração, sobrevivência, proliferação, entre outros (Papers & Mayer 2003). A ligação do vírus induz mudanças estruturais na integrina, que resulta em união com as subunidades, aumentando a afinidade com o vírus, rearranjo no citoesqueleto e em consequência a internalização (Hussein *et al.* 2015). Durante o início do processo de infecção viral, os vírus podem se ligar à diferentes moléculas de superfícies, como proteínas e carboidratos que podem mediar funções como concentrar o vírus na superfície da célula ou agir como receptores ou co-receptores e facilitar a infecção viral (Hussein *et al.* 2015; Rajan *et al.* 2018).

Neste trabalho, não foi detectado diferenças na expressão das subunidades de integrinas $\alpha 3$, e $\alpha 6$, receptores de LM, e de $\alpha 4$ e $\alpha 5$, receptores de fibronectina, nos mioblastos infectados por citometria de fluxo. Também será importante avaliar o estado de ativação das integrinas, visto que o agrupamento e a mudança conformacional destes receptores podem ter mais importância na sinalização do que simplesmente o aumento da quantidade de moléculas (Hussein *et al.* 2015; Simons *et al.* 2021). De forma consistente com esses dados, a análise de enriquecimento de função baseada em anotações KEGG, não revelou modulação dos genes codificantes para receptores de LM em mioblastos infectados. Em contraste, a modulação positiva dos genes codificantes para integrinas, ITGA1, ITGA2, ITGA5 e ITGA11 foram observados em miotubos tratados com ZIKV, além de sidecanos, que são proteoglicanos de sulfato de heparan, e podem ser fatores de fixação do vírus na superfície das células, que seriam responsáveis pelo primeiro contato com o vírus. Essa ligação ocorre de maneira não específica, concentrando o vírus na superfície da célula e facilitando a ligação ao seu receptor específico, uma molécula que promoverá a entrada do vírus na célula-alvo (Grove & Marsh 2011). Em contraste, estudos mostram que a infecção pelo DENV foi inibida pela heparina em linhagens hepáticas, mostrando um papel também na inibição viral (Lin *et al.* 2002; Artpradit *et al.* 2013). Heparina se liga a LM, incluindo a isoforma 511 (Yu & Talts 2003; Yuzuriha *et al.* 2021), o

que poderia explicar o efeito inibitório dessa molécula na infecção pelo ZIKV. Interessantemente, Cheudjeu propõe que estratégias antivirais deveriam focar na biossíntese de heparan, e não sua inibição (Cheudjeu *et al.* 2021).

Visando identificar o receptor utilizado na internalização pelo ZIKV em mioblastos, nosso grupo observou que estas células expressam o receptor AXL, um mediador de entrada para o ZIKV em diferentes tipos celulares, como os fibroblastos, epiteliais tímicas humanas (Hamel *et al.* 2015; Messias *et al.* 2019). No entanto, o bloqueio do receptor com o uso de anticorpo monoclonal específico não inibiu a infecção (dado não mostrado), indicando que esse receptor não é responsável pela entrada do ZIKV nos mioblastos humanos. Nesse cenário, investigamos se o ZIKV utilizaria receptores do tipo integrina para internalização em mioblastos. A integrina $\alpha 6$ é um dos receptores de LM mais promíscuos, e é capaz de se ligar a todas as isoformas conhecidas (Domogatskaya *et al.* 2012). Apesar de não ser expresso na fibra muscular madura, essa molécula é expressa em mioblastos, e em miotubos recém-formados durante o processo de regeneração e miogênese (Sorokin *et al.* 2000; Papers & Mayer 2003). Nossos resultados não demonstraram alterações na expressão dessa molécula com a infecção, e o bloqueio da subunidade de integrina $\alpha 6$ não modulou a infecção em mioblastos. Mais análises serão necessárias para descobrir o receptor de entrada para o ZIKV em mioblastos e miotubos humanos.

De forma interessante, a via relacionada a organização de ECM e de formação de colágenos estão entre as 5 vias mais enriquecidas nos genes regulados positivamente após exposição pelo ZIKV em miotubos, e tal modulação não foi observada em mioblastos infectados. Observamos nos miotubos expostos ao ZIKV, uma modulação positiva dos genes LAMA1, LAMA3 e LAMA4, codificantes para cadeias de LM $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, respectivamente. Importante ressaltar que diversos trabalhos mostram o efeito positivo do tratamento com a isoforma LM 111 (que possui a cadeia $\alpha 1$ de LM – LAMA1) na biologia muscular, estimulando a proliferação, migração e sobrevivência de mioblastos (Silva-Barbosa *et al.* 2008; Riederer *et al.* 2015; Grzelkowska-kowalczyk 2016). Também observamos que genes codificantes para diferentes tipos de colágenos foram modulados positivamente nas células diferenciadas após exposição pelo ZIKV. O colágeno foi relacionado ao aumento da migração e diferenciação de mioblastos (Liu *et al.* 2020). Um estudo de Aguiar e colaboradores, mostra que os genes codificantes para colágeno e os níveis das proteínas, foram fortemente reduzidos em cérebros de neonatos que morreram 48 horas pós-parto com CZS (Aguiar *et al.* 2020). A ECM que envolve o músculo esquelético possui fundamental importância para a homeostase do tecido. Na presença de uma lesão, é iniciada uma resposta regenerativa e a MB forma um arcabouço necessário para uma regeneração. Isso é importante visto que as moléculas da ECM

regulam diferentes processos como proliferação, migração, sobrevivência e diferenciação, eventos necessários para a regeneração (Thomas *et al.* 2015). Essas respostas são iniciadas pela ativação de células satélites cujo nicho está localizado em contato direto com membrana basal. Essas alterações na rede de ECM poderiam ajudar a explicar a resistência dos miotubos à infecção pelo ZIKV.

A infecção viral induz uma série de mecanismos de defesas na célula hospedeira. A resposta imune atua para bloquear ou inibir a infecção inicial, proteger as células ou eliminar aquelas infectadas pelo vírus. Os vírus são reconhecidos por diferentes receptores na resposta imune inata expressos na superfície da célula, como receptores Toll-Like (TLRs), gene induzível pelo ácido retinóico RIG-1 (DDX58) (Serman & Gack 2019). Esses sensores promovem a expressão de IFN do tipo I e uma variedade de genes estimulados por interferon (ISGs), citocinas inflamatórias, além de sinais que recrutam e ativam células envolvidas na inflamação e na indução de resposta adaptativa. Os ISGs codificam fatores de restrição viral, que são proteínas que podem restringir o ciclo replicativo do vírus em diferentes estágios, como inibir a entrada viral na célula hospedeira, interromper a tradução, na maquinaria da replicação viral, na montagem ou ainda na liberação da partícula. Os fatores de restrição são importantes componentes da resposta inata, e são essenciais para desacelerar a replicação do vírus até a montagem da resposta adaptativa (Chemudaputi *et al.* 2019).

Toda a sinalização envolvida após a entrada do vírus na célula dirige o resultado da infecção (Serman & Gack 2019). Nossos dados do sequenciamento do RNA revelaram um perfil de expressão em que a infecção pelo ZIKV induz fortes respostas imune inata e adquirida, além de uma potente resposta antiviral, em mioblastos infectados e em miotubos, mesmo na ausência da infecção produtiva. De fato, nossa observação de que em miotubos, somente a fita positiva do RNA viral foi detectada, mostra a entrada do vírus na célula, mas ausência de replicação do genoma viral (Riederer *et al.* submetido). Entretanto, alguns vírus são capazes de infectar miotubos, como o Influenza e o vírus da Febre Amarela (Desdouits *et al.* 2013; de Souza *et al.* 2019).

A análise de enriquecimento de função, baseado em anotações do Reactome utilizando a ferramenta Cnetplot, permitiu identificar que as vias mais enriquecidas, como via de sinalização de IFN, foram enriquecidas nos genes modulados positivamente em mioblastos e miotubos após a exposição pelo ZIKV, mas as células diferenciadas apresentaram maior enriquecimento de termos relacionados a resposta de defesa antiviral. Uma importante característica do perfil em mioblastos infectados foi a modulação de genes inflamatórios, entre eles, genes codificantes para citocinas inflamatórias, quimiocinas e ISGs (elementos da resposta imune inata e adaptativa), mostrando um perfil inflamatório induzido pelo ZIKV em mioblastos. Esse perfil

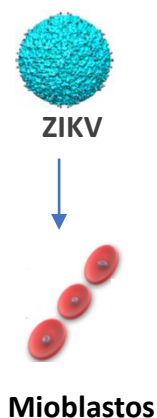
inflamatório em mioblastos mostra o enriquecimento da via relacionada à formação de inflamosoma nos genes regulados positivamente em mioblastos infectados. De forma semelhante, estudos relatam que a infecção pelo ZIKV induz um perfil pró-inflamatório em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* (He *et al.* 2018; Lima *et al.* 2019). O crescimento e regeneração do músculo é regulado por diferentes etapas desde ativação, proliferação de células-tronco, diferenciação e maturação das fibras e a resposta inflamatória, e a produção de citocinas é um evento presente em quase todas as etapas (Tidball 2017).

As fibras musculares produzem, liberam citocinas (miocinas) que possuem efeitos autócrinos, parácrinos e endócrinos, dessa forma, o músculo comunica com diferentes órgãos (Bay & Pedersen 2020). Esse perfil pró inflamatório encontrado em mioblastos infectados pelo ZIKV pode influenciar na regeneração muscular. Uma análise comparativa entre os perfis transcricionais em mioblastos e miotubos após exposição pelo ZIKV, permitiu identificar a expressão diferencial de genes envolvidos na restrição viral, e relacionados à via de sinalização de INF, em ambos os tipos celulares após exposição ao ZIKV. Importante ressaltar que a modulação positiva desses genes em miotubos foi bem mais intensa nos miotubos infectados. Entre esses genes induzidos por IFN, podemos encontrar membros das famílias TRIM e APOBEC, além dos genes GBP2/3, ADAR, PML, STING/TMEM173. Esses genes (Figura 4.11), são importantes componentes da resposta antiviral relacionada a via do interferon do tipo I. Possuem ações antivirais em diferentes etapas do ciclo replicativo. (Riederer *et al.* submetido). A identificação desses genes poderá fornecer pistas sobre os mecanismos de resistência viral presente nas células diferenciadas.

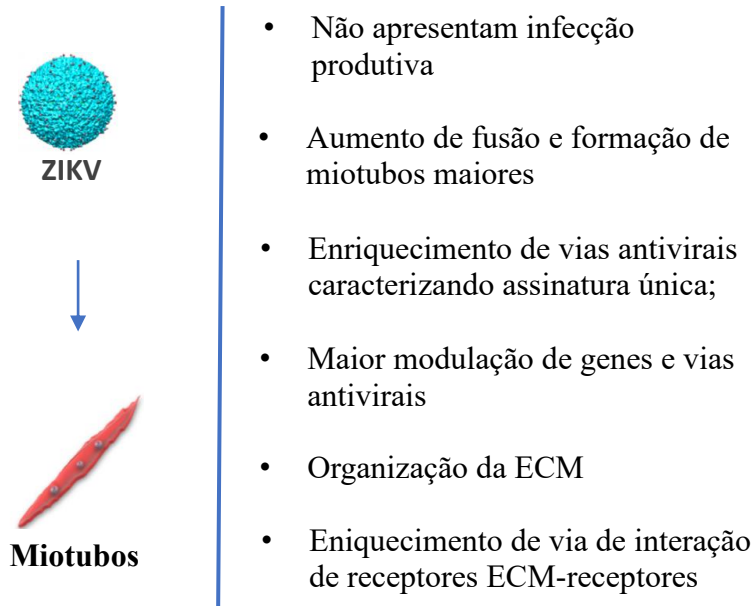
6. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados nesse estudo, podemos concluir que mioblastos são permissíveis à infecção pelo ZIKV, enquanto os miotubos não apresentam infecção produtiva, exibindo uma resposta imune antiviral mais potente, com vias e genes que não foram detectados em mioblastos, e que poderiam explicar a resistência dessas células com ausência de replicação viral. Além disso, somente miotubos expostos ao ZIKV apresentaram enriquecimento da via de ECM nos genes regulados positivamente. Visto que a interação da ECM com as células induz diversos efeitos biológicos, incluindo aumentos da sobrevivência, acreditamos que essa modulação também possa contribuir para a resistência das células diferenciadas. Também observamos que mioblastos infectados apresentam perturbações no ciclo celular e modulação das vias de morte, e que miotubos infectados aparentam ter hipertrofia e aumento de fusão. Esses resultados são importantes porque além de identificar vias e genes com potencial antiviral, mostram alterações na fisiologia das células musculares que podem não somente prejudicar o processo de regeneração, mas também ter efeitos sistêmicos prejudiciais para o indivíduo infectado.

Resumo dos resultados parciais:



- Mioblastos são susceptíveis à infecção pelo ZIKV
- Distúrbios no ciclo celular
- Não modulou expressão de integrinas
- Bloqueio do receptor alfa 6 não inibiu infecção
- Resposta imune caracterizada pelo perfil inflamatório
- Modulação nas vias de morte



PERSPECTIVAS

No presente trabalho, pudemos observar alterações no processo de proliferação e indução de um perfil inflamatório em mioblastos. Também observamos diferenças nas respostas de defesa entre mioblastos e miotubos. No entanto, alguns experimentos não puderam ser concluídos devido a pandemia, e será necessário completar os experimentos de proliferação, viabilidade e diferenciação/fusão.

Utilizamos um modelo de infecção pelo ZIKV em células musculares in vitro, que nos permite estudar fatores envolvidos na permissividade e resistência viral. Durante as análises do transcriptoma, pudemos observar a modulação mais intensa de genes com funções na restrição viral nos miotubos, que são resistentes à infecção pelo ZIKV. Foi possível observar o enriquecimento da via relacionada a resposta antiviral mediada por STING- estimulador de genes por IFN, esse gene codifica uma proteína envolvida na produção de IFN tipo I, um importante mediador na resposta imune inata. Como perspectivas neste trabalho, investigaremos o papel dessa molécula na susceptibilidade diferencial à infecção pelo ZIKV em células musculares, através do silenciamento e estímulo de STING na infecção pelo ZIKV.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aagaard KM, Lahon A, Suter MA, Arya RP, Seferovic MD, Vogt MB, et al. Primary Human Placental Trophoblasts are Permissive for Zika Virus (ZIKV) Replication. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(August 2016):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41389>
- Aguiar RS, Pohl F, Morais GL, Nogueira FCS, Carvalho JB, Guida L, et al. Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. 2020;6736(June):1–14.
- Ahmad K, Shaikh S, Ahmad SS, Lee EJ, Choi I. Cross-Talk Between Extracellular Matrix and Skeletal Muscle : Implications for Myopathies. *Front Pharmacol*. 2020;11(February):1–8.
- Ahsburner M, Ball CA, D B, H B. Gene Ontology : tool for the. *Nat Am Inc*. 2000;25(may):25–9.
- Al-Qusairi L, Laporte J. T-tubule biogenesis and triad formation in skeletal muscle and implication in human diseases. *Skelet Muscle*. 2011;1(1):1–11.
- Alaniz AJ. Zika virus: A compendium of the state of knowledge [Internet]. 2nd ed. *Encyclopedia of Environmental Health*. Elsevier Inc.; 2019. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-409548-9.11019-X>
- Ali AM, Kunugi H. Skeletal muscle damage in covid-19: A call for action. *Med*. 2021;57(4):1–8.
- Allbrook DB, Han MF, Hellmuth AE. Population of muscle satellite cells in relation to age and mitotic activity. *Pathology*. 1971;3(3):233–43.
- Almeida CF, Fernandes SA, Junior AFR, Oswaldo Keith Okamoto and MV. Muscle SC biology, 2016. *Stem Cells Int*. 2016;2016.
- Argilés JM, Campos N, Lopez-pedrosa JM, Rueda R, Rodriguez-mañas L. Skeletal Muscle Regulates Metabolism via Interorgan Crosstalk : Roles in Health and Disease. *J Am Med Dir Assoc* [Internet]. 2016;17(9):789–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jamda.2016.04.019>
- Aumailley M. The laminin family The laminin family. 2013;6918.
- Ausems CRM, van Engelen BGM, van Bokhoven H, Wansink DG. Systemic cell therapy for muscular dystrophies: The ultimate transplantable muscle progenitor cell and current challenges for clinical efficacy. *Stem Cell Rev Reports*. 2021;17(3):878–99.
- B. P. Chargé S, Rudnicki MA. Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration.

- Physiol Rev. 2003;95(1):321–36.
- Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion*. 2016;56(7):1684–8.
- De Barros Miranda-Filho D, Martelli CMT, De Alencar Ximenes RA, Araújo TVB, Rocha MAW, Ramos RCF, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *Am J Public Health*. 2016;106(4):598–600.
- Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ETDA, et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;19(5):705–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>
- Bentzinger CF, Wang YX, A. RM. Building Muscle: Molecular Regulation of Myogenesis. *ZEF Work Pap Ser*. 2012;94(July):32.
- Blázquez A-B, Saiz J-C. Neurological manifestations of Zika virus infection. *World J Virol*. 2016;5(4):135.
- Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–17.
- Boppart MD, Mahmassani ZS. THEME New and Emerging Roles of the Cytoskeleton in Striated Muscle Integrin signaling: linking mechanical stimulation to skeletal muscle hypertrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* [Internet]. 2019;317:629–41. Available from: www.ajpcell.org
- Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, de Sequeira PC, Nobre A, et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):1–13.
- Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, et al. The formation of skeletal muscle : from somite to limb. *J Anat*. 2003;2:59–68.
- Calve S, Odelberg SJ, Simon HG. A transitional extracellular matrix instructs cell behavior during muscle regeneration. *Dev Biol* [Internet]. 2010;344(1):259–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2010.05.007>
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika virus outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(10):1885–6.
- Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D. Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1592–5.
- Cavalcanti MG, Cabral-Castro MJ, Gonçalves JLS, Santana LS, Pimenta ES, Peralta JM. Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *Int J*

- Infect Dis [Internet]. 2017;57:70–2. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.042>
- Chal J, Pourquie O. Making muscle : skeletal myogenesis in vivo and in vitro. *Co Biol.* 2017;2104–22.
- Chan JFW, Yip CCY, Tsang JOL, Tee KM, Cai JP, Chik KKH, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect.* 2016;5:e93.
- Chemudupati M, Kenney AD, Bonifati S, Zani A, McMichael TM, Wu L, et al. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2019;1866(3):382–94.
- Costa LC, Veiga RV, Oliveira JF, Rodrigues MS, Andrade RFS, Paix ES, et al. New Insights on the Zika Virus Arrival in the Americas and Spatiotemporal Reconstruction of the Epidemic Dynamics in. 2021;
- Dave HD, Shook M, Varacallo M. Anatomy , Skeletal Muscle Free full text StatPearls [Internet]. Anatomy , Skeletal Muscle Blood Supply and Lymphatics. *Eur PMC.* 2019;1–7.
- Demonbreun AR, Biersmith BH, McNally EM. Membrane fusion in muscle development and repair. *Semin Cell Dev Biol [Internet].* 2015;45:48–56. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.semcdb.2015.10.026>
- Desdouits M, Munier S, Prevost MC, Jeannin P, Butler-Browne G, Ozden S, et al. Productive infection of human skeletal muscle cells by pandemic and seasonal influenza A(H1N1) viruses. *PLoS One.* 2013;8(11):1–15.
- Devlin RB, Emerson CP. Coordinate regulation of contractile protein synthesis during myoblast differentiation. *Cell.* 1978;13(4):599–611.
- Dick GWA. Zika virus pathogenicity and physical properties. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46(5):521–34.
- Domogatskaya A, Rodin S, Tryggvason K. Functional Diversity of Laminins. *Cell Dev Biol.* 2012;523–53.
- Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360(24):2536–43.
- Durbeej M. Laminins. *Cell Tissue Res.* 2010;339(1):259–68.
- Dzulkifli FA, Mashor MY, Jaafar H. An overview of recent counting methods for Ki67 IHC staining. *J Biomed Clin Sci.* 2018;3(2):10–7.

- Fabregat A, Jupe S, Matthews L, Sidiropoulos K, Gillespie M, Garapati P, et al. The Reactome Pathway Knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(November 2017):649–55.
- Feire AL, Koss H, Compton T. Cellular integrins function as entry receptors for human cytomegalovirus via a highly conserved disintegrin-like domain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(43):15470–5.
- Ferraris P, Cochet M, Hamel R, Gladwyn-Ng I, Alfano C, Diop F, et al. Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1003–16.
- Filippone C, Filippone C, Filippone C, Legros V, Legros V, Legros V, et al. Arboviruses and muscle disorders: From disease to cell biology. Vol. 12, *Viruses*. MDPI AG; 2020.
- Frontera WR, Ochala J. Skeletal Muscle : A Brief Review of Structure and Function. *Calcif Tissue Int.* 2014;
- Fu X, Wang H, Hu P. Stem cell activation in skeletal muscle regeneration. Vol. 72, *Cellular and Molecular Life Sciences*. Birkhauser Verlag AG; 2015a. p. 1663–77.
- Fu X, Xiao J, Wei Y, Li S, Liu Y, Yin J, et al. Combination of inflammation-related cytokines promotes long-term muscle stem cell expansion. *Cell Res.* 2015b;25(6):655–73.
- Garcia M, Wehbe M, Lévêque N, Bodet C. Skin innate immune response to flaviviral infection. Vol. 28, *European Cytokine Network*. John Libbey Eurotext; 2017. p. 41–51.
- Glass K, Girvan M. Annotation Enrichment Analysis : An Alternative Method for Evaluating the Functional Properties of Gene Sets. *Sci Rep.* 2014;1–9.
- Gorshkov K, Shiryayev SA, Fertel S, Lin YW, Huang CT, Pinto A, et al. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. *Front Microbiol.* 2019;10(JAN):1–17.
- Gourinat AC, O’Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of zika virus in urine. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(1):84–6.
- Grzelkowska-kowalczyk K. The Importance of Extracellular Matrix in Skeletal Muscle Development and Function. *Intechpen.com.books.* 2016;3–24.
- Gubler DJ, Vasilakis N, Musso D. History and Emergence of Zika Virus. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 10):S860–7.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 2015;89(17):8880–96.
- Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ, Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. Vol. 25, *Nature Structural and Molecular Biology*. Nature Publishing Group; 2018. p. 13–20.

- Heinz FX, Stiasny K. The Antigenic Structure of Zika Virus and Its Relation to Other Flaviviruses: Implications for Infection and Immunoprophylaxis. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2017 Mar;81(1).
- Henderson CA, Gomez CG, Novak SM, Mi-mi L, Gregorio CC. Overview of the Muscle Cytoskeleton. *Compr Physiol.* 2018;7(3):891–944.
- Hohenester E. Structural biology of laminins. *Essays Biochem.* 2019;63(3):285–95.
- Hussein HAM, Walker LR, Abdel-Raouf UM, Desouky SA, Montasser AKM, Akula SM. Beyond RGD: virus interactions with integrins. *Arch Virol.* 2015;160(11):2669–81.
- Joguet G, Mansuy JM, Matusali G, Hamdi S, Walschaerts M, Pavili L, et al. Effect of acute Zika virus infection on sperm and virus clearance in body fluids: a prospective observational study. *Lancet Infect Dis [Internet].* 2017;17(11):1200–8. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30444-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30444-9)
- Johnston LJ, Halliday GM, King NJC. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *J Invest Dermatol [Internet].* 2000;114(3):560–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1523-1747.2000.00904.x>
- Karimi O, Goorhuis A, Schinkel J, Codrington J, Vreden SGS, Vermaat JS, et al. Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika virus infection. *Lancet [Internet].* 2016;387(10022):939–40. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00502-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00502-X)
- Kim JH, Jin P, Duan R, Chen EH. Mechanisms of myoblast fusion during muscle development. *Curr Opin Genet Dev [Internet].* 2015;32:162–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2015.03.006>
- Kitzmann M, Carnac G, Vandromme M, Primig M, Lamb NJC, Fernandez A. The muscle regulatory factors MyoD and Myf-5 undergo distinct cell cycle-specific expression in muscle cells. *J Cell Biol.* 1998;142(6):1447–59.
- Kotredes KP, Gamero AM. Interferons as inducers of apoptosis in malignant cells. *J Interf Cytokine Res.* 2013;33(4):162–70.
- Kuang S, Rudnicki MA. The emerging biology of satellite cells and their therapeutic potential. *Trends Mol Med.* 2008;14(2):82–91.
- Kumar A, Jovel J, Lopez-Orozco J, Limonta D, Airo AM, Hou S, et al. Human sertoli cells support high levels of zika virus replication and persistence. *Sci Rep [Internet].* 2018;8(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-018-23899-x>
- Laumonier T, Menetrey J. Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop [Internet].* 2016;3(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40634-016-0051-7>

- Lebleu VS, Macdonald B, Kalluri R. Experimental Biology and Medicine Structure and Function of Basement Membranes. *Exp Biol Med*. 2007;
- Lee JK, Shin OS. Advances in zika virus–host cell interaction: Current knowledge and future perspectives. Vol. 20, *International Journal of Molecular Sciences*. MDPI AG; 2019.
- Leis AA, Stokic DS, Webb RM, Slavinski SA, Fratkin J. Clinical spectrum of muscle weakness in human West Nile virus infection. *Muscle and Nerve*. 2003;28(3):302–8.
- Lindley RA, Hall NE. APOBEC and ADAR deaminases may cause many single nucleotide polymorphisms curated in the OMIM database. *Mutat Res Fund Mol Mech Mutagen* [Internet]. 2018;810(November 2017):33–8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2018.03.008>
- Liu L, Dong H, Chen H, Zhang J, Ling H, Li Z, et al. Flavivirus RNA cap methyltransferase: Structure, function, and inhibition. Vol. 5, *Frontiers of Biology in China*. 2010. p. 286–303.
- Liu W. A review on the genetic regulation of myogenesis and muscle development. Vol. 15, *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*. Science Publications; 2019. p. 1–12.
- Liu X, Gao Y, Long X, Hayashi T, Mizuno K, Hattori S, et al. Type I collagen promotes the migration and myogenic differentiation of C2C12 myoblasts: Via the release of interleukin-6 mediated by FAK/NF- κ B p65 activation. *Food Funct*. 2020;11(1):328–38.
- Von Maltzahn J, Jones AE, Parks RJ, Rudnicki MA. Pax7 is critical for the normal function of satellite cells in adult skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013;110(41):16474–9.
- Manangeeswaran M, Kielczewski JL, Sen HN, Xu BC, Ireland DDC, McWilliams IL, et al. ZIKA virus infection causes persistent chorioretinal lesions article. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2018;7(1). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41426-018-0096-z>
- Mauro A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Cell Biol*. 1961;
- Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak McGuire D, et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N Engl J Med*. 2018;378(15):1377–85.
- Messias C V, Loss-morais G, Carvalho JB De, Mariela NG, Cunha DP, Vasconcelos Z, et al. Zika virus targets the human thymic epithelium. 2020;1–17.
- Metsky HC, Matranga CB, Wohl S, Schaffner SF, Freije CA, Winnicki SM, et al. Zika virus evolution and spread in the Americas. *Nature*. 2017;546(7658):411–5.
- Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe*

- [Internet]. 2017;21(2):134–42. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2017.01.004>
- Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle : A review of molecular structure and function , in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020a;(April 2019):1–46.
- Mukund K, Subramaniam S. Skeletal muscle: A review of molecular structure and function, in health and disease. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med*. 2020b;12(1):1–46.
- Murray KO, Gorchakov R, Carlson AR, Berry R, Lai L, Natrajan M, et al. Prolonged detection of zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis*. 2017;23(1):99–101.
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau VM. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect [Internet]*. 2014;20(10):O595–6. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12707>
- Musso D, Roche C, Nhan TX, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Detection of Zika virus in saliva. *J Clin Virol [Internet]*. 2015;68:53–5. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2015.04.021>
- Muthuraj PG, Sahoo PK, Kraus M, Bruett T, Annamalai AS, Pattnaik A, et al. Zika virus infection induces endoplasmic reticulum stress and apoptosis in placental trophoblasts. *Cell Death Discov [Internet]*. 2021; Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41420-020-00379-8>
- Nagy PD, Pogany J. The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. Vol. 10, *Nature Reviews Microbiology*. 2012. p. 137–49.
- Neufeldt CJ, Cortese M, Acosta EG, Bartenschlager R. Rewiring cellular networks by members of the Flaviviridae family. *Nat Rev Microbiol [Internet]*. 2018;16(3):125–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro.2017.170>
- Nicastri E, Castilletti C, Liuzzi G, Iannetta M, Capobianchi MR, Ippolito G. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance*. 2016;21(32):1–4.
- de Oliveira WK, Carmo EH, Henriques CM, Coelho G, Vazquez E, Cortez-Escalante J, et al. Zika Virus Infection and Associated Neurologic Disorders in Brazil. *N Engl J Med*. 2017;376(16):1591–3.
- Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso P V., Mouly V, et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. *PLoS One*. 2007;2(6).
- Papers JBC, Mayer U. Integrins : Redundant or Important Players in Skeletal Muscle ?*. *J Biol Chem [Internet]*. 2003;278(17):14587–90. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R200022200>

- Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, Amara A. Flavivirus entry receptors: An update. *Viruses*. 2013;6(1):69–88.
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein. MA. Zika Virus. 2016;(March 2015).
- Pęziński M, Daszczuk P, Pradhan BS, Lochmüller H, Prószyński TJ. An improved method for culturing myotubes on laminins for the robust clustering of postsynaptic machinery. *Sci Rep*. 2020;10(1):1–13.
- Pielnaa P, Al-Saadawe M, Saro A, Dama MF, Zhou M, Huang Y, et al. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. Vol. 543, *Virology*. Academic Press Inc.; 2020. p. 34–42.
- Pierson TC, Diamond MS. The continued threat of emerging flaviviruses. *Nat Microbiol* [Internet]. 2020;5(6):796–812. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-020-0714-0>
- Prescott J, Hall P, Acuna-Retamar M, Ye C, Wathelet MG, Ebihara H, et al. New world hantaviruses activate IFN λ production in type I IFN-deficient vero E6 cells. *PLoS One*. 2010;5(6):1–8.
- Rajan A, Persson BD, Frångsmyr L, Olofsson A, Sandblad L, Heino J, et al. Enteric Species F Human Adenoviruses use Laminin-Binding Integrins as Co-Receptors for Infection of Ht-29 Cells. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–14.
- Reznik M. Thymidine- 3 h uptake by satellite cells of regenerating skeletal muscle. *J Cell Biol*. 1969;568–71.
- Riederer I, Bonomo AC, Mouly V, Savino W. Laminin therapy for the promotion of muscle regeneration. *FEBS Lett*. 2015;589(22):3449–53.
- Sambasivan R, Yao R, Kissenpfennig A, Wittenberghe L Van, Paldi A, Gayraud-morel B, et al. Pax7-expressing satellite cells are indispensable for adult skeletal muscle regeneration (*Development* (2011), 138 (3647-3656)). *Development*. 2011;138(19):4333.
- Sanes JR. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem* [Internet]. 2003;278(15):12601–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R200027200>
- Santer R, Schneppenheim R, Dombrowski A, Gotze H, Steinmann B, Schaub J. Absence of integrin $\alpha 7$ causes novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet*. 1997;15:57–61.
- Schmidt M, Schüler SC, Hüttner SS, von Eyss B, von Maltzahn J. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. *Cell Mol Life Sci* [Internet]. 2019;76(13):2559–70. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03093-6>
- Serman TM, Gack MU. Evasion of innate and intrinsic antiviral pathways by the Zika Virus. Vol. 11, *Viruses*. MDPI AG; 2019.

- Severinsen MCK, Pedersen BK. Muscle–Organ Crosstalk: The Emerging Roles of Myokines. *Endocr Rev.* 2020;41(4):594–609.
- Sframeli M, Sarkozy A, Bertoli M, Astrea G, Hudson J, Scoto M, et al. Congenital muscular dystrophies in the UK population: Clinical and molecular spectrum of a large cohort diagnosed over a 12-year period. *Neuromuscul Disord* [Internet]. 2017;27(9):793–803. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nmd.2017.06.008>
- Simoni MK, Jurado KA, Abrahams VM, Fikrig E, Guller S. Zika virus infection of Hofbauer cells. *Am J Reprod Immunol.* 2017;77(2).
- Simons P, Rinaldi DA, Bondu V, Kell AM, Bradfute S, Lidke D, et al. Integrin activation is an essential component of SARS-CoV-2 infection. *bioRxiv* [Internet]. 2021;2021.07.20.453118. Available from: <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.20.453118v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2021.07.20.453118v1.abstract>
- Sirohi D, Kuhn RJ. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J Infect Dis.* 2017;216(Suppl 10):S935–44.
- Snijders T, Nederveen JP, McKay BR, Joannis S, Verdijk LB, Loon LJC Van, et al. Satellite cells in human skeletal muscle plasticity. *Front Physiol.* 2015;6(October):1–21.
- de Souza YRM, Manso PP de A, de Oliveira BCEPD, Terra MABL, Paschoal T, Caminha G, et al. Generation of yellow fever virus vaccine in skeletal muscle cells of chicken embryos. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019;114(11):1–10.
- Swaminathan S, Schlaberg R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR. Fatal Zika Virus Infection with Secondary Nonsexual Transmission. *N Engl J Med.* 2016;375(19):1907–9.
- Tabata T, Petitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Wang C, Fang-Hoover J, et al. Zika Virus Targets Different Primary Human Placental Cells, Suggesting Two Routes for Vertical Transmission. *Cell Host Microbe* [Internet]. 2016;20(2):155–66. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.07.002>
- Tajbakhsh S. Skeletal muscle stem cells in developmental versus regenerative myogenesis. *J Intern Med.* 2009;
- Tan JJJ, Balne PK, Leo YS, Tong L, Ng LFP, Agrawal R. Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Sci Rep* [Internet]. 2017;7(1):1–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-09479-5>
- Tan TY, Fibriansah G, Kostyuchenko VA, Ng TS, Lim XX, Zhang S, et al. Capsid protein structure in Zika virus reveals the flavivirus assembly process. *Nat Commun* [Internet]. 2020;11(1):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-14647-9>
- Tang H, Hammack C, Ogden SC, Jin P. Zika Virus Infects Human Cortical Neural

- Progenitors and Attenuates Their Growth Brief Report Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Stem Cell* [Internet]. 2016;18(5):587–90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016>
- Thomas K, Engler AJ, Meyer GA. Extracellular matrix regulation in the muscle satellite cell niche. *Connect Tissue Res*. 2015;56(1):1–8.
- Thorsteinsdottir S, Deries M, Cachaço AS, Bajanca F. The extracellular matrix dimension of skeletal muscle development. *Dev Biol*. 2011;354(2):191–207.
- Thyrell L, Erickson S, Zhivotovsky B, Pokrovskaja K, Sangfelt O, Castro J, et al. Mechanisms of interferon-alpha induced apoptosis in malignant cells. *Oncogene*. 2002;21(8):1251–62.
- Tiburcy M, Markov A, Kraemer LK, Christalla P, Henrike MR, Holger JF, et al. Regeneration competent satellite cell niches in rat engineered skeletal muscle. 2019;(February):731–46.
- Trovato FM, Imbesi R, Conway N, Castrogiovanni P. Morphological and Functional Aspects of Human Skeletal Muscle. *J Funct Morphol Kinesiol*. 2016;289–302.
- Valente AP, Moraes AH. Zika virus proteins at an atomic scale: How does structural biology help us to understand and develop vaccines and drugs against Zika virus infection? *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2019;25(February 2019):1–14.
- Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K, Hai R. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2017;6(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.141>
- Wang C, Rabadan Ros R, Martinez-Redondo P, Ma Z, Shi L, Xue Y, et al. In vivo partial reprogramming of myofibers promotes muscle regeneration by remodeling the stem cell niche. *Nat Commun* [Internet]. 2021;12(1):1–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23353-z>
- Warke R V., Becerra A, Zawadzka A, Schmidt DJ, Martin KJ, Giaya K, et al. Efficient dengue virus (DENV) infection of human muscle satellite cells upregulates type 1 interferon responses genes and differentially modulates MHC 1 expression on bystander and DENV-infected cells. *J Gen Virol*. 2008;89(7):1605–15.
- Wen Z, Song H, Ming GL. How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev*. 2017;31(9):849–61.
- Yamamoto M, Legendre NP, Biswas AA, Lawton A, Yamamoto S, Tajbakhsh S, et al. Loss of MyoD and Myf5 in Skeletal Muscle Stem Cells Results in Altered Myogenic Programming and Failed Regeneration. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2018;10(3):956–69. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2018.01.027>

- Yurchenco PD. Integrating Activities of Laminins that Drive Basement Membrane Assembly and Function [Internet]. Vol. 76, Current Topics in Membranes. Elsevier Ltd; 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ctm.2015.05.001>
- Za S, Isa P, Lo S, Arias CF, Guerrero CA, Me E. Integrin $\alpha_3\beta_1$ mediates rotavirus cell entry. 2000;
- Zanluca C, Campos V, Melo A De, Luiza A, Mosimann P, Igor G, et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. 2015;110(June):569–72.
- Zhang K, Sha J, Harter ML. Activation of Cdc6 by MyoD is associated with the expansion of quiescent myogenic satellite cells. J Cell Biol. 2010;188(1):39–48.
- Zhang N, Zhang N, Qin CF, Liu X, Shi L, Xu Z. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. Cell Stem Cell [Internet]. 2016;19(1):120–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017>

8. ANEXO

8.1 Manuscrito- Riederer *et al.* 2021, artigo submetido, 2021.

Zika virus disrupts gene expression in human myoblasts and myotubes: relationship with susceptibility to infection

Ingo Riederer^{1,2,3,4*}, Daniella Arêas Mendes da Cruz^{1,2,3,4}, Guilherme Cordenonsi da Fonseca⁵, Mariela Natacha González^{1,2}, Otavio Brustolini⁵, Cássia Rocha^{1,2}, Guilherme Loss⁵, Joseane Biso de Carvalho⁵, Mariane Talon Menezes⁶, Lidiane Menezes Souza Raphael⁷, Alexandra Gerber⁵, Myrna Cristina Bonaldo⁷, Gillian Butler-Browne⁸, Vincent Mouly⁸, Vinicius Cotta-de-Almeida^{1,2,3}, Wilson Savino^{1,2,3,*}, Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos^{5,*}.

Affiliations

¹Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

²National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (INCT-NIM); Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

³Rio de Janeiro Research Network on Neuroinflammation (RENEURIN), Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

⁴School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Central Lancashire, Preston, England, UK;

⁵Bioinformatics Laboratory, National Laboratory for Scientific Computing, Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil;

⁶Department of Genetics, Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁷Laboratory of Molecular Biology of Flavivirus, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil;

⁸Sorbonne Université, Inserm, Institut de Myologie, Centre de Recherche en Myologie, F-75013 Paris, France.

***Corresponding authors**

Ana Tereza Ribeiro de Vasconcelos

Bioinformatics Laboratory, National Laboratory for Scientific Computing, Petropolis, Rio de Janeiro, Brazil

E-mail: atriv@lncc.br

Ingo Riederer

Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

E-mail: ingoriederer@gmail.com

Wilson Savino

Laboratory on Thymus Research, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil

E-mail: wilson.savino@fiocruz.br - savino.w@gmail.com

Keywords: Zika virus; human myoblasts; human myotubes; transcriptome; miRNA; adhesion molecules; antiviral responses.

8.2 Abstract

The tropism of Zika virus (ZIKV) has been described in the nervous system, blood, placenta, thymus, and skeletal muscle. We investigated the mechanisms of skeletal muscle susceptibility to ZIKV using an *in vitro* model of human skeletal muscle myogenesis, in which myoblasts differentiate into myotubes. Myoblasts were permissive to ZIKV infection, generating productive viral particles, while myotubes controlled ZIKV replication. To investigate the underlying mechanisms, we used gene expression profiling. A comparison between non-infected and infected myoblasts revealed more than 500 differentially expressed genes (DEGs). In contrast, infected myotubes showed almost 2,000 DEGs, among which we detected genes and pathways highly or exclusively expressed in myotubes, including those related to antiviral and innate immune responses. In conclusion, we showed that ZIKV largely (but differentially) disrupts gene expression in human myoblasts and myotubes. The identification of genes involved in myotube resistance can shed light on potential antiviral mechanisms against ZIKV infection.

Author summary

Zika virus (ZIKV) was responsible for a large pandemic surge between 2015 and 2016; Brazil being the epicenter with very high numbers of congenital ZIKV syndrome that included microcephaly, among other manifestations, including myalgia. In the present study, we our showed that human myoblasts are susceptible to ZIKV infection while myotubes are resistant. In fact, we show that myotubes are permissive to ZIKV entrance but control the productive infection. We also elucidated the transcriptional mechanisms triggered by the ZIKV, which stimulated a more complex intrinsic antiviral response in myotubes than in myoblasts. Such mechanisms could explain the resistance of the differentiated cells.

8.3 Introduction

The Zika virus (ZIKV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) from the *Flaviviridae* family and genus *Flavivirus*, which also includes dengue, yellow fever, and West Nile viruses. Congenital ZIKV infection results in a range of neurological abnormalities in children, collectively defined as congenital Zika syndrome (1,2), comprising, among others, microcephaly, decreased brain tissue, absence of brain structures, eye abnormalities, as well as congenital contractures such as arthrogryposis (3).

Several studies have described the tropism of ZIKV for different cell types of the central nervous system like microglia, neural stem cells, and progenitor cells, as well as in other tissues such as skin, blood, placenta, retina, thymus, as well as smooth and skeletal muscle (4–10).

A spectrum of neurological outcomes was described in toddlers and preschoolers that have been congenitally infected by the ZIKV (11). In this study, children were separated into groups termed corticospinal or neuromuscular based on their clinical signs, with or without dyskinetic findings. Comorbidities in the neuromuscular group were highly prevalent and had worse functional outcomes than the corticospinal group (11). Furthermore, infants can develop features consistent with fetal immobility, ranging from dimples, distal hand/finger contractures and foot mispositioning to generalized arthrogryposis (12).

The adult skeletal muscle in mammals is under normal conditions a very stable tissue but has a remarkable ability to repair after injury due to the presence of adult stem cells called satellite cells.

The pool of satellite cells can provide myogenic cells, which proliferate (myoblasts), differentiate and fuse into myotubes, leading to the formation of new multinucleated myofibers, physiologically formed by the fusion of many myoblasts during embryonic and fetal development (13).

Satellite cells are quiescent cells located in niches on the surface of myofibers, under the basement membrane (14,15). In adults, they can be activated and recruited to generate myonuclei for muscle fiber homeostasis, or for the more sporadic demands such as myofiber hypertrophy or repair (16).

Importantly, in addition to producing the progeny necessary for differentiation, satellite cells also maintain their own population by self-renewing (17).

Previous data revealed that myoblasts are permissive to arboviruses, including the chikungunya virus (18). In the same vein, it has been shown that primary disorders caused by ZIKV, such as microcephaly and arthrogryposis (2,3), occur during the fetal phase and infancy when myoblasts are continually merging into myotubes to promote muscle growth.

Recently, it was demonstrated *in vitro* that human myoblasts could be infected by ZIKV, whereas myotubes are resistant to infection (10). These findings indicate that the susceptibility to infection is dependent on the differentiation state of the muscle cells. Such a susceptibility was observed with three different virus isolates and with primary myoblasts from three different donors, as well as with a muscle cell line. In all cases, ZIKV infection of myoblasts was productive, indicating that muscle cells can account for a peripheral site of viral amplification, which might contribute to the pathophysiology of ZIKV infection.

However, a series of questions related to the differential responses of myoblasts and myofibers to ZIKV infection remained unanswered, and the corresponding changes in transcription control could shed light on the mechanisms leading from a permissive state in myoblasts to a resistant state in myotubes. Herein we analyzed functional and gene expression profiles (including transcriptome and miRNome) in ZIKV infected human myoblasts and myotubes compared to non-infected controls, aiming to provide clues to the mechanisms involved in susceptibility *versus* the resistance of skeletal muscle cells to ZIKV infection.

8.4 Results

Characterization of ZIKV infection of human skeletal muscle cells

To investigate the mechanisms involved in skeletal muscle susceptibility or resistance to ZIKV infection, we applied an *in vitro* model of human skeletal muscle myogenesis, in which proliferating myoblasts

can be differentiated in myotubes (see materials and methods). For this, we used the immortalized human cell line LHCN-M2 (19), being positive for desmin and CD56, myogenic markers (Supplemental Fig. 1) and can be induced to differentiate to form multinucleated myotubes expressing myosin heavy chain (MyHC), a sarcomeric protein expressed only in differentiated muscle cells (Fig. 1c). We observed that, using 0.1 MOI dose of infection, human myoblasts are susceptible to the RIO-U1 ZIKV infection, whereas myotubes are resistant. Around 70% of myoblasts were positive for the presence of 4G2-labeled viral envelope protein, 72 hours post-infection (Fig. 1a-b), whereas myotubes (positive for MyHC labeling) remained negative for 4G2 immunostaining at the same time point (Fig. 1c).

Differential gene expression during myoblast differentiation

Considering the different susceptibility of myoblasts to ZIKV infection, as compared to myotubes, we first analyzed gene expression in cultures of myoblasts *versus* myotubes, in the absence of any infection. We found that 2,200 differentially expressed genes (DEGs) were significantly upregulated in myotubes, as compared to myoblasts, whereas 2,364 genes were downregulated, comprising various RNA classes (miRNAs not being included herein), comprising protein-coding and long non-coding RNAs (Table 1, Supplemental Table 1a-b).

Interestingly, Volcano plot analysis revealed that, although more genes were downregulated in myotubes, these cells showed a higher number of upregulated genes with 10-fold enhanced expression (Supplemental Fig. 2). As expected, when we clustered the upregulated protein-coding genes by means of Gene Ontology, myotube-derived upregulated pathways were related to skeletal muscle cell development, differentiation, contraction, ion transport and muscle metabolism (Fig. 2a). Of note, the myotubes used in this study were analyzed at 6 days of differentiation.

To highlight the most upregulated genes, we chose 5 relevant upregulated GOs, and identified the 10 most upregulated genes within each of those GO pathways (Fig. 2b). Most of these genes, including the ones with more than 8-fold log changes, are involved in the differentiation and contraction of the

striated skeletal muscle. By contrast, differentiation of myotubes from myoblasts led to the gene downregulation in GOs involved in cell proliferation/cell cycle, cell migration, cytokine production, adhesion, extracellular matrix organization and cell death/apoptosis (Fig. 2c). Figure 2d shows the most downregulated genes in 5 selected GOs. Some with approximately 6 log fold change, these genes are related to cell cycle and migration and are expected to be blocked or reduced in the transition of myoblasts to myotubes.

Differences in gene expression between myoblasts and myotubes also concerned miRNAs, with 96 miRNAs being upregulated and 80 downregulated in myotubes, as compared to myoblasts (Table 1). In a similar way to the expression of the mRNAs, but with a reverse pattern, the upregulated miRNAs also presented the highest fold change values, with the miR-499a-5p being the most upregulated with a log₂ fold change of 8.446, and the miR-3923-3p the most downregulated with a log₂ fold change of -6.518 (Supplemental Table 2a). Interestingly, the miR-499a-5p is a skeletal muscle-specific microRNA related to the inhibition of both cell migration and proliferation(20).

We also searched for the validated miRNA targets that present the inverse expression pattern from the miRNAs. This miRNA-target network revealed 1,468 up- and downregulated genes (Supplemental Table 2b). The GO enrichment analysis of these target genes showed that they were mostly related to DNA replication and cell division (Supplemental Fig. 3).

ZIKV disrupts gene expression profiles in both myoblasts and myotubes.

Since myoblasts, but not myotubes, are permissive to intracellular ZIKV replication, we next searched to evaluate gene expression profiles that could provide clues to explain this difference. We found that 507 differentially expressed genes were significantly upregulated in ZIKV-infected myoblasts and 1,390 in myotubes that were in contact with ZIKV (ZIKV-treated myotubes), as compared to the corresponding non-infected (mock) cells. Conversely, 206 genes were downregulated in infected

myoblasts and 587 in ZIKV-treated myotubes, including various RNA classes, as seen in Table 1 and Supplementary Table 1c-f.

The corresponding Venn diagram revealed that among the 507 upregulated genes in infected myoblasts, 222 were also upregulated in infected myotubes, but 4 were downregulated. Additionally, among the 206 downregulated genes in myoblasts, 35 were also downregulated in myotubes, whereas 13 were upregulated. In contrast, myotubes upregulated 1,390 genes after ZIKV-treatment, with 220 being also upregulated in myoblasts, whereas 13 were downregulated. Furthermore, 35 out of the 587 genes downregulated in ZIKV-treated myotubes were also downregulated in myoblasts, whereas 4 were upregulated. These findings are summarized in Supplemental Fig. 4.

Volcano plot analysis revealed that, not only there were more genes upregulated in both myoblasts and myotubes exposed to ZIKV (almost the double), when compared to the downregulated genes (Table 1), but that this upregulation was more intense, with up to 10-fold enhanced expression (Supplemental Fig. 5). Altogether, these findings reveal that, although many genes were similarly influenced by ZIKV exposure in both myoblasts and myotubes, clear differences were also seen with specific changes in either myoblasts or myotubes.

Following the general analysis of gene modulation in both ZIKV-treated myoblasts and myotubes, we evaluated the biological pathways significantly enriched after the contact with the virus, applying for that Gene Ontology (GO), Reactome and KEGG databases (data available at http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika). First, we analyzed the pathways related to the muscle system/physiology. As expected, GO analysis of myoblasts revealed an enhancement of pathways related to cell death/apoptosis and cytokine/chemokine production after ZIKV infection. Curiously, pathways related to adhesion and migration were also enhanced by the presence of the virus (Fig. 3a). We then chose 5 GO pathways from Fig. 3a to highlight the highly expressed genes. Most of them are related to the intrinsic antiviral response, as well as cytokines, adhesion, and apoptotic pathways (Fig. 3b).

In ZIKV-treated myotubes, cytokine and chemokine production, extracellular matrix organization and adhesion pathways were enhanced, as was the case for GOs related to migration, proliferation, and cell cycle (Fig. 3c). As observed for infected myoblasts, an upregulation of several genes from the intrinsic antiviral response, but also genes related to ECM, adhesion, cytokines/chemokines were detected, as seen in the circus plot comprising the 5 chosen GO pathways (Fig. 3d). Of note, we found an upregulation in the cell death/apoptosis pathways, despite the absence of signs of death or apoptosis.

Overall, these results show that, although we could not detect ZIKV protein in myotubes exposed to the virus, it did induce a large change in the gene expression profiles in these cells, even more pronounced than those seen in myoblasts. Moreover, many of the highly upregulated genes in ZIKV-treated myotubes were related to the intrinsic response against viruses.

The alterations observed in myotubes could be a consequence of the interaction of the virus with membrane receptors on the cells, possibly stimulating them without internalization of viral particles; alternatively, the virus could enter the cells but not (or barely) replicate. We thus analyzed the expression of both positive and negative strands of the ZIKV RNA in myoblasts and myotubes. We did find the positive, but not the negative, ZIKV RNA sequence within myotubes, strongly suggesting that the virus enters in myotubes but does not progress to RNA replication and protein synthesis; both necessary for a productive infection (Fig. 4a). As expected, myoblasts presented both positive and negative strands reinforcing the competent virus replication on those cells.

ZIKV induces the upregulation of genes related to type I interferon, as well as innate and adaptive immune responses.

When we analyzed the most upregulated genes in ZIKV-treated myoblasts and myotubes (Fig. 3b and 3d, respectively), we noticed that many of them were part of the immune and antiviral responses.

After defining that ZIKV can enter in myotubes but does not replicate within these cells, we searched for upregulated pathways related to the intrinsic antiviral responses. We observed that both cell types upregulate several GO pathways involved in the antiviral response (Fig. 4c-d). However, ZIKV-treated myotubes (Fig. 4c) displayed antiviral pathways that were not found in infected myoblasts (Fig. 4b). Also, most pathways regulated in both cell types presented an increased Gene Ratio in myotubes, when compared to the same pathways in myoblasts.

We also analyzed antiviral pathways in the Reactome database. Like the GO, a larger number of pathways, some of them including a high number of genes, were upregulated in myotubes, when compared to myoblasts (Supplemental Fig. 6a-b). Of particular interest was the identification of the STING pathway -- essential for the antiviral response -- that was only upregulated in ZIKV-treated myotubes.

Several GO and Reactome pathways related to the innate and the adaptive immune responses, in both myoblasts and myotubes, were also upregulated, even when we restricted the evaluation to intrinsic antiviral pathways (Supplemental Fig. 6-7). As seen in Figure 4, the highest upregulated genes within 5 selected GOs were related to innate and adaptive immune responses as well as to the antiviral response, in both ZIKV-treated myoblasts and myotubes, compared to non-infected cells. Some of those genes were upregulated in myotubes but not in myoblasts, such as TLR2, AIM2, CEACAM1, IL12RB1, TRIM38, RIPK2, IFIT2, LGALS9, ADGRE1, ISG20, CTSS and SERPING1 (Fig. 4e).

This further prompted us to investigate the genes involved in mechanisms that could explain myoblast susceptibility and/or myotube resistance to ZIKV productive infection. In this respect, we observed that several genes involved in the inhibition or the control of ZIKV replication were highly upregulated in myotubes, being slightly or not upregulated in infected myoblasts (Fig. 4f). Among those genes, some such as the TRIM family (TRIM5, TRIM21, TRIM22, TRIM26 and TRIM56) are involved in the inhibition of virus uncoating and disassembly (21); while others are related to the inhibition of viral replication, such as ADAR, APOBEC3B, APOBEC3F, APOBEC3G, OAS3, MOV10, SAMHD1 and STING (22–25). Moreover, we found genes involved in the inhibition of translation and assembly of viral proteins

such as the STING, EIF2AK2 and DDX60 (23,26,27); or involved in the inhibition of the release of newly formed viral particles, as for example the BST2 gene (28).

Some upregulated genes in myotubes are related to viral RNA recognition, such as MDA5 and DDX58/RIG1 (29), and to the response induced by type I IFNs, namely JAK2, STAT1 and STAT2). Type I IFNs are the major products involved in the intrinsic cell response to viruses, with IFN- α/β being upregulated(30). In our experimental model, both myoblasts and myotubes responded to ZIKV by upregulating IFN- β gene expression (with a log₂ fold change of 11.31 in myoblasts and 8.11 in myotubes), but not IFN- α . Also, the GO “Type III Interferon production” was upregulated in both myoblasts and myotubes, with the highest gene ratio (Fig. 4c-d).

In the absence of infection, we observed that IFN- α and IFN- β genes were not modulated during myoblast differentiation to myotubes. However, the analysis of selected GO terms in myotubes showed that the differentiation process induced the upregulation of the pathway “Response to type I Interferon”, which comprises many other genes involved in the cellular antiviral response (data available at http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika/). In contrast, GO processes related to virus entry and viral life cycle were downregulated in myotubes, including the “Entry into host”, “Interactions with the host” and “Positive regulation of viral life cycle processes”. These results suggest that muscle cell differentiation *per se* makes myotubes more resistant to viral infections, by upregulating antiviral genes related to the type I interferon response, and downregulating a set of genes, which could facilitate viral entry and replication.

Zika virus modulates miRNA expression in human myoblasts and myotubes

In contrast to the gene expression, ZIKV altered three times more the expression of miRNAs in myoblasts, as compared to myotubes (Table 1), with the miR-3614-5p being the most upregulated miRNA in both myoblasts and myotubes with a higher fold change value in the myotubes exposed to ZIKV (Supplemental Tables 2c-d). The miRNA-target network of the ZIKV-infected myoblasts presented

7 miRNAs upregulated with 14 downregulated target genes, and 10 miRNAs downregulated with 50 upregulated targets genes (Fig. 5a-b, Supplemental Tables 2c, e). The miRNA-target network of ZIKV-treated myotubes revealed 3 upregulated miRNAs with 14 downregulated targets and 3 downregulated miRNAs with 24 upregulated targets (Fig. 6a-b, Supplemental Tables 2d, f).

8.5 Discussion

Our work provided clear evidence that *in vitro* ZIKV exposure to both myoblasts and myotubes results in profound changes in gene expression profiles, comprising both protein-coding genes and microRNAs. Most strikingly were the extensive significant changes seen in myotubes that occurred in the absence of a productive intracellular viral particle replication.

The transformation of myoblasts into myotubes is a complex process that profoundly modifies the skeletal muscle progenitor cell, resulting in cell fusion and syncytium formation, with extremely specialized functions, ranging from sarcomeric structure, responsible for muscle contraction, to metabolism (31). Considering this concept, we first compared the gene expression profiling of “myotubes versus myoblasts” in the absence of any infection. The analysis of the 4,500 DEGs, which follows the myoblast differentiation into myotubes, pointed to cell adhesion, extracellular matrix organization, migration, proliferation/cell cycle as the major downregulated pathways. Interestingly, the most downregulated gene was the COL8A1, which encodes the collagen type VIII α 1 chain. This protein is produced by satellite cells, promoting their proliferation through the PI3K/AKT signaling pathway (32). Also significantly downregulated were the CENPF (centromere protein F) gene, which encodes a protein component of the nuclear matrix during the G2 phase of interphase(33), and the HAS2 (hyaluronan synthase 2) gene, which is related to wound healing and cell migration (34,35). Of note, hyaluronic acid inhibits myoblast fusion and differentiation (36,37). Other noticeable downregulated genes comprised those encoding the Ki-67 protein and the topoisomerase II α , well-known cell cycle-related markers (38), the ID1 myogenesis inhibitor (39), and the c-Myb, which inhibit

myogenic differentiation through the repression of MyoD (40). In summary, the functions of these significantly downregulated genes are related to the inhibition of cell cycle, which is required for muscle differentiation in physiological conditions (41).

In myotubes, the most upregulated GO pathways, as compared to myoblasts, were related to the skeletal muscle fiber organization, fiber contraction and muscle metabolism. We found that MYBPB1, ACTA1, MYH8, CSRP3, TNNI2, MB, TNNC2, TMOD1, ATPA2A1 and SCN4 are among the most upregulated genes; and all of them being related to muscle integrity, sarcomere structure and contraction, as well as metabolism (42–50). Corroborating previous findings (51), our results highlight the genes and pathways modulated during the transition of myoblasts to myotubes in non-infective conditions.

A less expected change in gene expression is the upregulation of antiviral pathways, such as “*Response to type I Interferon*”, detected in myotubes when compared to myoblasts without any infection. This contrasted with the downregulation of GO processes that facilitate viral life cycle. As an example, the AXL gene, coding for one of the ZIKV receptors in different cell types, is highly downregulated in myotubes (data available at http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika/). In this sense, the myoblast-into-myotube differentiation process seems to render myotubes more resistant to viral infections when compared to the proliferating muscle progenitor cells. Indeed, our study confirms recent findings showing that human myoblasts are susceptible to ZIKV infection, with the detection of intracellular virus protein, and both positive and negative virus RNA strands. Conversely, myotubes are resistant to infection and negative for ZIKV proteins (Legros et al., 2020). We clearly demonstrated that only the positive virus RNA strands were detected in these cells, showing that despite the downregulation of AXL, ZIKV can infect myotubes, but are unable to progress towards a productive transcription and translation to form new virions.

The differentiation-dependent myoblast susceptibility to ZIKV was also observed for other viruses such as chikungunya virus (CHIKV) and Sleeping Disease Virus (SDV) (18,52). However, this does not seem

to be a typical characteristic of skeletal muscle cells, since other viruses like dengue, sinbis and influenza also infect myotubes (53–55).

When myoblasts were infected with ZIKV, they underwent important gene modulation, involving significant changes in 713 genes, representing 2.2% of the total DEGs. Although myotubes were resistant to productive infection, the changes in their transcriptome were even more intense than those seen in infected myoblasts, with more than twice as much dysregulated genes. This higher gene modulation may reflect both the entry of the virus in myotubes, but also the capacity of myotubes to control ZIKV replication.

Expression of interferon type I cytokines is a hallmark of the antiviral host response (30). Accordingly, both infected myoblasts and myotubes massively upregulated IFN- β gene expression, but not IFN- α , and pathways related to the intrinsic antiviral immune response (particularly those related to the interferon type I pathways). Also, both cell types exposed to ZIKV upregulated several genes and pathways involved in the attraction, activation as well as regulation of cells and molecules from the innate and adaptive immune response. Using GO and Reactome databases, we found several pathways related to the host antiviral response being upregulated in muscle cells three days after infection. Upon ZIKV exposure, most of these pathways were upregulated in both myoblasts and myotubes, but most of them involved more genes in myotubes. Moreover, some pathways were detected only in myotubes, like the “STING mediated induction of host immune responses”. STING-cGAS signaling leads the production of several cytokines, including type I interferons (23). The transcriptome analysis showed that myotubes, resistant to ZIKV infection, expressed more upregulated genes and pathways involved in the antiviral response.

The signaling pathways “Toll-like”, “RIG-I-like” and “NOD-like” are involved in the initial sensing of viral infection (56). KEGG analysis revealed that these three pathways were upregulated in both infected myoblasts and myotubes, being more enriched in myotubes as compared with myoblasts (data available at http://biotools.labinfo.Incc.br/muscle_zika).

Other important initial sensors for the virus presence are the inflammasomes (57–59). Despite no

significant gene modulation of IL1- β , IL-18 and IL-33, other genes of the inflammasome complex were highly upregulated, and again more intensely in myotubes than myoblasts, such as NLRP3 and CASP1, or AIM2; the latter being upregulated only in myotubes.

Overall, by comparing gene expression changes in both cell types, we showed that different groups of genes related to viral resistance or response were upregulated in ZIKV-exposed myotubes, but not (or less upregulated) in infected myoblasts (see Fig. 7). These genes included ISG15 and the TRIM family (TRIM5, TRIM21, TRIM22, TRIM26 and TRIM56), which are involved in inhibiting the virus uncoating and disassembly (21). Furthermore, genes related to the inhibition of viral replication were upregulated in myotubes, such as ADAR, APOBEC3B, APOBEC3F, APOBEC3G, OAS3, MOV10, SAMHD1, as well as STING, which is involved in the inhibition of translation and assembly of viral proteins, and the EIF2AK2 and DDX60 genes (23–26,60). The BST2 gene is also upregulated in infected myotubes, which is in keeping with the data showing that the release of new viral particles can be inhibited by BST2 (24).

Other genes upregulated in myotubes are related to virus recognition, such as IFIH1/MDA5 and DDX58/RIG1. They recognize viral double-stranded (ds) RNA and initiate the type 1 IFN transcription pathway, which is involved in the inhibition of ZIKV infection (29). In parallel, the expression of JAK2, STAT-1 and STAT-2 genes was also upregulated in myotubes. Both are part of type 1 IFNs pathway that induce the transcription of IFN-stimulated genes (ISGs), such as MX1, MX2 and ISG15, among others, that can inhibit viral translation, assembly, uncoating and disassembly, respectively (24).

Conceptually, the comparative analysis between the two types of muscle cells highlights pathways and genes that may be responsible for the resistance to ZIKV infection of differentiated muscle cells.

The skeletal muscle system is not only responsible for maintaining posture and movement. Still, it is also a highly metabolic and endocrine organ that produces soluble factors, such as myokines, which interact with several other organs (61,62). As an example, the prototype myokine IL-6 causes hyperinsulinemia, liver inflammation and other systemic alterations (63). We observed that the gene encoding this myokine is upregulated in infected myotubes, and the enhancement of IL-6 secretion by

skeletal muscle could have impact on the central nervous system, since IL-6 can act synergistically with IL-17 to protect cells from apoptosis, promoting viral persistence (64).

Furthermore, we observed that pathways related to cytokine and chemokine production, adhesion and migration were upregulated, whereas muscle development, filament sliding, and contraction were downregulated in both cell types after ZIKV exposure. Interestingly, GO pathways of cell migration and cell proliferation were upregulated in infected myotubes, suggesting that ZIKV modulates biological processes that should be turned off in muscle cells.

We also evaluated the microRNA expression profile under ZIKV exposure. We found that most of the miRNAs targets differentially expressed in the myotubes, compared with myoblasts, are related to cell division, chromosome segregation and DNA replication (Supplemental Fig 3a). Also, the miRNA-target network of the ZIKV-infected myoblasts showed several miRNAs that are likely related to the response to interferon- γ as miR-32-5p (RAB7B), miR-1307-3p (GBP4 and IRF1), miR-324-3p (ICAM1 and HLA-F), miR29b-1-5p (SOCS1) and miR-30c-2-3p (CXCL16).

The miRNAs 141-5p, 370-5p, 29b-5p, 532-3p, which presented changes in expression in ZIKV-infected myoblasts, have also been reported in other viral infections (65). One of the validated targets of the miR-29b-5p, which is downregulated in ZIKV-infected myoblasts, is the SOCS1 gene. The SOCS (suppressors of cytokine signaling) gene family has been reported to be upregulated in viral infections, promoting the progression of the viral life cycle by inhibiting antiviral signaling pathways and ubiquitination of viral proteins (66).

In conclusion, our work clearly reveals, not only that human skeletal muscle cells are targets for ZIKV (even in the absence of virus replication in myotubes), but also that these cells undergo a profound modulation of gene expression, including protein-coding genes and miRNAs related to various cell biological responses. The transcriptomic analyses revealing the modulation of genes and miRNAs related to viral resistance and/or response in myotubes point to several pathways potentially involved in the mechanisms of ZIKV resistance or inhibition of productive infection in those differentiated cells and can thus be useful to define targets for future strategies aiming at ZIKV resistance.

Acknowledgements

The authors thank Dr Renato Santana Aguiar for valuable discussions on the mechanisms of viral resistance, Mrs Raquel de Souza Martins for confocal analysis assistance, and the platform Myoline from the Institute of Myology in Paris for the human cell lines. The mouse monoclonal 4G2 antibody (anti-flavivirus) was gently provided by the Laboratory of Monoclonal Antibody Technology from Bio-Manguinhos (Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil). This work was supported by FINEP (grant no. 01.16.0078.00), partially supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548 and RABICO/CAPES Project 88887.333817/2019-00 and FIOCRUZ-PASTEUR Program, FIOCRUZ, CNPq, CAPES, FINEP, FAPERJ (Brazil), and MercoSur Fund for Structural Convergence (FOCEM). This work was developed in the frameworks of the Brazilian National Institute of Science and Technology on Neuroimmunomodulation (CNPq) and the Rio de Janeiro Research Network on Neuroinflammation (Faperj). A.T.R.V. is supported by CNPq (303170/2017-4) and FAPERJ (26/202.903/20).

Author Contributions

MNG, CR, GL, JBC, MT, LMSR and AG performed the experiments; GCF, OB, MNG, CR, GL, JBC, MT, LMSR, AG, IR, DAMC, WS and ATRV performed analysis; IR, DAMC, GCF, MCB, GBB, VM, VCA, WS and ATRV wrote and/or revised the manuscript; IR, DAMC, WS, ATRV conceived the presented idea; IR, DAMC, VCA, WS, ATRV supervised the findings of this work. All authors discussed the results and contributed to the final manuscript.

Declaration of Interests

The authors declare no conflict of interests.

8.6 Figure titles and legends

Figure 1. Human cultured myoblasts (but not myotubes) can be infected by Zika virus and generate intracellular viral particles. (a) The LHCN-M2 myoblast cell line was infected with ZIKV (MOI = 0.1), and the percentage of 4G2⁺ cells was detected 24-, 48- and 72-hours post-infection by flow cytometry. Each time point is represented by mean ± standard error (n=3). (b) Representative microscopic fields of mock *versus* ZIKV myoblast cultures immunostained with the 4G2 anti-flavivirus antibody at 72 hours post-infection, showing immunostainings for 4G2 (in red), and DAPI (nuclei, in blue). Panel c depicts LHCN-M2 cells differentiated into myotubes (herein revealed by the myosin heavy chain -- MyHC -- expression, shown in green (with nuclei stained in blue with DAPI). We could not detect ZIKV proteins with the 4G2 antibody (in red) (n=3) in these cultures.

Figure 2. *In vitro* human myoblast differentiation into myotubes induces multiple alterations in gene expression. (a) Dot plot illustrating the GO biological process annotations upregulated in myotubes over myoblasts reflecting myoblast differentiation. (b) Circos plot representing the total numbers of genes upregulated in myotubes over myoblasts, and the 10 most highly upregulated genes among 5 selected GO biological processes. (c) Dot plot illustrating the GO biological process annotations downregulated in myotubes over myoblasts. (d) Circos plot representing the total numbers of genes downregulated in myotubes over myoblasts, and the 10 most highly downregulated genes among 5 selected GO biological processes. The whole list of differentially expressed genes between myotubes and myoblasts can be seen in supplemental table 1.

Figure 3. *In vitro* Zika virus infection of human myoblasts and myotubes upregulates gene expression related to cytokine production and signaling, as well as cell adhesion, cell migration and cell death. (a) Dot plot illustrating the GO biological process annotations upregulated in myoblasts infected with ZIKV. (b) Circos plot representing the total numbers of genes upregulated in ZIKV-infected myoblasts,

and the 10 most highly upregulated genes among 5 selected GO biological processes. (c) Dot plot illustrating the GO biological process annotations upregulated in ZIKV-infected myotubes. (d) Circos plot representing the total number of genes upregulated in ZIKV-infected myotubes, and the 10 most highly upregulated genes among 5 selected GO biological processes. The whole list of differentially expressed genes can be seen in supplemental table 1.

Figure 4. Myoblasts infected with ZIKV and myotubes in contact with ZIKV enhance gene expression related to response to viral infection, as well as innate and adaptive immune responses. (a) PCR analysis of positive and negative ZIKV RNA strands in myoblasts (expressing both positive and negative RNA strands), and myotubes (expressing only the positive strand). Gene ontology biological process annotations related to response to viral infection, and innate and adaptive immune responses upregulated in myoblasts (b) and myotubes (c) infected with ZIKV. Circos plot showing the 10 most upregulated genes within each of the 5 selected pathways related to the intrinsic antiviral response (interferon-beta production, response to virus and type I interferon signaling pathway), and innate and adaptive immune responses after ZIKV infection in human myoblasts (d) and myotubes (e). (f) Heatmap of differentially expressed antiviral genes in mock or ZIKV-infected myoblasts and myotubes. The whole list of differentially expressed genes can be seen in supplementary table 1.

Figure 5. Modulation of miRNAs following *in vitro* ZIKV infection in human myoblasts. (a) Network formed by upregulated miRNAs (red ellipses) and their respective targets downregulated (blue rectangles) in ZIKV-infected myoblasts. (b) Network formed by downregulated miRNAs (blue ellipses) and their respective targets downregulated (red rectangles) in ZIKV-infected myoblasts. The whole list of differentially expressed miRNAs can be seen in supplementary table 2.

Figure 6. Modulation of miRNAs following *in vitro* ZIKV infection in human myotubes. (a) Network

formed by upregulated miRNAs (red ellipses) and their respective targets downregulated (blue rectangles) in myotubes exposed to ZIKV. **(b)** Network formed by downregulated miRNAs (blue ellipses) and their respective targets downregulated (red rectangles) in myotubes exposed to ZIKV. The whole list of differentially expressed miRNAs can be seen in supplementary table 2.

Figure 7. Genes upregulated following *in vitro* ZIKV infection in human myotubes and their role in antiviral responses. Cellular antiviral genes affecting different steps of virus replication were upregulated after ZIKV infection in myotubes, but not in myoblasts (genes in black), or that were highly upregulated in myotubes (genes in green) when compared to myoblasts following ZIKV exposure. The ISG15, TRIM5, TRIM21, TRIM22, TRIM26 and TRIM56 genes are involved in the inhibition of virus uncoating and disassembly; ADAR, APOBEC3B, APOBEC3F, APOBEC3G, OAS3, MOV10, SAMHD1 and STING are related to the inhibition of viral replication; EIF2AK2, DDX60 and STING are inhibitors of translation and assembly of viral proteins; BST2 inhibits the release of new viral particles. IFIH1/MDA5 and DDX58/RIG1 recognize viral double-stranded (ds) RNA and transcriptionally induce type 1 IFN, which is subsequently secreted; activation of JAK2, IRFs, and STATs 1 and 2 leads to the expression of interferon-stimulated genes (ISGs), which have different antiviral effects.

Tables with titles and legends

Table 1. Summary of the differentially Expressed Genes and miRNAs identified by RNAseq and small RNAseq in human myoblasts and myotubes, infected or not by ZIKV

| RNA type | Expressed Genes | Upregulated* | Downregulated* | DEGs* |
|--|-----------------|--------------|----------------|-------|
| Normal myotubes over normal myoblasts | | | | |
| Protein Coding | 16332 | 1524 | 2193 | 3717 |
| Long Non-Coding RNAs** | 6327 | 427 | 106 | 533 |
| other RNA Classes*** | 8081 | 249 | 65 | 314 |
| Total genes | 30740 | 2200 | 2364 | 4564 |
| miRNAs | 1522 | 96 | 80 | 176 |
| ZIKV-infected myoblasts over normal myoblasts | | | | |
| Protein Coding | 16808 | 434 | 178 | 612 |
| Long Non-Coding RNAs** | 6668 | 42 | 13 | 55 |
| other RNA Classes*** | 8476 | 31 | 15 | 46 |
| Total genes | 32222 | 507 | 206 | 713 |
| miRNAs | 1531 | 13 | 19 | 32 |
| ZIKV-induced myotubes over normal myotubes | | | | |
| Protein Coding | 16430 | 1260 | 417 | 1677 |
| Long Non-Coding RNAs** | 6496 | 77 | 112 | 189 |
| other RNA Classes*** | 8130 | 53 | 58 | 111 |
| Total genes | 31056 | 1390 | 587 | 1977 |
| miRNAs | 1574 | 6 | 4 | 10 |

*Statistical significance of DESeq2 with adjusted p-value < 0.05 and Log2 Fold Change > |1.0|;

**Antisense, lincRNA and bidirectional promoter lncRNA were included in this category;

*** all other RNA classes not included in the above-mentioned categories.

8.7 Methods

Human skeletal muscle cell cultures

The human LHCN-M2 myoblast cell line was immortalized from satellite cells derived from the pectoralis major muscle of a 41-year-old Caucasian male donor, by transduction with retroviral vectors containing the cdk-4 and hTERT genes (19). We confirmed myogenicity of the LHCN-M2 myoblasts by the expression of desmin or CD56 ascertained by immunohistochemistry or flow cytometry, respectively. Cultured cells were at least 96% myogenic (see supplemental figure 1).

Cells were maintained in growth medium composed of DMEM plus medium 199, supplemented with 50µg/ml gentamicin and 20% fetal calf serum (FCS), 25 µg/ml fetuin, 0.5 ng/ml, basic Fibroblast Growth Factor, 5 ng/ml Epidermal Growth Factor and 0.2 µg/ml dexamethasone. The cells were incubated at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere. Differentiation into myotubes was induced at confluence when the culture medium was switched to DMEM without serum. After 3 days of differentiation, myotubes were challenged to ZIKV infection.

Zika virus infection

The ZIKV strain used in this study was the RIO-U1, originally isolated in 2016 from the urine of a patient from Rio de Janeiro, Brazil (GenBank Accession number: KU926309). Viral stocks of ZIKV RIO-U1 were prepared by infecting Vero cell monolayers. The genome integrity and the infection titer (PFU/ml) were determined as described elsewhere (67).

LHCN-M2 cells in proliferation (named thereafter as myoblasts) and differentiated (the corresponding myotubes) were infected with a 0.1 multiplicity of infection (MOI) of ZIKV diluted in the proliferation medium (DMEM + 199 medium + 5% FBS) or differentiation medium (DMEM + 5% FBS) respectively, during 2 h. After incubation, culture media were changed, and LHCN-M2 cells were cultured in proliferation or differentiation media for further 72 hours. Controls (MOCK group) corresponded to myoblasts or myotubes under the same culture conditions, but without ZIKV.

Flow cytometry

Intracellular staining of viral protein was performed with True-Nuclear™ transcription factor buffer set (Biolegend, San Diego, USA) as described elsewhere (7). Briefly, LHCN-M2 cells were incubated with purified anti-4G2 antibody for 1 h at 4 °C followed by incubation with fluorescent secondary antibodies for 30 min at 4 °C, being then analyzed using a FACS Canto II (BD) flow cytometer, applying the FACS Diva analysis software.

Immunohistochemistry

LHCN-M2 cells were seeded in 8 well Lab-Tek® Chamber Slide™ System, in a concentration of 10^3 cells/well for proliferation or 10^5 cells/well for differentiation conditions; being then infected as described above. After infection, the slides were washed twice with PBS and fixed with 4% paraformaldehyde for 15 min. Slides were treated with permeabilization buffer (0.1% saponin and 1% BSA – bovine albumin serum) for 15 min at 37 °C. After that, samples were incubated for 40 min with a blocking solution (2% normal goat serum, 1% FCS, 1% BSA, 0.3% X-100 triton) and submitted to staining with primary antibody for 1 h and with the corresponding secondary antibody for 30 min. After staining, the slides were washed twice with a permeabilization buffer, stained with DAPI for 10 min, washed and mounted with the Dako Fluorescent Mounting Medium (Agilent, Santa Clara, USA). Negative controls, in which the secondary antibody was used alone, did not generate any significant labeling. The percentage of infection was ascertained by counting the numbers of 4G2⁺ cells, divided by the total number of cells per microscopic field. We analyzed 5 fields from 3 independent experiments and each experiment was performed in triplicate. We confirmed the myogenicity of the LHCN-M2 human myoblasts by monitoring the expression of desmin or CD56. For that, cells were fixed using absolute cold ethanol and washed with PBS. Slides were treated with a blocking solution (2% FBS) for 20 min at room temperature. Primary antibodies were incubated for 1 hour in the same

conditions and revealed using fluorescent-labeled secondary antibodies. Immunostained samples were analyzed using the AxioImager A2 device with the AxioVision Rel 4.8 software (Zeiss, Oberkochen, Germany) or with the Leica TSC SP8 Confocal device with LAS-X Software (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

RNA extraction

LHNC-M2 (10^6) cells were seeded in 150 cm² Petri Plates and 24 h later infected as described previously. Seventy-two hours post-infection, RNA extraction was performed with MOCK and ZIKV-infected myoblasts, using the RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions for mRNA and small RNA extraction. Total RNA concentration and purity were determined by Nanodrop spectrophotometer. RNA integrity was verified through Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent).

Transcriptome and small RNA library preparation and sequencing.

From total RNA, 1 ug was used to prepare 12 small RNA libraries with the TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina, USA). The protocol was followed as described by the manufacturer, except for the cDNA construction purification step, which was carried out using 3% Agarose Gel Cassette for targets between 100 bp - 250 bp in a BluePippin system (Sage Science, USA). Five hundred ng from the same total RNAs were used to prepare 12 transcriptome libraries with the TruSeq Stranded Total RNA Sample Preparation Kit with Ribo-Zero Gold (Illumina). To check library sizes, we applied the 2100 Bioanalyzer System with the Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent). Libraries were quantified by qPCR using a KAPA Library Quantification Kit for Illumina platforms (KAPA Biosystems, USA). Sequencing was performed on a NextSeq 500 System (Illumina). For the small RNA libraries, we used a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (75 cycles) and 1x50 bp single-end reads were obtained. For the

transcriptome libraries, we used a NextSeq 500/550 High Output v2 kit (150 cycles) and 2x75 bp paired-end reads were obtained.

Transcriptome analysis.

The quality of the 12 transcriptome and 12 small RNA libraries were checked by FASTQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) and the trimming were done using Trimmomatic(68). After trimming reads from 16 to 28 nucleotides were kept for posterior analyses in the small RNA libraries and only reads with at least 35 nucleotides were kept in the transcriptome libraries. The STAR tool (69), version 2.6, was applied to map the transcriptome libraries on the Human genome (GRCH38.p12) from ENSEMBL databank (<http://www.ensembl.org/info/data/ftp/index.html>) using the default parameters. The small RNA libraries were mapped on the microRNA precursors from humans (Release 22 of miRBase) (<http://www.mirbase.org>) with the Bowtie2 tool(70), version 2.2.1, using the “--very-sensitive-local” and the “--norc” parameters.

The DESeq2 package(71) from R was used for differential gene expression analysis using three biological replicates. Only the protein-coding, long non-coding, and microRNAs with adjusted p-value < 0.01 and Log2 Fold Change > |1.0| were considered for downstream analyses.

The experimentally validated microRNA-target interactions from miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/index.php>) were used to search for target mRNAs. Only the validated target mRNAs with inverted expression patterns from their miRNAs were considered for further analysis.

Enrichment analysis of DEGs.

The Gene Ontology (GO) was used for the enrichment of biological processes (72). The analysis of the transcriptome was performed by the R package GOSTATS and the analysis of the miRNA targets was performed by R package ClusterProfiler(73). The Benjamini & Hochberg (BH) adjusted p-value method was applied for the enrichment with a cutoff of 0.01. The R package ReactomePA (74) was used for the enrichment of the pathways with an adjusted p-value cutoff of 0.1.

RT-qPCR for intracellular ZIKV detection

Intracellular RNA was analyzed by a one-step RT-qPCR for viral negative strand or total viral RNA with ZIKV specific primers. First, total viral RNA was harvested using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen), according to manufacturer instructions, then RT-qPCR was performed using GoTaq[®] Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega) and primers and probes specific for Zika virus envelope gene (75). To capture RNA negative strand only forward primer was used, as previous describes (76,77). Cycle threshold data were analyzed and plotted using the R program.

Data and materials availability: The dataset used in our study is publicly available in SRA-NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra), SRA accession PRJNA662490. The RNA-seq data are available in the following websites: http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika/ for gene expression and http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika_mirna/ for miRNA expression data.

8.8 Supplemental Information titles and legends

Supplemental Figure 1. Immunophenotypic characterization of the human LHCN-M2 myoblast cell line. Panel (a) depicts flow cytometry histograms for the expression of CD56 (green plot), as compared with an unrelated isotype matched immunoglobulin (blue plot). In panel (b), adhered cells were immunolabeled for the presence of desmin (in green), thus confirming the myogenicity. Cell nuclei are labeled in blue by DAPI. The bars indicate magnification.

Supplemental Figure 2. Volcano-plot of gene expression profiles, comparing myotubes over myoblasts, in the absence of Zika virus. The red dots represent the genes that are over the cutoff of Log_2 Fold Change $> [1.0]$ and adjusted p-value < 0.05 .

Supplemental Figure 3. Differentially expressed miRNA-targets during myoblast differentiation. Cnetplot representing validated miRNA targets that present the inverse expression pattern from the miRNAs in myotubes compared to myoblasts. Grey circles indicate the GO terms (Biological processes) and their size represents the number of genes for each term. Colored dots represent the Log_2 Fold Changes. Purplier colors indicate the most upregulated genes and greener colors indicate the most downregulated genes.

Supplemental Figure 4. Venn diagram showing the shared and specific genes from both Mock and ZIKV-infected myoblasts and myotubes separated by expression pattern. Only genes with adjusted p-value < 0.05 and Log_2 Fold Change $> [1.0]$ are presented in this diagram. The total number of genes from each group are shown in parentheses. Genes can be identified at http://biotools.labinfo.incc.br/muscle_zika.

Supplemental Figure 5. Volcano-plot of gene expression profile, comparing uninfected (Mock) versus ZIKV-treated myoblasts and myotubes. The red dots represent the genes that are over the cutoff of Log₂ Fold Change > [1.0] and adjusted p-value < 0.05.

Supplemental Figure 6. Reactome biological process annotations related to response to viral infection, innate and adaptive immune responses differentially expressed in muscle cells after ZIKV infection. Graphs show biological processes upregulated in human myoblasts (a) and myotubes (b) following ZIKV infection.

Supplemental Figure 7. Selected gene ontology biological process annotations differentially expressed in muscle cells after ZIKV infection. Graphs show immune response related biological processes in human myoblasts (a) and myotubes (b) following ZIKV infection.

8.9 References

1. Didier Musso DJG. Zika virus. *JAMA Dermatology*. 2016;152(6):693.
2. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo T V., et al. Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med*. 2017;14(1):1–27.
3. De Barros Miranda-Filho D, Martelli CMT, De Alencar Ximenes RA, Araújo TVB, Rocha MAW, Ramos RCF, et al. Initial description of the presumed congenital Zika syndrome. *Am J Public Health*. 2016;106(4):598–600.
4. Chan JFW, Yip CCY, Tsang JOL, Tee KM, Cai JP, Chik KKH, et al. Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. *Emerg Microbes Infect*. 2016;5(July):e93.

5. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015;89(17):8880–96.
6. Messias C V., Lemos JP, Cunha DP, Vasconcelos Z, Raphael LMS, Bonaldo MC, et al. Zika virus infects human blood mononuclear cells. *BMC Infect Dis*. 2019 Nov 21;19(1).
7. Messias C V., Loss-Morais G, Carvalho JB de, González MN, Cunha DP, Vasconcelos Z, et al. Zika virus targets the human thymic epithelium. *Sci Rep*. 2020 Dec 1;10(1).
8. Tabata T, Pettitt M, Puerta-Guardo H, Michlmayr D, Harris E, Pereira L. Zika Virus Replicates in Proliferating Cells in Explants from First-Trimester Human Placentas, Potential Sites for Dissemination of Infection. *J Infect Dis*. 2018;217(8):1202–13.
9. Sara Salinas et al. 2018. Zika Virus Efficiently Replicates in Human Retinal Epithelium and Disturbs Its Permeability. 2017;1–4.
10. Legrosid V, Jeannin P, Burlaud-Gaillard J, Chaze T, Gianetto QG, Butler-Browne G, et al. Differentiation-dependent susceptibility of human muscle cells to zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(8):1–23.
11. Pereira HVFS, dos Santos SP, Amâncio APRL, de Oliveira-Szejnfeld PS, Flor EO, de Sales Tavares J, et al. Neurological outcomes of congenital Zika syndrome in toddlers and preschoolers: a case series. *Lancet Child Adolesc Heal*. 2020;4(5):378–87.
12. del Campo M, Feitosa IML, Ribeiro EM, Horovitz DDG, Pessoa ALS, França GVA, et al. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet Part A*. 2017;173(4):841–57.
13. Mintz B, Baker WW. Normal mammalian muscle differentiation and gene control of isocitrate dehydrogenase synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1967;58(2):592–8.
14. B. Katz F. P H I L O S O P H I C A L T R A N S A C T I O N S T H E T E R M I N A T I O N S O F T H E A F F E R E N T N E R V E F I B R E T H E T E R M I N A T I O N S O F T H E A F F E R E N T N E R V E F I B R E. 1961;(703).

15. MAURO A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol.* 1961;9:493–5.
16. Zammit PS. All muscle satellite cells are equal, but are some more equal than others? *J Cell Sci.* 2008;121(18):2975–82.
17. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell.* 2005;122(2):289–301.
18. Ozden S, Huerre M, Riviere JP, Coffey LL, Afonso P V., Mouly V, et al. Human Muscle Satellite Cells as Targets of Chikungunya Virus Infection. *PLoS One.* 2007;2(6).
19. Zhu CH, Mouly V, Cooper RN, Mamchaoui K, Bigot A, Shay JW, et al. Cellular senescence in human myoblasts is overcome by human telomerase reverse transcriptase and cyclin-dependent kinase 4: Consequences in aging muscle and therapeutic strategies for muscular dystrophies. *Aging Cell.* 2007;6(4):515–23.
20. Wu J, Yue B, Lan X, Wang Y, Fang X, Ma Y, et al. MiR-499 regulates myoblast proliferation and differentiation by targeting transforming growth factor β receptor 1. *J Cell Physiol.* 2019;234(3):2523–36.
21. Ozato K, Shin DM, Chang TH, Morse HC. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(11):849–60.
22. Salter JD, Bennett RP, Smith HC. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function. *Trends Biochem Sci.* 2016;41(7):578–94.
23. Ahn J, Barber GN. STING signaling and host defense against microbial infection. *Exp Mol Med.* 2019;51(12).
24. Chemudupati M, Kenney AD, Bonifati S, Zani A, McMichael TM, Wu L, et al. From APOBEC to ZAP: Diverse mechanisms used by cellular restriction factors to inhibit virus infections. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2019;1866(3):382–94.

25. Pujantell M, Riveira-Muñoz E, Badia R, Castellví M, Garcia-Vidal E, Sirera G, et al. RNA editing by ADAR1 regulates innate and antiviral immune functions in primary macrophages. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–14.
26. Miyashita M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T. DDX60, a DEXD/H Box Helicase, Is a Novel Antiviral Factor Promoting RIG-I-Like Receptor-Mediated Signaling. *Mol Cell Biol.* 2011;31(18):3802–19.
27. Kang J II, Kwon SN, Park SH, Kim YK, Choi SY, Kim JP, et al. PKR protein kinase is activated by hepatitis C virus and inhibits viral replication through translational control. *Virus Res.* 2009;142(1–2):51–6.
28. Benichou S, Bracq L, Rehwinkel J, Prado JG, Colomer-Lluch M, Ruiz A, et al. Restriction Factors: From Intrinsic Viral Restriction to Shaping Cellular Immunity Against HIV-1. *Front Immunol* | www.frontiersin.org. 2018;9:2876.
29. Matsumiya T, Stafforini DM. Function and regulation of retinoic acid-inducible gene-I. *Crit Rev Immunol.* 2010;30(6):489–513.
30. Li SF, Gong MJ, Zhao FR, Shao JJ, Xie YL, Zhang YG, et al. Type I interferons: Distinct biological activities and current applications for viral infection. *Cell Physiol Biochem.* 2018;51(5):2377–96.
31. Costa ML. Cytoskeleton and Adhesion in Myogenesis. *ISRN Dev Biol.* 2014;2014:1–15.
32. Xiaofan Li, Zhao Wang, Huili Tong, Yunqin Yan SL. Effects of COL8A1 on the proliferation of muscle-derived satellite cells†. *Arch Anesthesiol Crit Care.* 2018;4(4):527–34.
33. Liao H, Winkfein RJ, Mack G, Rattner JB, Yen TJ. CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol.* 1995;130(3):507–18.
34. Supp DM, Hahn JM, McFarland KL, Glaser K. Inhibition of hyaluronan synthase 2 reduces the

- abnormal migration rate of keloid keratinocytes. *J Burn Care Res.* 2014;35(1):84–92.
35. Bartels M, Akgul Y. Hyaluronan Synthase 2 Knock Down in Epidermis Alter Wound Healing and Hair Follicle Development Inhibition of Scleraxis Signaling Provides a Target to Reduce Mesenchymal Cell Inflammation During Wound Healing. 2017;2017.
 36. Kujawa MJ, Pechak DG, Fiszman MY, Caplan AI. Hyaluronic acid bonded to cell culture surfaces inhibits the program of myogenesis. *Dev Biol.* 1986;113(1):10–6.
 37. Yoshimura M. Change of hyaluronic acid synthesis during differentiation of myogenic cells and its relation to transformation of myoblasts by Rous sarcoma virus. *Cell Differ.* 1985;16(3):175–85.
 38. Niotis A, Tsiambas E, Fotiades PP, Ragos V, Polymeneas G. Ki-67 and Topoisomerase IIa proliferation markers in colon adenocarcinoma. *J BUON.* 2018;23(Suppl 1):24–7.
 39. Benezra R, Davis RL, Lockshon D, Turner DL, Weintraub H. The protein Id: A negative regulator of helix-loop-helix DNA binding proteins. *Cell.* 1990;61(1):49–59.
 40. Kaspar P, Pajer P, Sedlak D, Tamaoki T, Dvorak M. c-Myb inhibits myogenic differentiation through repression of MyoD. *Exp Cell Res.* 2005;309(2):419–28.
 41. Mohan A, Asakura A. CDK inhibitors for muscle stem cell differentiation and self-renewal. *J Phys Fit Sport Med.* 2017;6(2):65–74.
 42. Ha K, Buchan JG, Alvarado DM, Mccall K, Vydyanath A, Luther PK, et al. MYBPC1 mutations impair skeletal muscle function in zebrafish models of arthrogryposis. *Hum Mol Genet.* 2013;22(24):4967–77.
 43. Laing NG, Dye DE, Wallgren-Pettersson C, Richard G, Monnier N, Lillis S, et al. Mutations and polymorphisms of the skeletal muscle α -actin gene (ACTA1). *Hum Mutat.* 2009;30(9):1267–77.
 44. Schiaffino S, Rossi AC, Smerdu V, Leinwand LA, Reggiani C. Developmental myosins: Expression patterns and functional significance. *Skelet Muscle.* 2015;5(1):1–14.

45. Arvanitis DA, Vafiadaki E, Papalouka V, Sanoudou D. Muscle Lim Protein and myosin binding protein C form a complex regulating muscle differentiation. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res.* 2017;1864(12):2308–21.
46. Mullen AJ, Barton PJR. Structural characterization of the human fast skeletal muscle troponin I gene (TNNI2). *Gene.* 2000;242(1–2):313–20.
47. Ordway GA, Garry DJ. Myoglobin: An essential hemoprotein in striated muscle. *J Exp Biol.* 2004;207(20):3441–6.
48. Gokhin DS, Ochala J, Domenighetti AA, Fowler VM. Tropomodulin 1 directly controls thin filament length in both wild-type and tropomodulin 4-deficient skeletal muscle. *Dev.* 2015;142(24):4351–62.
49. Odermatt A, Barton K, Khanna VK, Mathieu J, Escolar D, Kuntzer T, et al. The mutation of Pro789 to Leu reduces the activity of the fast-twitch skeletal muscle sarco(endo)plasmic reticulum Ca²⁺ ATPase (SERCA1) and is associated with Brody disease. *Hum Genet.* 2000;106(5):482–91.
50. Liu XL, Huang XJ, Luan XH, Zhou HY, Wang T, Wang JY, et al. Mutations of SCN4A gene cause different diseases: 2 case reports and literature review. *Channels.* 2015;9(2):82–7.
51. Doynova MD, Markworth JF, Cameron-Smith D, Vickers MH, O’Sullivan JM. Linkages between changes in the 3D organization of the genome and transcription during myotube differentiation in vitro. *Skelet Muscle.* 2017;7(1):1–14.
52. Biacchesi S, Jouvion G, Mérour E, Boukadiri A, Desdouits M, Ozden S, et al. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle satellite cells are targets of salmonid alphavirus infection. *Vet Res.* 2016;47(1):1–10.
53. Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, et al. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010;29(3):238–42.

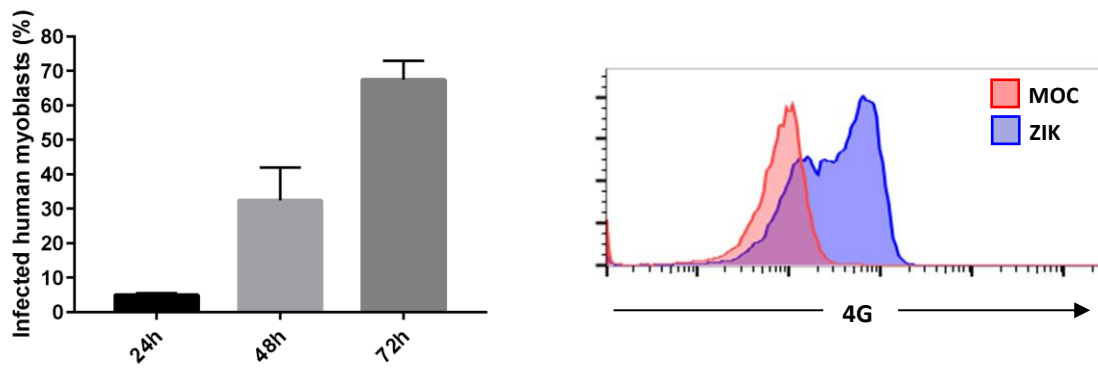
54. Sane J, Kurkela S, Desdouits M, Kalimo H, Mazalrey S, Lokki ML, et al. Prolonged myalgia in chikungunya virus infection: Case description and in vitro infection of myotubes and myoblasts. *J Infect Dis.* 2012;206(3):407–14.
55. Desdouits M, Munier S, Prevost MC, Jeannin P, Butler-Browne G, Ozden S, et al. Productive infection of human skeletal muscle cells by pandemic and seasonal influenza A(H1N1) viruses. *PLoS One.* 2013;8(11):1–15.
56. O’Neill LAJ, Bowie AG. Sensing and Signaling in Antiviral Innate Immunity. *Curr Biol.* 2010;20(7):R328–33.
57. He Z, Chen J, Zhu X, An S, Dong X, Yu J, et al. NLRP3 Inflammasome Activation Mediates Zika Virus-Associated Inflammation. *J Infect Dis.* 2018;217(12):1942–51.
58. Chen W, Foo SS, Zaid A, Teng TS, Herrero LJ, Wolf S, et al. Specific inhibition of NLRP3 in chikungunya disease reveals a role for inflammasomes in alphavirus-induced inflammation. *Nat Microbiol.* 2017;2(10):1435–45.
59. Shrivastava G, Valenzuela Leon PC, Calvo E. Inflammasome Fuels Dengue Severity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10(September):1–13.
60. Harris RS, Dudley JP. APOBECs and virus restriction. Vols. 479–480, *Virology*. Academic Press Inc.; 2015. p. 131–45.
61. Kim G, Kim JH. Impact of skeletal muscle mass on metabolic health. *Endocrinol Metab.* 2020;35(1):1–6.
62. Pedersen L, Hojman P. Muscle-to-organ cross talk mediated by myokines. *Adipocyte.* 2012;1(3):164–7.
63. Franckhauser S, Elias I, Rotter Sopasakis V, Ferré T, Nagaev I, Andersson CX, et al. Overexpression of IL6 leads to hyperinsulinaemia, liver inflammation and reduced body weight in mice. *Diabetologia.* 2008;51(7):1306–16.

64. Hou W, Jin Y-H, Kang HS, Kim BS. Interleukin-6 (IL-6) and IL-17 Synergistically Promote Viral Persistence by Inhibiting Cellular Apoptosis and Cytotoxic T Cell Function. *J Virol*. 2014;88(15):8479–89.
65. Trobaugh DW, Klimstra WB. MicroRNA Regulation of RNA Virus Replication and Pathogenesis. *Trends Mol Med*. 2017;23(1):80–93.
66. Akhtar LN, Benveniste EN. Viral Exploitation of Host SOCS Protein Functions. *J Virol*. 2011;85(5):1912–21.
67. Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, dos Santos AAC, Menezes LSR, da Cruz SOD, et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(6):1–17.
68. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30(15):2114–20.
69. Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, et al. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15–21.
70. Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9(4):357–9.
71. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014;15(12):1–21.
72. Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Gene Expr*. 2000;25(may):25–9.
73. Falcon S, Gentleman R. Using GOSTats to test gene lists for GO term association. *Bioinformatics*. 2007;23(2):257–8.
74. Yu G, He and Q-Y. ReactomePA: an R/Bioconductor package for reactome pathway analysis and visualization. *AIChE Annu Meet Conf Proc*. 2013;

75. Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14(8):1232–9.
76. Biava M, Caglioti C, Castilletti C, Bordi L, Carletti F, Colavita F, et al. Persistence of ZIKV-RNA in the cellular fraction of semen is accompanied by a surrogate-marker of viral replication. Diagnostic implications for sexual transmission. *New Microbiol.* 2018 Jan;41(1):30–3.
77. Vaughan G, Olivera H, Santos-Argumedo L, Landa A, Briseño B, Escobar-Gutiérrez A. Dengue virus replicative intermediate RNA detection by reverse transcription PCR. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9(1):198–200.

Figure 1a-b

a



b

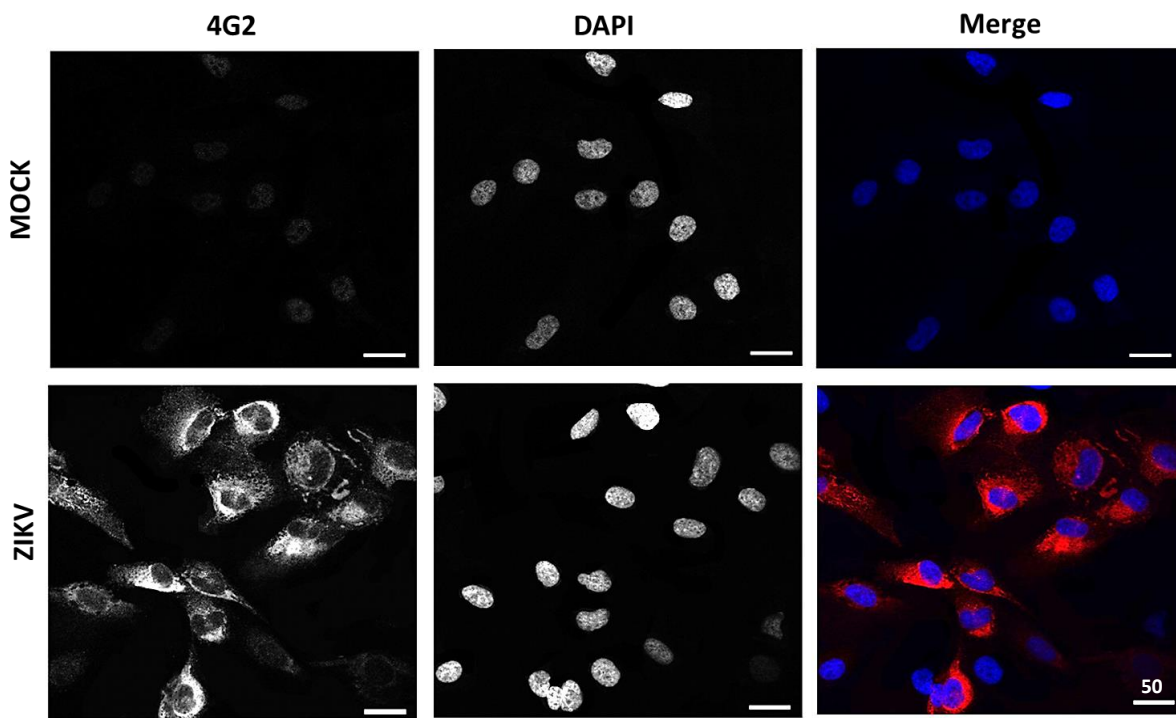


Figure 1c

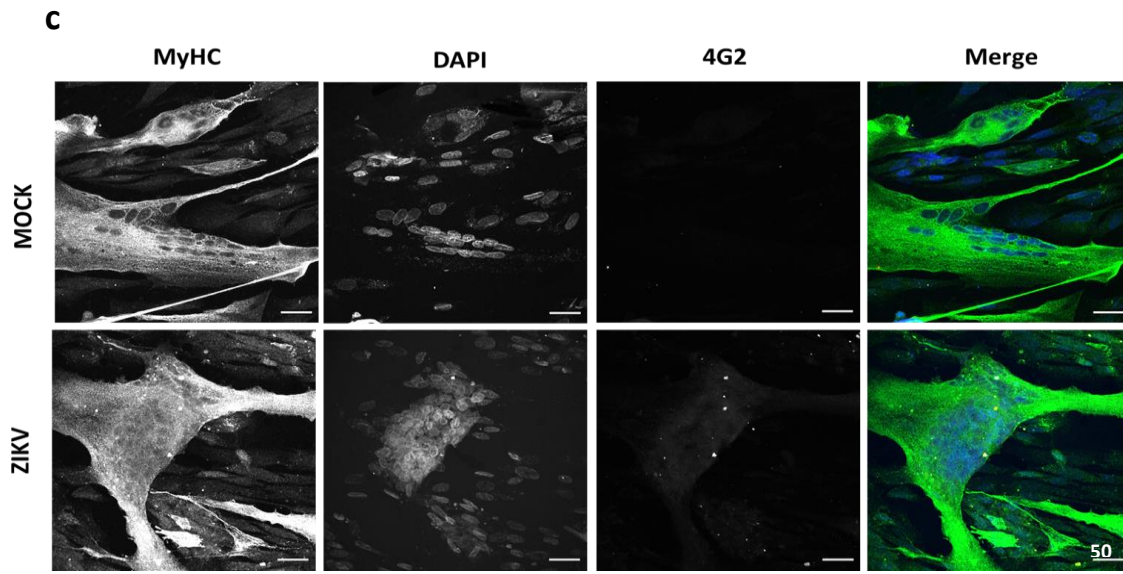
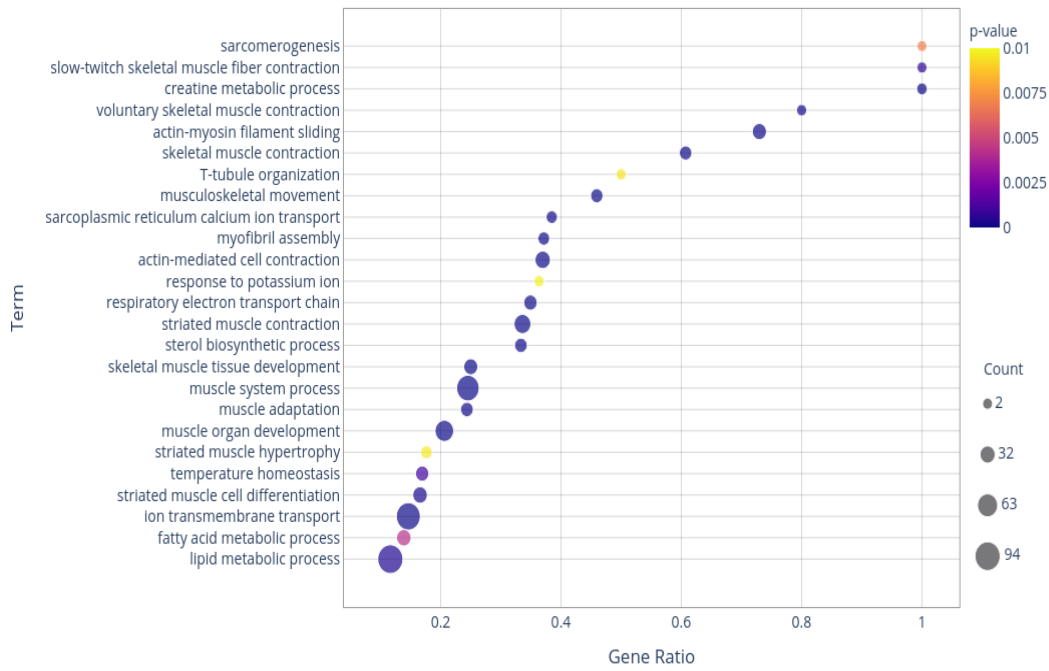


Figure 2 a-b

a



b

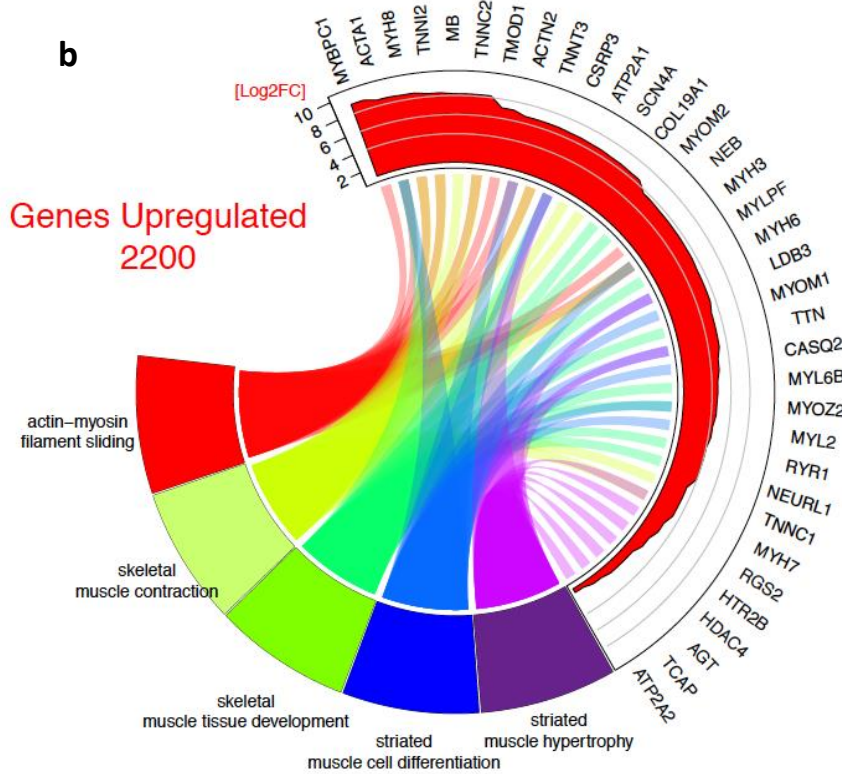
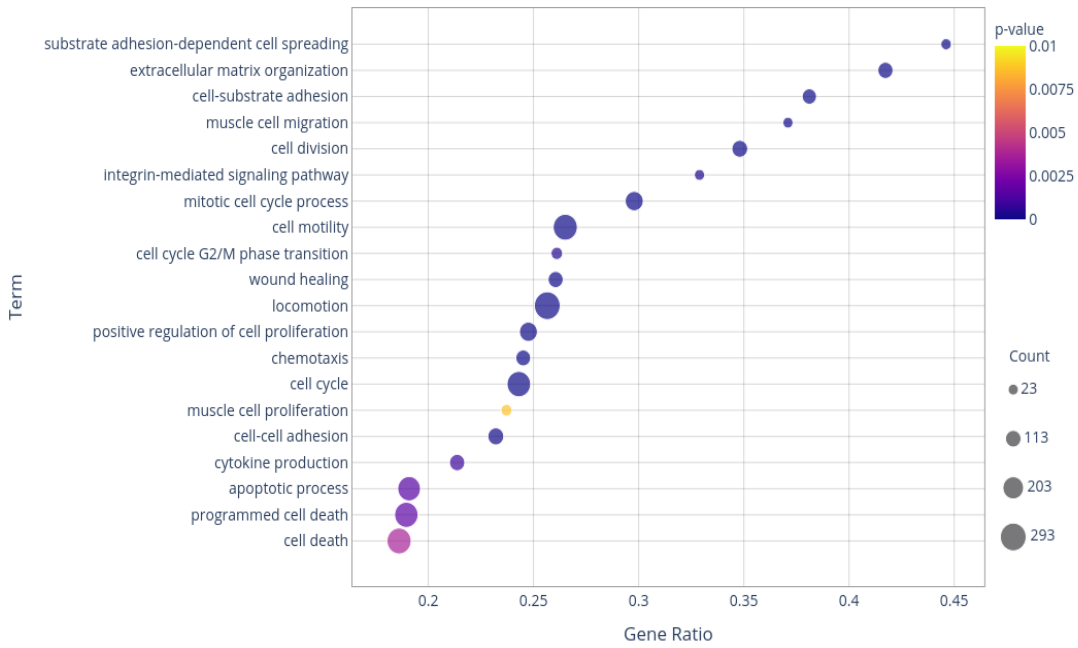


Figure 2 c-d

c



d

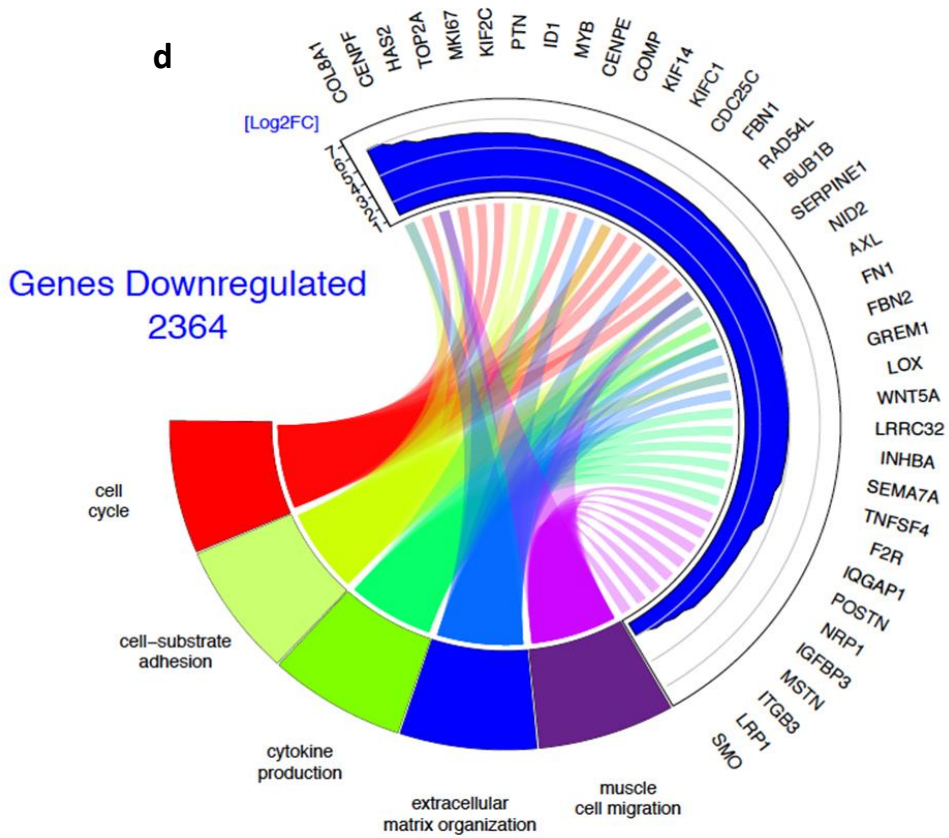
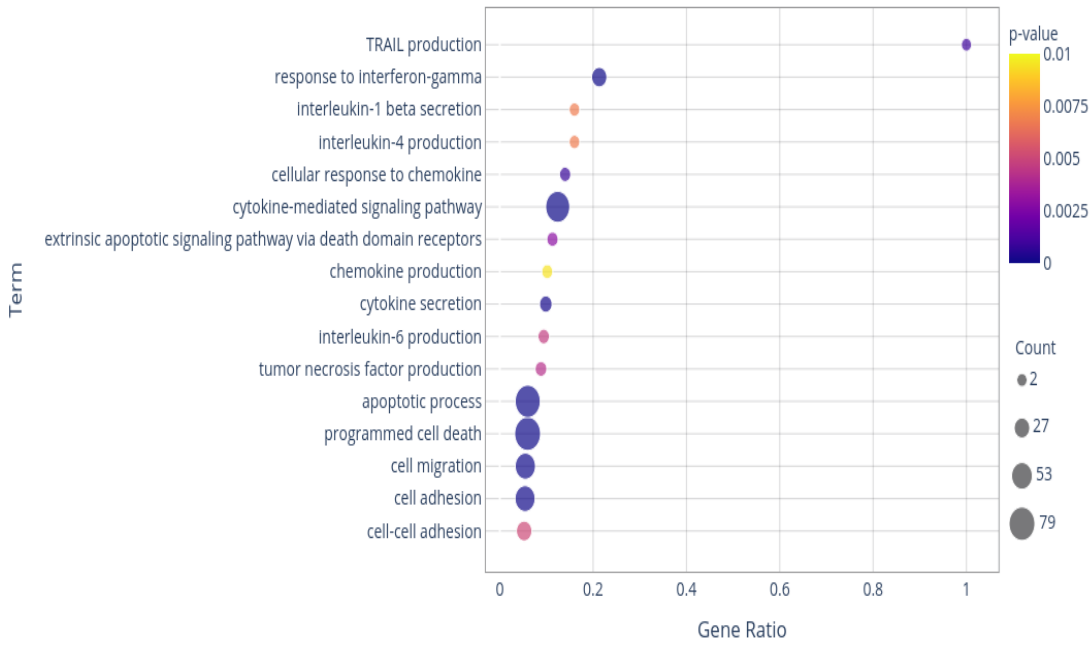


Figure 3 a-b

a



b

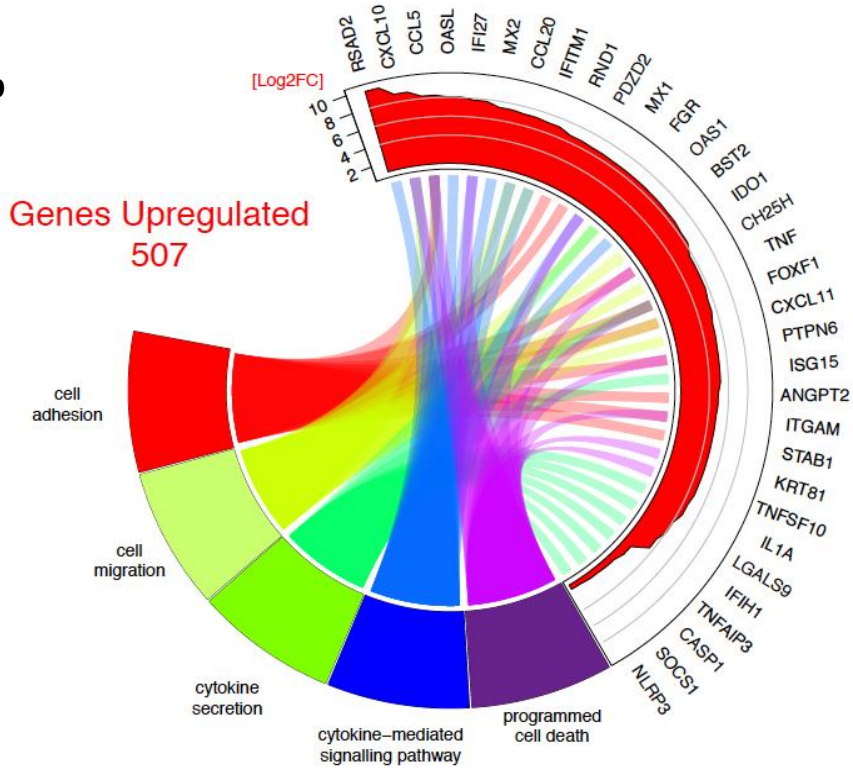
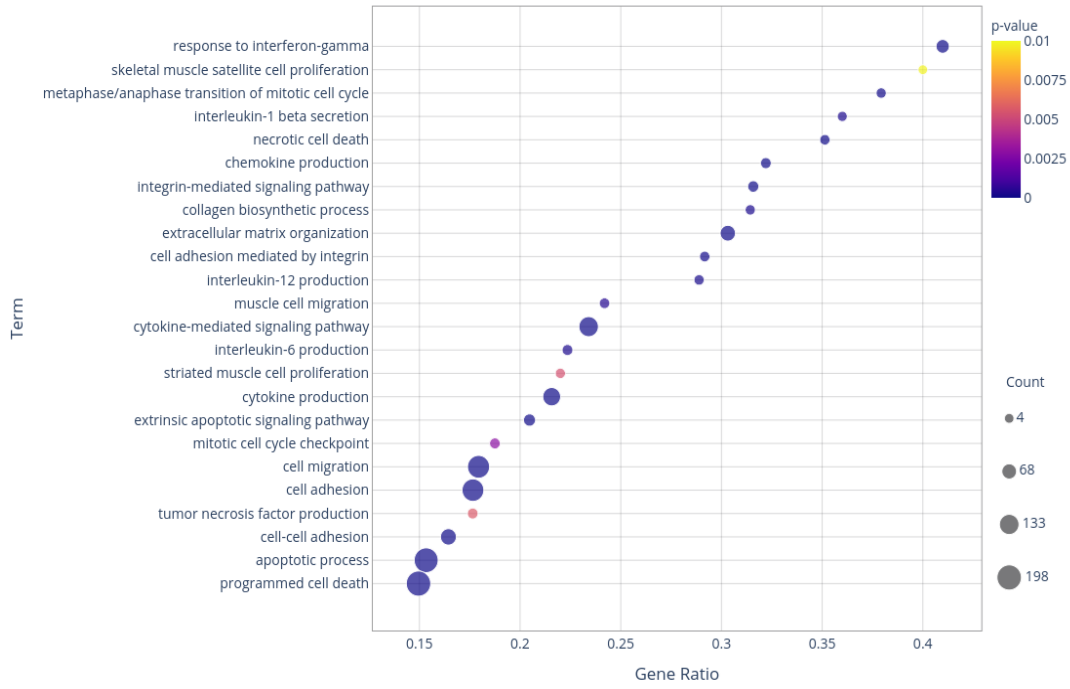


Figure 3 c-d

c



d

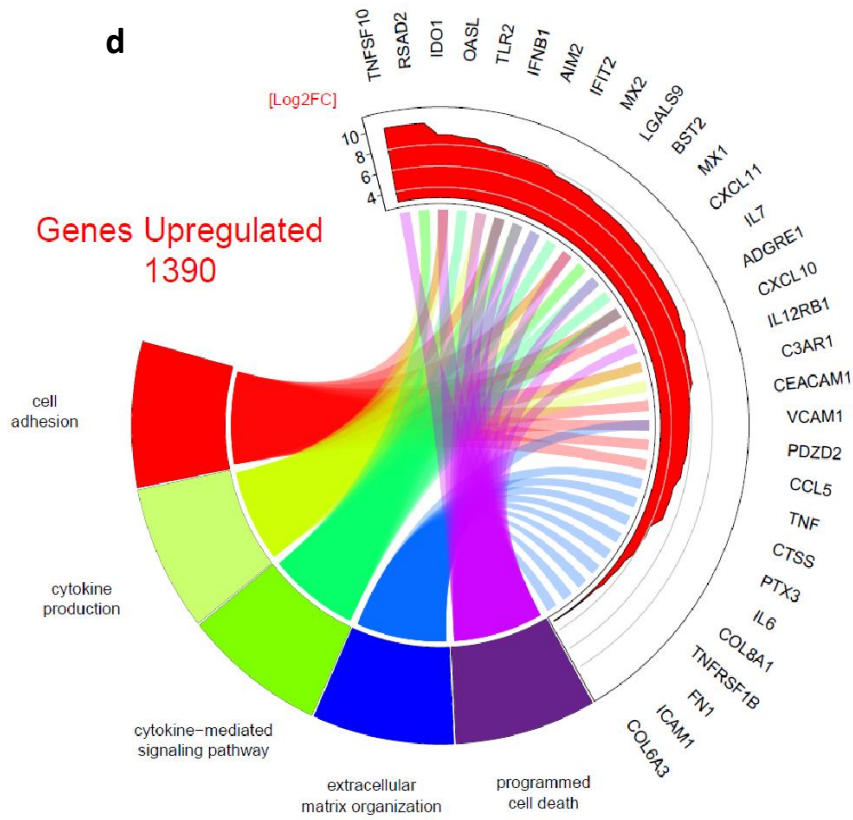


Figure 4a

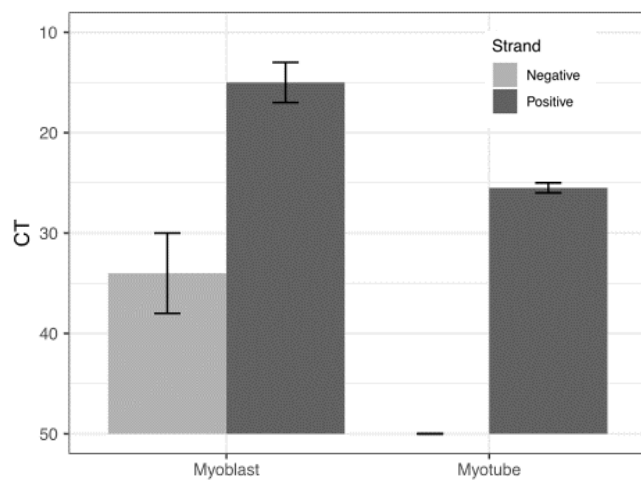


Figure 4 b-c

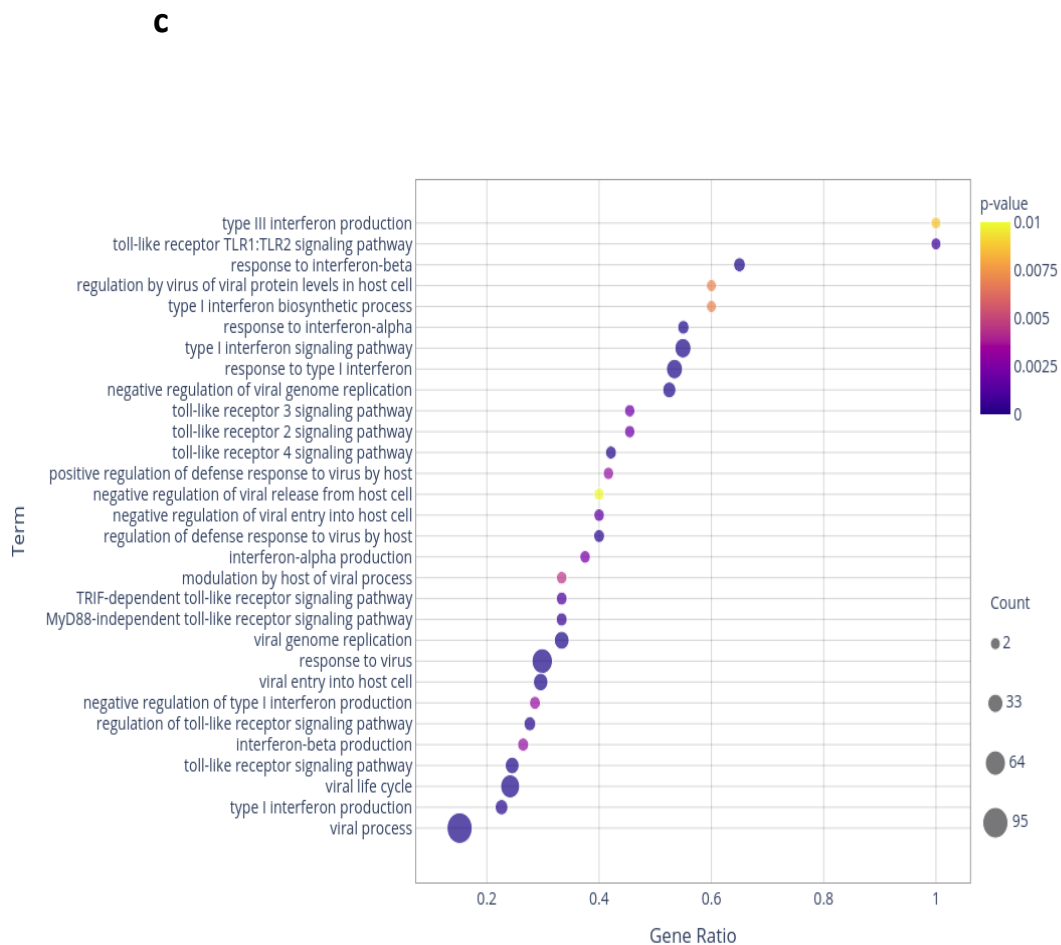
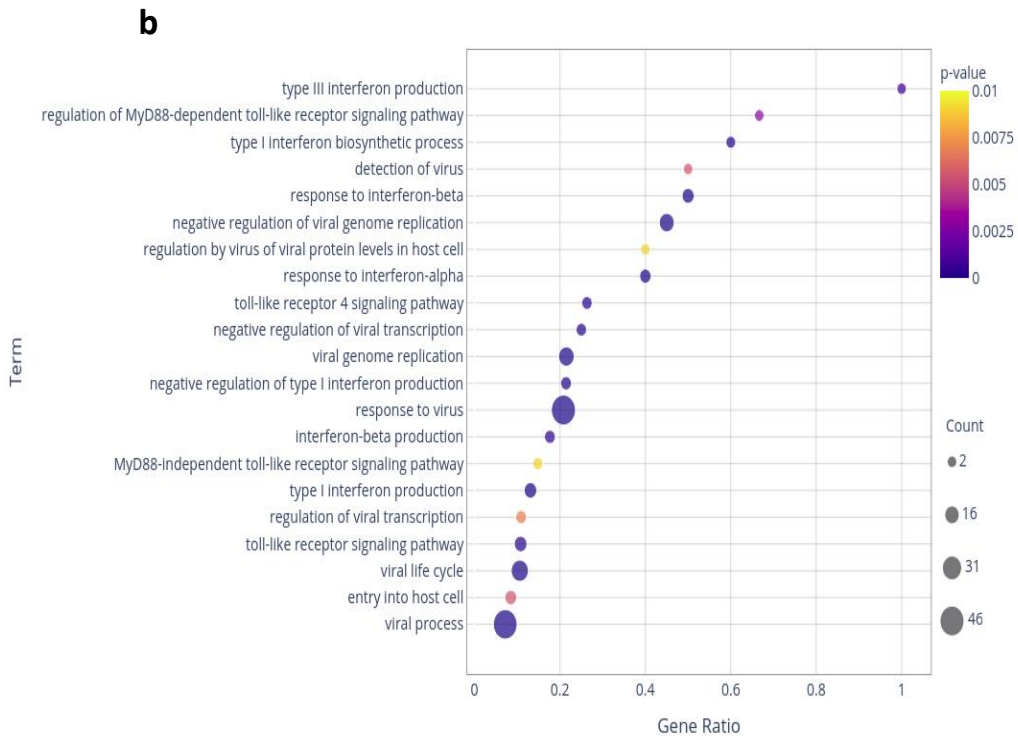


Figure 4 d-e

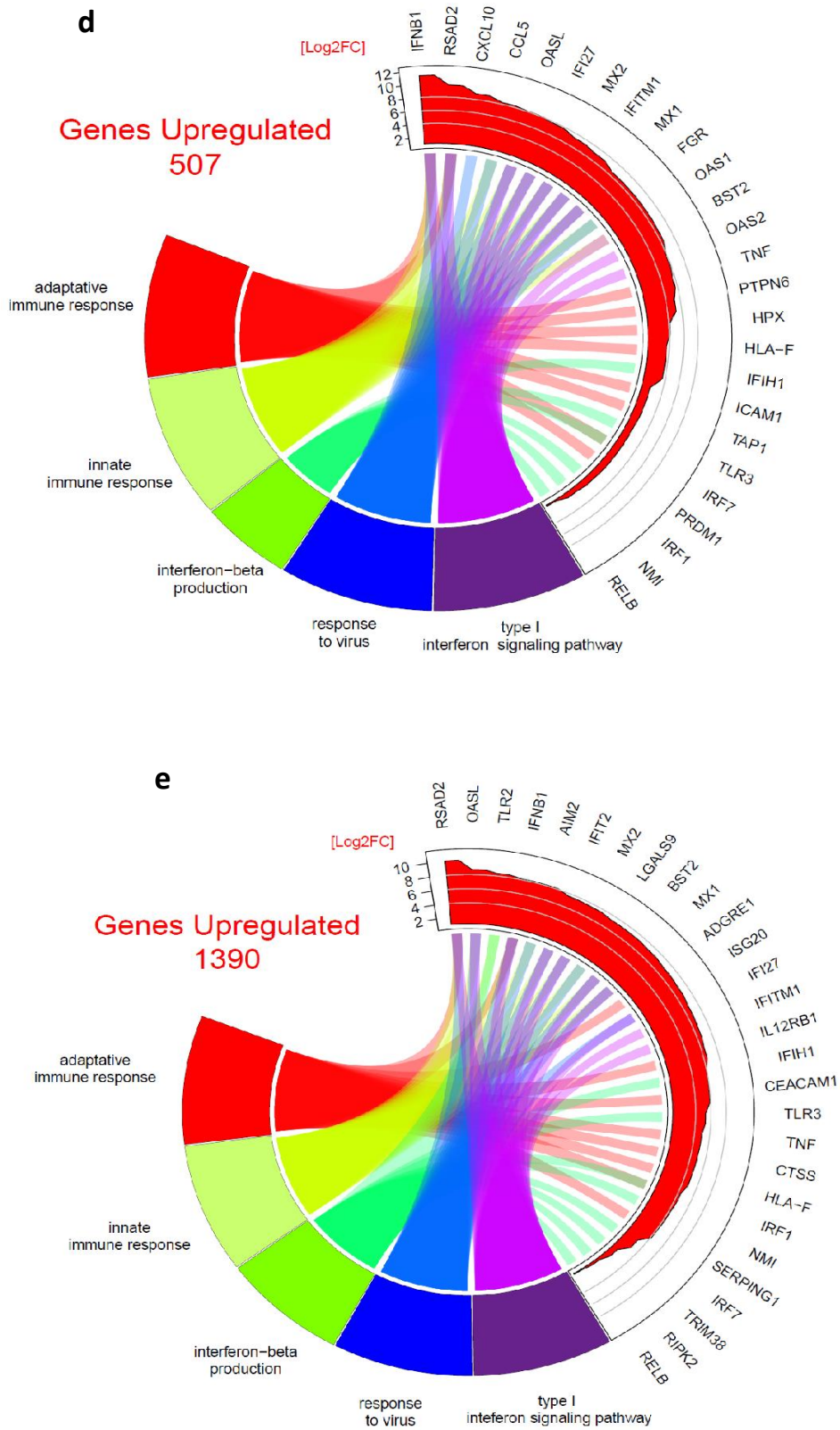


Figure 4f

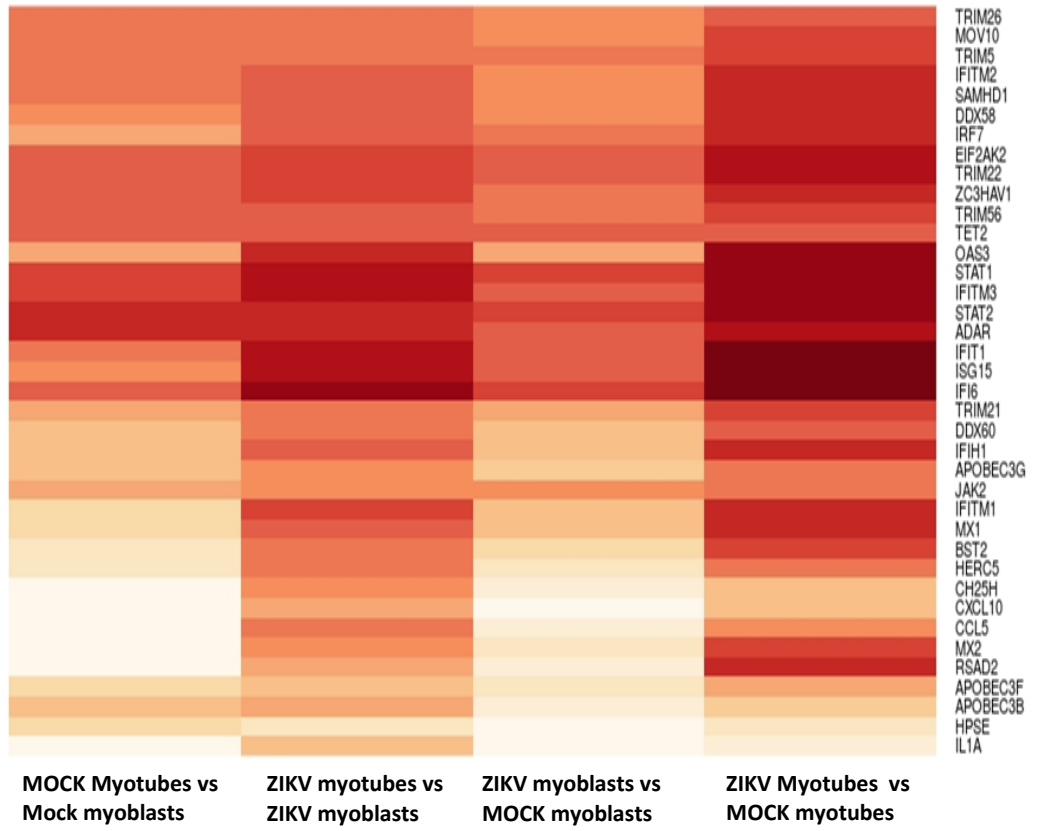
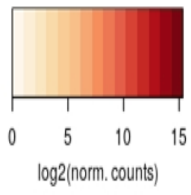


Figure 5

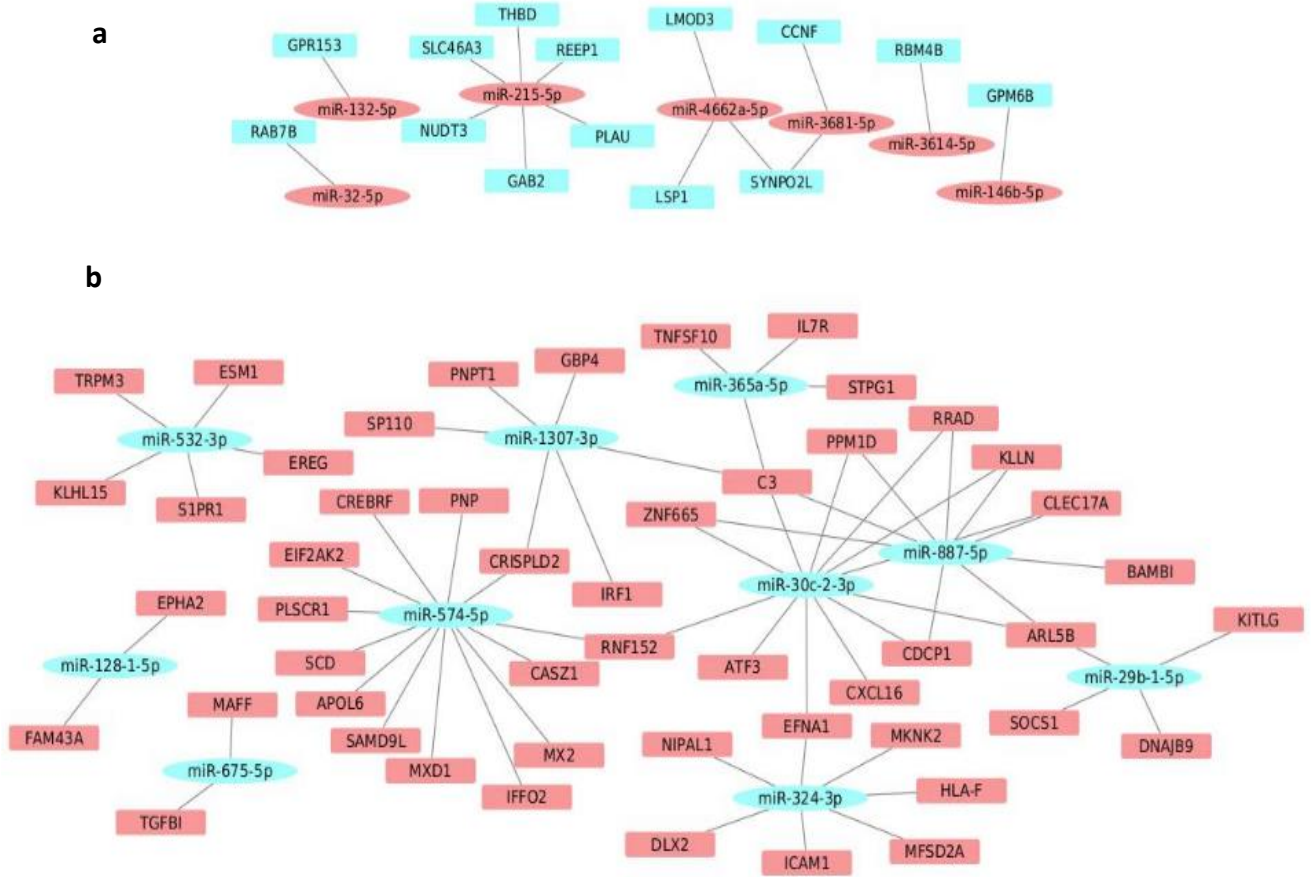
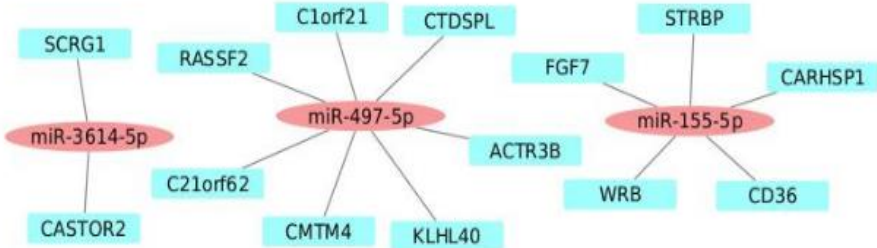


Figure 6

a



b

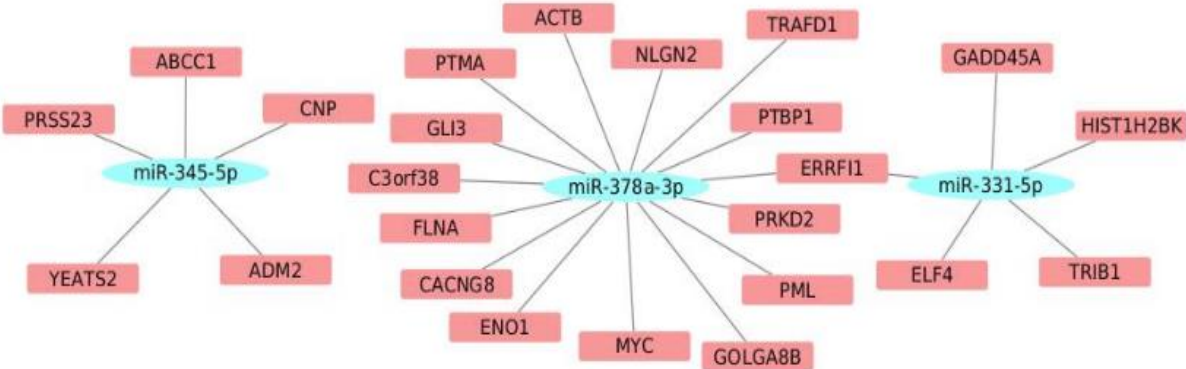
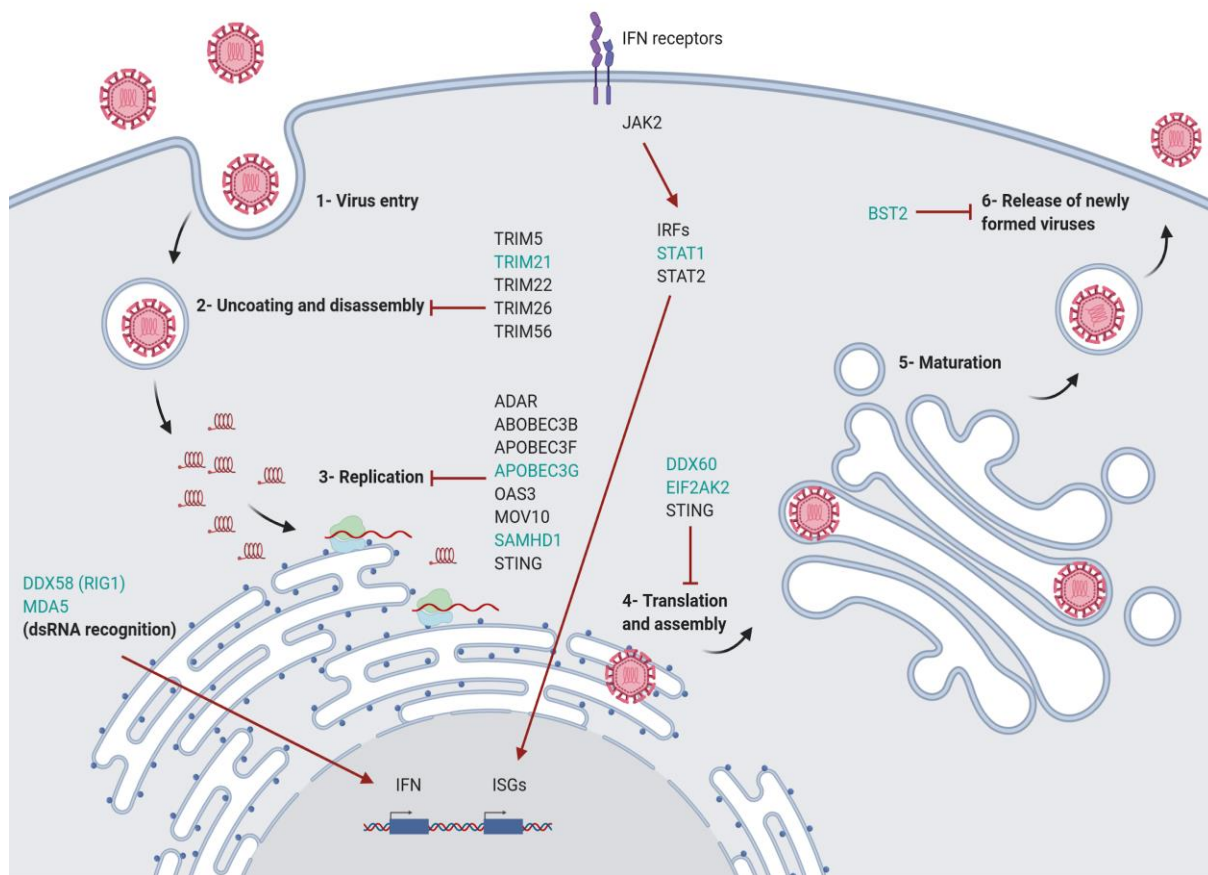
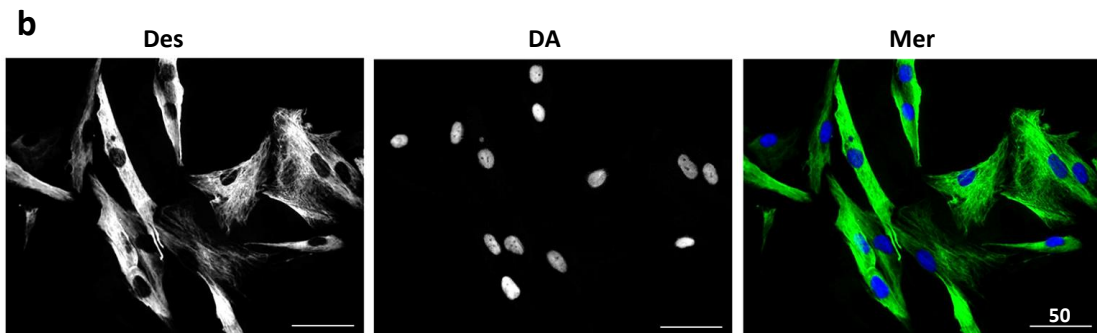
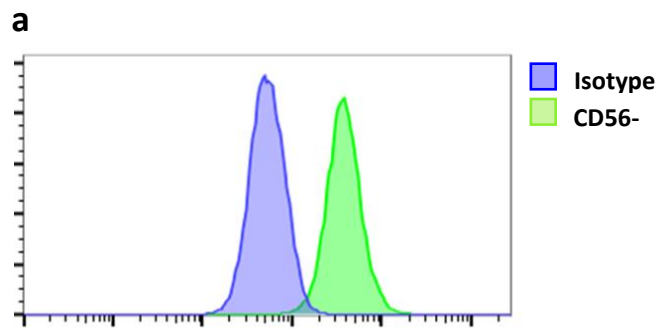


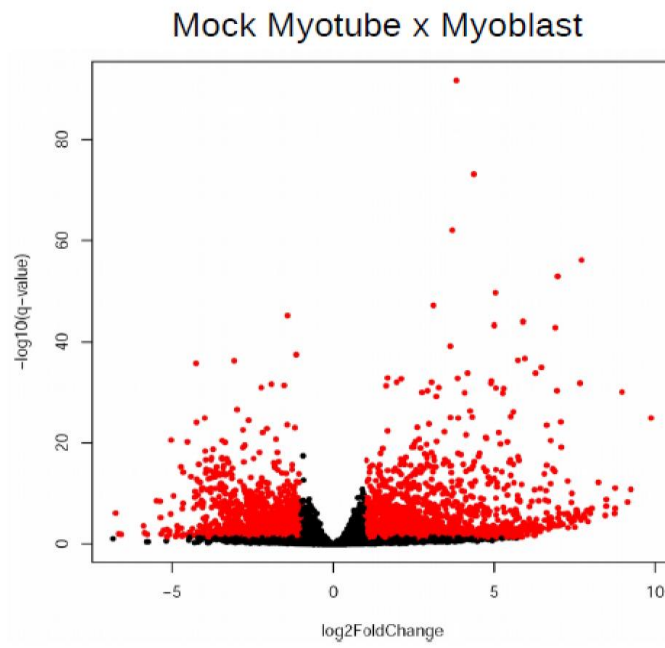
Figure 7



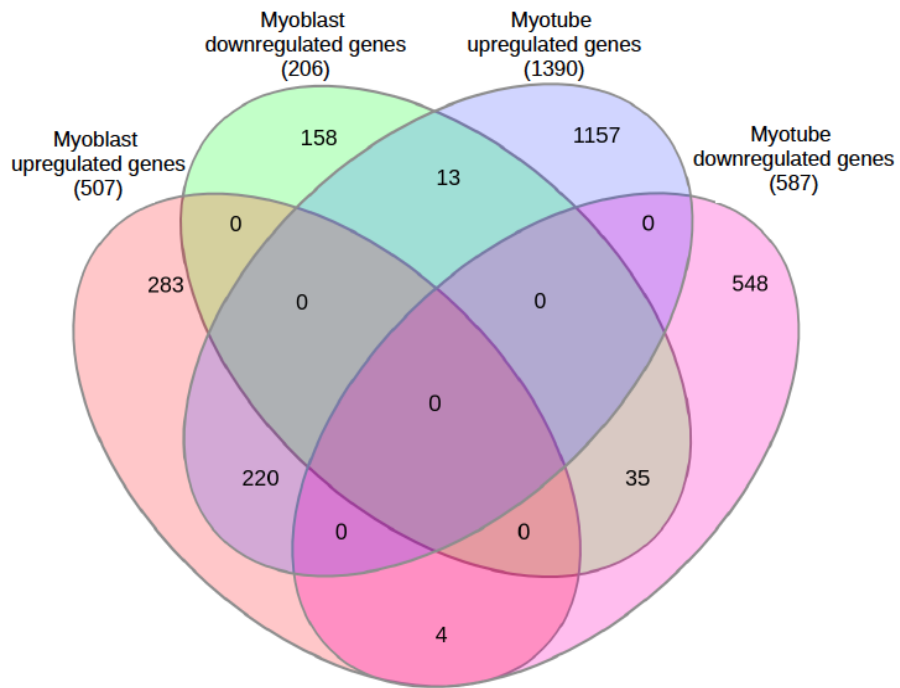
Supplemental Figure 1



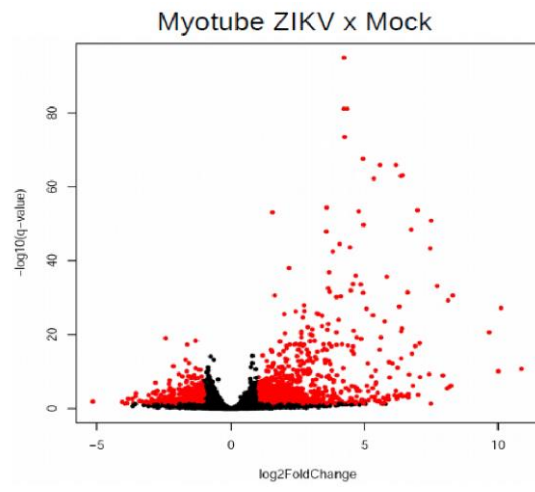
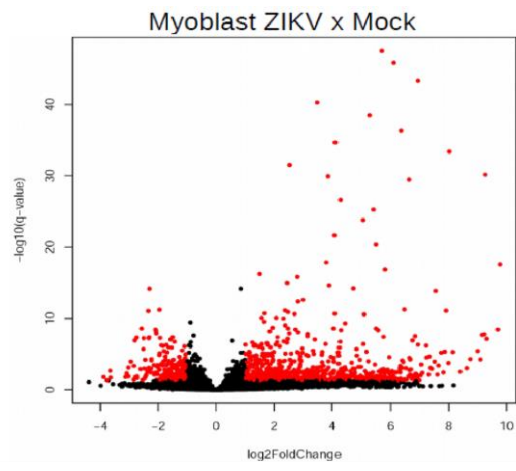
Supplemental Figure 2



Supplemental Figure 4

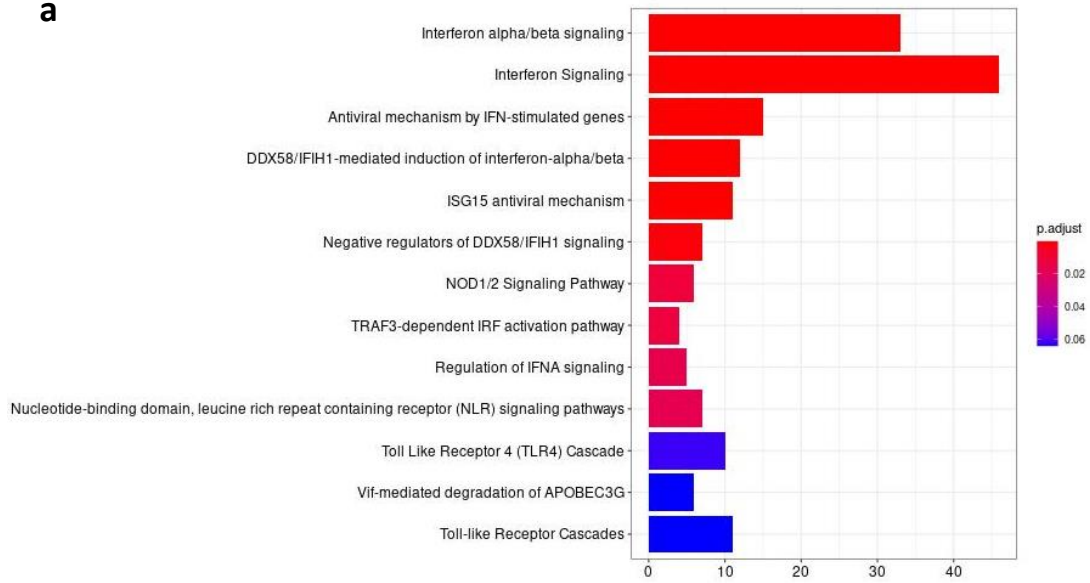


Supplemental Figure 5

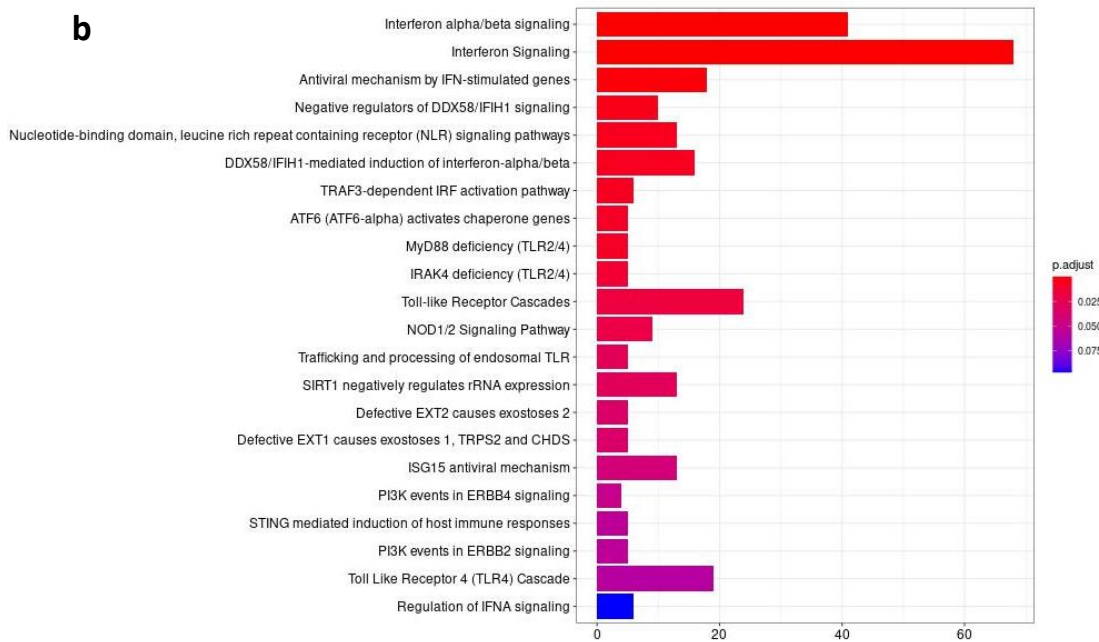


Supplemental Figure 6

a



b



Supplemental Figure 7

