

FABIANE MESSNER AUGUSTO

ESTUDO DOS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DO
SISTEMA CALICREÍNA-CININA NA INFECÇÃO PELO
VÍRUS DA DENGUE



**Monografia apresentada ao Instituto de
Microbiologia Paulo de Góes, da
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
como pré-requisito para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas:
Microbiologia e Imunologia.**

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
RIO DE JANEIRO
DEZEMBRO / 2023

Trabalho realizado no Departamento de Virologia, do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, UFRJ, sob a orientação da Professora Luciana Barros de Arruda e co-orientação de Sharton Vinicius Antunes Coelho.

CIP - Catalogação na Publicação

A923e Augusto, Fabiane Messner
Estudo dos mecanismos de ativação do sistema calicreína-cinina na infecção pelo vírus da dengue / Fabiane Messner Augusto. -- Rio de Janeiro, 2023. 63 f.

Orientadora: Luciana Barros de Arruda.
Coorientador: Sharton Vinicius Antunes Coelho.
Trabalho de conclusão de curso (graduação) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia, Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia, 2023.

1. Calicreína-cinina. 2. Dengue. 3. HBMEC. 4. Bradicinina . I. Arruda, Luciana Barros de, orient. II. Coelho, Sharton Vinicius Antunes, coorient. III. Título.

INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES / UFRJ
COORDENAÇÃO DE ENSINO DE GRADUAÇÃO

**ATA DA APRESENTAÇÃO DE MONOGRAFIA PARA APROVAÇÃO NO RCS DE
 TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO, BACHARELADO EM CIÊNCIAS
 BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

ALUNO(A): Fabiane Messner Augusto

DRE: 120031797

BANCA EXAMINADORA:

Profa. Dra. Juliana Echevarria Neves de Lima (Presidente)
 Profa. Dra. Elisa Beatriz Prestes
 Prof. Dr. Marcos Romário Matos de Souza
 Profa. Dra. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro (Suplente)

**Título da Monografia: "Estudo dos mecanismos de ativação do sistema calicreína-cinina
 na infecção pelo vírus da dengue"**

Local: Anfiteatro do IMPG / CCS / UFRJ

Data e hora de início: 05 de dezembro de 2023 às 09:00h

Em sessão pública, após exposição de cerca de 50 minutos, o aluno foi argüido pelos membros da Banca Examinadora, demonstrando suficiência de conhecimentos e capacidade de sistematização no tema de sua Monografia, tendo, então, obtido nota 10 neste requisito do RCS de **TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO**. Na forma regulamentar, foi lavrada a presente ata que é assinada pelos membros da banca examinadora, aluno, orientador (e/ou coorientador) e pelo coordenador do RCS.

Rio de Janeiro, 05 de dezembro de 2023.

NOTA:

Banca Examinadora:

10



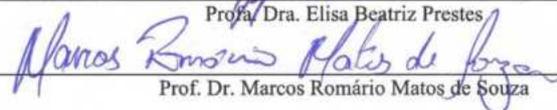
Profa. Dra. Juliana Echevarria Neves de Lima (Presidente)

10



Profa. Dra. Elisa Beatriz Prestes

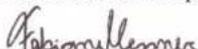
10



Prof. Dr. Marcos Romário Matos de Souza

Profa. Dra. Leticia de Albuquerque Maranhão Carneiro (Suplente)

Aluno(a):



Fabiane Messner Augusto

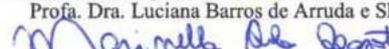
Orientador(a)



(e coorientador):

Profa. Dra. Luciana Barros de Arruda e Sharton Vinicius Antunes Coelho

Coordenadora de



TCC:

Profa. Marinella Silva Laport

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabete e Luiz, por sempre incentivarem a minha educação. Obrigada por me proporcionarem um ambiente que me deu apoio para fazer o que eu quisesse fazer e ser o que eu quisesse ser. Obrigada à minha mãe pelo suporte em todos os sentidos possíveis, sempre se preocupando com o meu bem-estar. Ao meu pai, por me ensinar incansavelmente o valor que a educação e o trabalho têm, e me proporcionar todas as condições para que eu chegasse onde estou hoje. Obrigada por nunca medir esforços para apoiar, desde criança quando você treinava a tabuada comigo depois do trabalho. Obrigada por ser o grande incentivador da minha formação, sem você eu não teria tido a mesma vontade de chegar até aqui. Sei que não são todos que têm a oportunidade de crescer com esse apoio, então sempre serei grata a vocês.

À **minha orientadora, Prof^ª. Luciana Arruda**, por estar sempre presente e disposta a me ajudar. Tenho você como um exemplo de cientista, sempre brilhante em arrumar alternativas quando eu me frustrei ao encontrar dificuldades. Obrigada por sempre me incentivar a pensar, discutir e participar ativamente do meu projeto, e por confiar em mim para fazer pesquisa com você. **E ao meu coorientador, Dr. Sharton Vinícius**, pela disposição em me ajudar no dia a dia e por me ensinar tanto na bancada. Obrigada por ser a primeira pessoa a quem eu consultava quando eu pensava algo novo e por ter tempo para discutir ciência comigo todas essas vezes, mesmo que você tivesse tantas outras coisas para fazer.

Aos colegas do LAGIIVir, por me ajudarem nos momentos de caos, me ensinarem um pouco de tudo que sabem e me acolherem nesses 2 anos e meio. Em especial à Lana, por contribuir para a realização das citometrias de fluxo e dos ensaios de *transwell* com tanto cuidado, me ensinando de forma muito valiosa e sendo indispensável para a realização desse trabalho; ao Bruno, por sempre se preocupar, me acolher e estar disposto a me ensinar algo, com tanta paciência e didática impecável; e ao Luan, por tirar minhas dúvidas, me aconselhar e consolar quando necessário, sempre se preocupando comigo e tornando a rotina mais leve quando eu precisava. Obrigada ainda à Prof^ª. Luciana Costa e seus alunos, que também contribuíram para tornar a rotina no laboratório mais fácil e agradável, e para as discussões científicas semanais.

Aos meus amigos feitos durante a graduação, sem os quais eu não teria aprendido tanto. Gabriela, Gabriel e Letícia, obrigada por 4 anos de resumos feitos em conjunto, ligações para estudar na pandemia, revisões pré-prova, docinhos pós-almoço e discussões científicas que acabavam em brigas de tanto que as levávamos a sério. Vocês me ajudaram em momentos de crise, sem pedir nada em troca, e me deram a certeza de que posso depender de vocês. Tenho muito orgulho de tudo que construímos juntos, e eu não escolheria nenhum outro grupo para fazer todos os trabalhos possíveis. Lívia e Mariana, obrigada por me ouvirem, torcerem por mim e compartilharem tantas risadas comigo. Vocês me mostraram como é importante ter quem te acolhe nas fases difíceis e comemore as suas fases boas. E Virgínia, obrigada por aparecer para facilitar meus momentos difíceis nos últimos meses e melhorar esse final de graduação. Cursar a faculdade sem vocês seria muito mais difícil e, com certeza, mais chato.

À Universidade Federal do Rio de Janeiro e ao Instituto de Microbiologia Paulo de Goés pela oportunidade de aprender de com os melhores professores. Às agências de fomento, CNPq e FAPERJ, por financiar nossa pesquisa e a ciência brasileira. À banca avaliadora, pela honra de cederem seu tempo e atenção para o meu trabalho.

RESUMO

FABIANE MESSNER AUGUSTO

ESTUDO DOS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNA-CININA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

Orientador: Luciana Barros de Arruda

Coorientador: Sharton Vinícius Antunes Coelho

Resumo da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O vírus da dengue (DENV) é um arbovírus conhecido por causar disfunções coagulativas e aumento da permeabilidade vascular, resultando em eventos trombotogênicos e choque hipovolêmico em pacientes com dengue grave. O sistema calicreína-cinina (KKS) consiste em uma cascata de proteólise limitada, relacionada tanto ao disparo da coagulação sanguínea quanto a processos inflamatórios, o que nos motivou a investigar o possível papel desse sistema na patogênese da dengue. Classicamente, o KKS é ativado pelo contato do fator XII (FXII) com moléculas ou superfícies negativamente carregadas, tais como DNA, RNA e polifosfatos secretados por plaquetas e mastócitos ativados. Nessas circunstâncias, o FXII sofre um processo de autoclivagem e gera fragmentos de FXII ativado (FXIIa). FXIIa, por sua vez, cliva a pré-calicreína (PK) em calicreína plasmática (PKa), a qual cliva o seu cofator cininogênio (HK), gerando a bradicinina (BK), um peptídeo vasoativo. Através da sinalização de seus receptores (BKR), a BK modula as funções endoteliais, induzindo sinais relacionados à inflamação, como aumento da permeabilidade vascular, edema e dor, eventos também observados durante a dengue. Resultados anteriores do nosso grupo demonstraram, através de análises *ex vivo*, que o KKS está ativado no plasma de pacientes com dengue. Nesse estudo, demonstramos ainda que a infecção de HBMECs (células endoteliais de microvasculatura cerebral humana) por DENV regula positivamente a expressão de BKRs, e a adição de BK exógena em culturas de células infectadas por DENV promove o aumento da replicação viral. Assim, sugerimos que o KKS pode desempenhar um papel importante na patogênese da dengue. Contudo, os mecanismos que desencadeiam o disparo desse sistema durante a infecção, bem como o papel das células endoteliais neste processo, ainda não foram explorados. Aqui, investigamos se a infecção de HBMECs promove diretamente a ativação do KKS e se essa ativação pode modular a permeabilidade das células endoteliais *in vitro*. Para isso, as HBMECs infectadas com DENV-2 foram cultivadas com plasmas de doadores humanos saudáveis ou com as proenzimas purificadas do KKS no pico da replicação do vírus. Observamos que os níveis de HK ativado na superfície das células infectadas foram superiores ao observado em células cultivadas com mock (meio metabolizado de células não infectadas) ou DENV inativado. Hipotetizamos, então, que a exposição de fosfatidilserina por HBMECs infectadas apoptóticas poderia favorecer a retenção e clivagem de HK, resultando no aumento da geração de BK. De fato, demonstramos que a exposição de fosfatidilserina por HBMECs apoptóticas é capaz de ativar diretamente o KKS e que os níveis de fosfatidilserina estão aumentados em HBMECs infectadas no pico da replicação viral (48 h.p.i), indicando que esse pode ser o mecanismo por trás da ativação do KKS nessas células. Curiosamente, ainda observamos que a infecção de HBMECs protege essas células do aumento de permeabilidade induzido por BK em células não infectadas, possivelmente de forma associada a eventos que envolvem a

regulação da produção de óxido nítrico e retardo da morte celular, previamente reportados pelo grupo. Em conjunto, nossos achados sugerem que a infecção de células endoteliais pelo DENV pode contribuir para a ativação do KKS, através de um mecanismo de ativação relacionado a indução de apoptose e exposição de fosfatidilserina mediante infecção. Nossos dados indicam, ainda, que embora a BK tenha sido descrita como modulador positivo da replicação viral, a presença desse peptídeo exógeno protege as células infectadas da permeabilidade induzida pela replicação viral e morte celular. Assim, esse trabalho possibilita maior entendimento da relevância de moduladores vasoativos na proteção e lesão vascular na infecção pelo DENV.

Palavras-chave: caliceína-cinina; DENV; HBMEC; bradicinina.

ABSTRACT**FABIANE MESSNER AUGUSTO****STUDY OF THE KALLIKREIN-KININ SYSTEM ACTIVATION MECHANISMS
DURING DENGUE VIRUS INFECTION****Orientador:** Luciana Barros de Arruda
Coorientador: Sharton Vinícius Antunes Coelho

Abstract da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

Dengue virus (DENV) is an arbovirus known to cause coagulation dysfunctions and induce vascular permeability, resulting in thrombotic events and hypovolemic shock in patients with severe dengue. The kallikrein-kinin system (KKS) is a limited proteolysis cascade of serineproteases, related to both blood coagulation and inflammatory processes, which motivated us to investigate its possible role in dengue pathogenesis. Classically, KKS is activated by the contact of factor XII (FXII) to negatively charged surfaces and molecules, such as DNA, RNA and polyphosphates released by activated platelets and mast cells. In these circumstances, FXII goes through a process of autocleavage and generates fragments of activated FXII (FXIIa). FXIIa cleaves prekallikrein (PK) into plasma kallikrein (PKa), which then cleaves its cofactor kininogen (HK), generating bradykinin (BK), a vasoactive nonapeptide. Through signaling from its receptors (BKR), BK modulates endothelial functions, inducing signs related to inflammation, such as increased vascular permeability, edema and pain, which are also observed during dengue. Previous results from our group demonstrated, through an *ex vivo* analyses, that KKS is activated in the plasma of dengue patients. In this study, we further demonstrated that DENV infection of HBMECs (human brain microvascular endothelial cells) positively regulates the expression of BKRs, and the addition of exogenous BK to DENV-infected cell cultures promotes increased viral replication. Thus, we suggest that KKS may play an important role in the pathogenesis of dengue. However, the mechanisms that trigger the firing of this system during infection, as well as the role of endothelial cells in this process, have not yet been explored. Here, we investigated whether infection of HBMECs directly promotes KKS activation and whether this activation can modulate endothelial cell permeability *in vitro*. HBMECs infected with DENV-2 were cultured with plasma from healthy human donors or with purified KKS proenzymes at the peak of virus replication. We observed that the levels of activated HK on the surface of infected cells were higher than that observed in cells cultured with mock or inactivated DENV. Therefore, we hypothesized that phosphatidylserine exposure by apoptotic HBMECs could favor HK retention and cleavage, resulting in increased BK generation. Indeed, we demonstrated that phosphatidylserine exposure by apoptotic HBMECs is capable of directly activating KKS and phosphatidylserine levels are increased in infected HBMECs at the peak of viral replication (48 h.p.i), indicating that this could be the mechanism behind KKS activation on these cells. Interestingly, we also observed that infection of HBMECs protects these cells from the increase in permeability induced by BK in uninfected cells, possibly associated with events that involve the regulation of nitric oxide production and delay in cell death, previously reported by the

group. Taken together, our findings suggest that DENV infection of endothelial cells may contribute to the activation of KKS, through an activation mechanism related to the induction of apoptosis and exposure of phosphatidylserine upon infection. Our data further indicate that although BK has been described as a positive modulator of viral replication, the presence of this exogenous peptide protects infected cells from permeability induced by viral replication and cell death. We intend to investigate these events in detail in *in vitro* and *in vivo* models, aiming to better understand the relevance of vasoactive modulators in protection and vascular damage in DENV infection.

Key-words: kallikrein-kinin; DENV; HBMEC; bradykinin.

RESUMO PARA LEIGOS

FABIANE MESSNER AUGUSTO

ESTUDO DOS MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA CALICREÍNA-CININA NA INFECÇÃO PELO VÍRUS DA DENGUE

Orientador: Luciana Barros de Arruda

Coorientador: Sharton Vinícius Antunes Coelho

Resumo para leigos da Monografia apresentada no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia e aprovação no RCS Trabalho de Conclusão de Curso.

O nosso sangue possui muitas proteínas e, algumas delas, atuam em conjunto formando um sistema conhecido como sistema calicreína-cinina (KKS), que está envolvido na coagulação do sangue e na produção da bradicinina (BK), uma pequena proteína capaz de aumentar a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Assim, essa proteína pode levar ao extravasamento do plasma sanguíneo (parte líquida do sangue) para os tecidos, causando inchaço, dor e inflamação. Pessoas com dengue também têm maior permeabilidade dos vasos sanguíneos, com perda de plasma, o que, em casos mais graves, pode ser fatal devido à diminuição do volume sanguíneo. Nosso grupo de pesquisa já demonstrou em um estudo anterior que o KKS está ativado em amostras de plasma de pacientes com dengue. Nesse trabalho, continuamos esse estudo tentando compreender como o KKS pode ser ativado pela infecção desse vírus e contribuir para o desenvolvimento dos sintomas nos pacientes com dengue. Nós descobrimos que a infecção de células endoteliais, células que compõem a parede de vasos sanguíneos, é capaz de facilitar a ativação do KKS. Além disso, demonstramos que a ativação do KKS pode acontecer quando as células endoteliais começam a morrer por conta da infecção. Por fim, vimos que células endoteliais infectadas com dengue, respondem de forma diferente à bradicinina e são menos afetadas pela indução de permeabilidade causada por BK. Em geral, esse estudo sugere o KKS como um fator ativo que influencia na dengue, e demonstra a importância de estudar esse sistema nas infecções por vírus.

Lista de figuras

Figura 1	Taxa mundial de notificação de casos de dengue por 100.000 habitantes.
Figura 2	Distribuição da taxa de incidência de dengue por região do Brasil nas semanas epidemiológicas 1 a 52/2022.
Figura 3	Estrutura do vírus da dengue (DENV).
Figura 4	Ciclo replicativo do DENV.
Figura 5	Vias intrínseca e extrínseca de coagulação sanguínea.
Figura 6	Cascata proteolítica do sistema calicreína-cinina (KKS).
Figura 7	A infecção de células da microvasculatura cerebral humana (HBMECs) pelo DENV induz a ativação do KKS na presença de plasma humano.
Figura 8	Controles da ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema em fase fluida.
Figura 9	Controles da ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema na superfície celular.
Figura 10	A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema.
Figura 11	Anexina V é eficaz em bloquear a fosfatidilserina induzida pelo tratamento com estaurosporina (STS).
Figura 12	A exposição de fosfatidilserina por HBMECs apoptóticas é capaz de levar à ativação do KKS.
Figura 13	HBMECs infectadas com DENV apresentam fosfatidilserina de membrana exposta em 48 h.p.i. e o bloqueio com anexina V é eficaz.
Figura 14	Curva temporal de resistência elétrica transendotelial (TEER) em células tratadas com BK ou infectadas com DENV.
Figura 15	Curva temporal de porcentagem de TEER (% TEER) em HBMECs infectadas e/ou estimuladas com 10 nM ou 100 nM de BK.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADE	Do inglês, <i>antibody-dependent enhancement</i>
APTT	Tempo de tromboplastina parcial ativado
B1R	Receptor de bradicinina B1
B2R	Receptor de bradicinina B2
BHK	Células de rim de hamster bebê, do inglês <i>baby hamster kidney</i>
BK	Bradicinina, do inglês <i>bradykinin</i>
BOD	Incubadora de demanda biológica de oxigênio
C	Capsídeo
C1Inh	Inibidor de C1-esterase
C6/36	Células de larva de mosquitos <i>Aedes albopictus</i>
CID	Coagulação intravascular disseminada
CMC	Carboximetilcelulose
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DC	Célula dendrítica
DC-SIGN	Do inglês, <i>Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin</i>
DENV	Vírus da dengue
DXS	Dextran sulfato
E	Envelope
ECA	Enzima conversora de angiotensina
FcR	Receptor Fc
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FXII	Fator XII
FXIIa	Fragmento A de Fator XII
GAG	Glicosaminoglicanos
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
h.p.i.	Horas após infecção
HAE	Angioedema hereditário
HBMEC	Célula de microvasculatura cerebral humana, do inglês <i>human brain microvascular endothelial cell</i>

HDL	Lipoproteína de alta densidade, do inglês <i>high density lipoprotein</i>
HK	Cininogênio de alto peso molecular, do inglês <i>high molecular weight kininogen</i>
HKa	HK livre de cinina
HOE-140	Icatibant
HSP	Proteína de choque térmico, do inglês <i>heat shock protein</i>
HSPG	Proteoglicano de heparam-sulfato
HTG	HEPES Tyrode gelatina
ICAM	Molécula de adesão intercelular
iDENV	DENV inativado
IFN	Interferon
IL	Interleucina
IP	Inibidor de protease
iPN	Plasma humano inativado
KKS	Sistema calicreína-cinina, do inglês <i>kallikrein-kinin system</i>
M	Membrana
Mo	Monócito
MØ	Macrófago
MOI	Multiplicidade de infecção
NC	Nucleocapsídeo
NET	Rede extracelular de neutrófilos
NO	Óxido nítrico
NS	Proteína não estrutural
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de plaque
PK	Pré-calicreína, do inglês <i>prekallikrein</i>
PKa	Calicreína plasmática
PN	Plasma humano
Poly (I:C)	Ácido poli-inosínico:policidídlico
prM	Precursora de membrana
qRT-PCR	PCR quantitativo em tempo real

RE	Retículo endoplasmático
RNAdf	RNA dupla fita
RNAg	RNA genômico
SDS	Dodecil-sulfato de sódio
SINV	Vírus Sindbis
STS	Estaurosporina
TBS	Solução salina tamponada com Tris
TEER	Resistência elétrica transendotelial
TF	Fator tecidual, do inglês <i>tissue factor</i>
TGN	Rede Trans-golgi, do inglês <i>trans-golgi network</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
tPA	Ativador de plasminogênio tecidual
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VWF	Fator de von Willebrand
WB	Western blotting

ÍNDICE

RESUMO	vi
ABSTRACT	viii
RESUMO PARA LEIGOS	x
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Epidemiologia da dengue	1
1.2. Manifestações clínicas da dengue	3
1.3. Estrutura e replicação do vírus da dengue	3
1.4. Patogênese do vírus da dengue	6
1.5. Cascatas de coagulação sanguínea	7
1.6. O sistema calicreína-cinina (KKS)	8
1.7. O endotélio vascular e as disfunções coagulativas na dengue	10
1.8. Dengue e KKS	12
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	13
3.1. Objetivos gerais	13
3.2. Objetivos específicos	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1. Obtenção de plasma	13
4.2. Linhagens celulares	13
4.2.1. HBMEC	14
4.2.2. C6/36	14
4.2.3. BHK-21	14
4.3. Vírus	14
4.4. Titulação por ensaio de plaque	15
4.5. Infecção de HBMECs	15
4.6. Avaliação da ativação de elementos do sistema calicreína-cinina em culturas de HBMECs infectadas com DENV.....	16
4.6.1. Ensaios utilizando plasma humano.....	16
4.6.2. Ensaios utilizando proenzimas do sistema calicreína-cinina purificadas.....	16
4.7. Western blotting	17
4.8. Avaliação da expressão e do bloqueio de fosfatidilserina por citometria de fluxo	18
4.9. Avaliação da ativação do KKS em HBMECs apoptóticas após bloqueio de fosfatidilserina com Anexina V	19
4.10. Avaliação da ativação do sistema calicreína-cinina em HBMECs após bloqueio de fosfatidilserina com Anexina V	19
4.11. Análise estatística	20
5. RESULTADOS	20
5.1. A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de plasma humano	20

5.2.	A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema	23
5.3.	A exposição de fosfatidilserina em HBMECs apoptóticas pode levar à ativação do KKS	29
5.4.	HBMECs apresentam fosfatidilserina de membrana exposta em 48 h.p.i	32
5.5.	A infecção de HBMECs com DENV leva à reversão da abertura da barreira endotelial mediada por BK	32
6.	DISCUSSÃO	37
7.	CONCLUSÕES	40
8.	REFERÊNCIAS	40

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia da dengue

A dengue, transmitida pelo vírus da dengue (DENV), é uma arbovirose comum em climas tropicais e subtropicais, sendo a Ásia e as Américas as principais zonas de risco (Bhatt *et al.*, 2013; OMS, 2023). A dengue ainda é uma doença muito prevalente no mundo, com estimativa de 390 milhões de casos por ano, dos quais aproximadamente 96 milhões apresentam manifestações clínicas. Mais de 100 países ainda são considerados endêmicos para a doença, inclusive o Brasil (OMS, 2023) (**Figura 1**). Somente em 2022, ocorreram 1.450.270 casos prováveis de dengue no Brasil, sendo a maior taxa de incidência na região Centro-Oeste (**Figura 2**) (Ministério da Saúde, 2023).

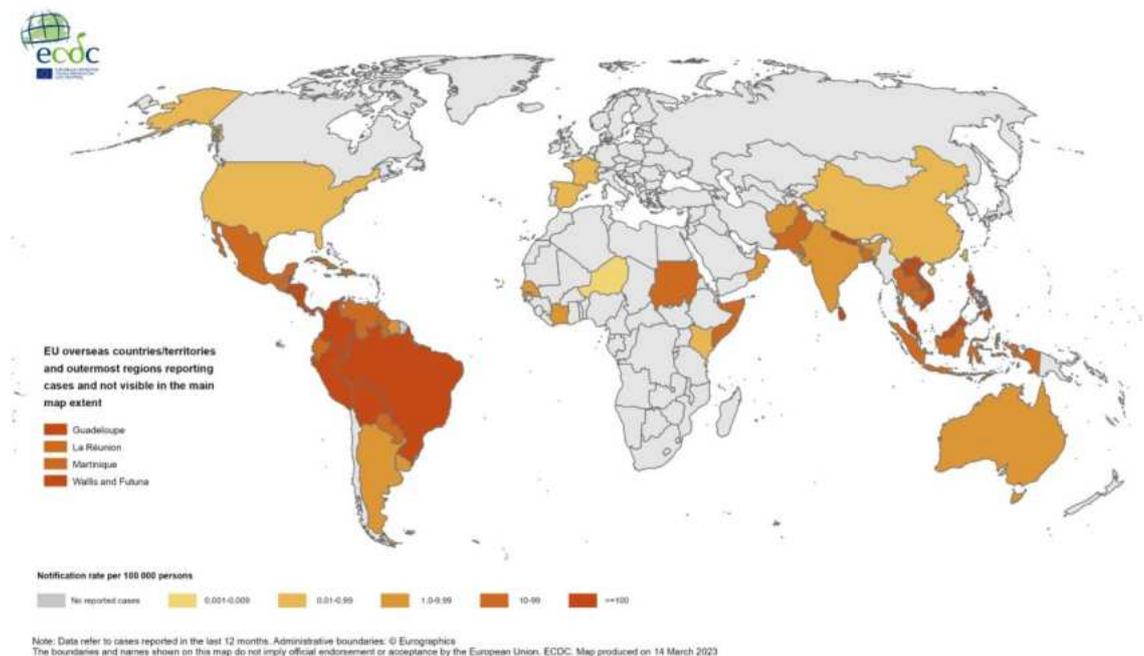
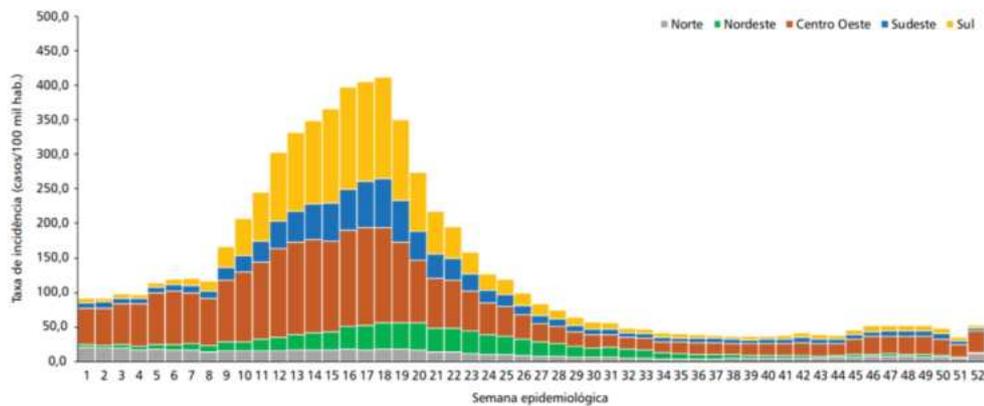


Figura 1: Taxa mundial de notificação de casos de dengue por 100.000 habitantes. Dados de abril de 2022 a março de 2023. Fonte: ECDC.



Fonte: Sinan Online (banco de dados atualizado em 2/1/2023). Dados sujeitos a alteração.
*Dados referentes a SE 52.

Figura 2: Distribuição da taxa de incidência de dengue por região do Brasil nas semanas epidemiológicas 1 a 52/2022. Fonte: Ministério da Saúde.

O DENV pertence à família *Flaviridae*, ao gênero *Orthoflavivirus* e é transmitido por fêmeas de mosquitos do gênero *Aedes*, principalmente pelas espécies *A. aegypti* e *A. albopictus* (revisado por Guzman *et al.*, 2016). Esse vetor predomina em estações quentes e chuvosas, fazendo com que a incidência da dengue seja maior nesses períodos (Funasa, 2001). Quatro sorotipos de DENV já foram descritos (1-4), além de diversos genótipos dentre esses sorotipos. Sorotipos e linhagens podem variar de frequência em um mesmo local ao longo do tempo, sendo substituídos por outros genótipos com mutações que conferem vantagens seletivas de *fitness* viral, processo chamado de *turnover* (Hang *et al.*, 2010; Choudhury, Lott & Askov, 2014). Além disso, a introdução de novos vírus antígenicamente diferentes da linhagem predominante anterior tem potencial de causar surtos nas regiões acometidas (Rico-Hesse *et al.*, 1997; Shrivastava *et al.*, 2014; Williams *et al.*, 2014). Sendo assim, o monitoramento epidemiológico é indispensável para prever o *turnover* de novas variantes, possivelmente mais virulentas.

O controle do vetor ainda é a principal medida de prevenção contra a disseminação da dengue, devendo ser feita a constante vigilância entomológica pelas equipes municipais de saúde, a fim de detectar a presença, distribuição e densidade dos mosquitos do gênero *Aedes*. Dessa forma, é possível fazer a recomendação e o direcionamento de medidas de prevenção e controle, além da remoção de possíveis criadouros. Além disso, o monitoramento dos arbovírus circulantes deve ser constante, tendo em vista que o surgimento de novos genótipos e a mudança de um sorotipo prevalente está relacionado com a ocorrência de epidemias (Ministério da saúde, 2022).

1.2. Estrutura e replicação do vírus da dengue

O DENV é um arbovírus envelopado de genoma RNA fita simples de polaridade positiva. Ele apresenta 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), precursora de membrana (prM)/membrana (M) e envelope (E); e 7 proteínas não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (**Figura 3**). A proteína M é sintetizada como prM e é clivada em M no processo de maturação (revisado por Perera & Kuhn, 2008; revisado por Roy & Bhattacharjee, 2021).

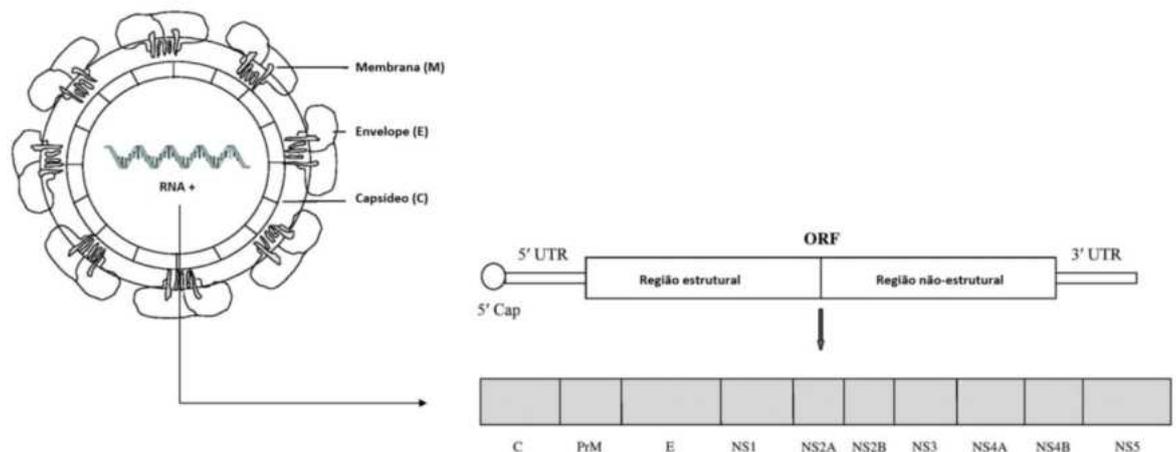


Figura 3: Estrutura do vírus da dengue (DENV). O vírus da dengue possui um genoma de RNA fita simples de polaridade positiva que codifica, a partir de uma única fase de leitura aberta (ORF), 3 proteínas estruturais: proteína de membrana (M), envelope (E) e capsídeo (C); e 6 proteínas não-estruturais: NS1, NS2A e B, NS3, NS4A e B e NS5. Fonte: adaptado de Roy & Bhattacharjee, 2021.

O DENV utiliza a sua proteína E, presente no envelope, para interagir com diversos possíveis receptores de células hospedeiras e promover a sua endocitose (Crill & Roehrig, 2001). Como exemplos de moléculas de superfície celular utilizados pelo vírus para realizar sua entrada, já foram descritos o receptor de lectina do tipo C (DC-SIGN) (Tassaneetrithep *et al.*, 2003), proteoglicanos de heparam-sulfato (HSPGs) (Chen *et al.*, 1997; Dalrymple & Mackow, 2011), CD14 (Chen, Wang & King, 1999), complexos proteicos de chaperonas como HSP70/90 (Reyes-Del Valle *et al.*, 2005), receptores de manose (Miller *et al.*, 2008) e outros. Dessa forma, o vírus pode infectar células de diferentes sítios do organismo (revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015).

O processo de internalização viral pela célula hospedeira é classicamente descrito como endocitose mediada por clatrina (Acosta, Castilla & Damonte *et al.*, 2008). Após a sua entrada, a fusão do DENV depende da acidificação do endossoma, gerando alterações conformacionais nas proteínas E e M, a sua dissociação e a exposição do sítio de fusão de E. A fusão mediada por E leva à liberação do nucleocapsídeo para

o citoplasma, que se dissocia e libera o genoma viral (Modis *et al.*, 2004; Ge & Zhou, 2013; revisado por Cruz-Oliveira *et al.*, 2015). No citoplasma, o genoma servirá como mRNA para a produção da poliproteína, que será processada por proteases celulares e pelo domínio protease da NS3 viral, associada à NS2B (Falgout & Markoff, 1995; Bera, Kuhn & Smith, 2007; revisado por Bollati *et al.*, 2010). Posteriormente, algumas proteínas NS, como a RNA polimerase viral NS5, participam da replicação do RNA genômico (RNAG), associando-se à membrana do retículo endoplasmático (RE) e formando o complexo replicativo (Courageot *et al.*, 2000). Com a síntese de RNAG e proteínas estruturais, inicia-se o processo de montagem. Ao ser liberado do complexo replicativo, o RNAG se liga à proteína viral NS2 presente na membrana do RE, que também recruta as proteínas estruturais C-prM-E e complexo com atividade proteolítica NS2B-NS3. Então, há a associação de proteínas C com o RNAG, formando o nucleocapsídeo (NC) e a associação das proteínas E e prM, que se dissociam da NS2. Após a oligomerização de E-prM, ocorre a interação com o núcleo capsídeo, formando uma partícula viral imatura (Xie *et al.*, 2013; Xie *et al.*, 2019). Posteriormente, essa partícula passa pela rede trans-Golgi (TGN) e a modificação de pH altera a conformação do heterodímero PrM:E, expondo o sítio de clivagem de prM. A prM é clivada pela protease furina do TGN em M e peptídeo pr, gerando uma partícula viral madura e infecciosa, que é liberada por exocitose (Elshuber *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2008) (**Figura 4**).

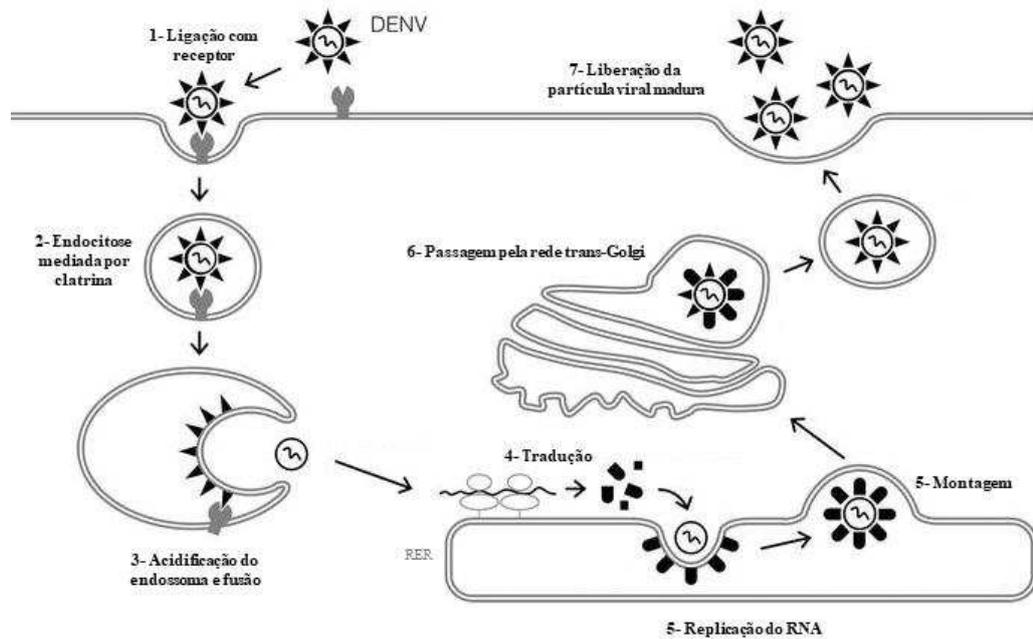


Figura 4: Ciclo replicativo do DENV. 1- O DENV utiliza sua proteína E para interagir com o receptor celular e promover sua endocitose. 2- A partícula viral é endocitada de forma dependente de clatrina. 3- A acidificação endossomal promove mudanças conformacionais na proteína E, expondo seu sítio de fusão. 4- O RNA genômico (RNAg) no citoplasma fica disponível para ser traduzido pela maquinaria celular e a poliproteína gerada é processada por proteases celulares. 5- As proteínas não estruturais (NS) recém sintetizadas atuam na replicação do RNAg e o complexo replicativo é formado associado ao retículo endoplasmático rugoso (RER). 5- A partir dos RNAg e proteínas estruturais recém-sintetizados, ocorre a montagem da partícula viral imatura. 6- A partícula passa pela rede trans-Golgi, onde a mudança de pH expõe o sítio de clivagem de prM, que é clivada pela protease furina, gerando uma partícula madura. 7- Ocorre a liberação da progênie viral. Fonte: adaptado de Takahashi & Suzuki.

1.3. Manifestações clínicas da dengue

A maioria dos pacientes com dengue são assintomáticos ou desenvolvem quadros brandos e autolimitados (Endy *et al.*, 2002; OMS, 2023). O período de incubação é de 4-7 dias e a doença pode ser classificada em 3 fases: febril, aguda e convalescência. Na fase febril (2-7 dias), o paciente geralmente apresenta febre alta de início súbito, mialgia, cefaleia e erupções cutâneas. Nesta fase é difícil diferenciar clinicamente a dengue de outras doenças febris. Já durante a fase aguda (24-48 horas), podem ocorrer alterações vasculares e coagulativas, como o aumento do hematócrito e trombocitopenia, o que, em altos níveis, está associado à progressão da doença para a forma grave (Kalayanarooj *et al.*, 1997; World Health Organization, 2009).

Atualmente, a dengue é classificada em dengue com ou sem sinais de alerta e dengue grave. Essa classificação, estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) e vigente desde 2009, auxilia a prever durante a fase aguda quais pacientes podem progredir para a forma grave da doença. Dessa forma, o tratamento adequado pode evitar que esses pacientes desenvolvam condições clínicas mais graves. Para ser

classificada em dengue com sinais de alerta, além dos sintomas clássicos descritos anteriormente, os pacientes devem apresentar alguma das seguintes manifestações: dor ou enrijecimento abdominal, vômito persistente, sangramento em mucosas, letargia, hepatomegalia e trombocitopenia. Esses casos requerem observação e intervenção médica (World Health Organization, 2009).

Os pacientes que desenvolvem dengue grave apresentam extravasamento de plasma intenso, o que pode causar choque hipovolêmico e efusão pleural, gerando estresse respiratório. Além disso, estudos clínicos já descreveram a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CID), levando ao consumo dos fatores de coagulação sanguíneos, o que, junto à trombocitopenia, pode levar à hemorragia (Srichaikul *et al.*, 1977; Nurnaningsih *et al.*, 2022; OMS, 2009). Menos frequentemente, pode haver ainda o comprometimento de diversos órgãos, como falência hepática aguda, cardiomiopatia e encefalite (OMS, 2009; revisado por Muller, Depelsenaire & Young, 2017).

1.4. Patogênese do vírus da dengue

A gravidade da doença causada pelo DENV é multifatorial. Diversos fatores do hospedeiro influenciam na susceptibilidade à infecção e podem estar relacionados a piores prognósticos, como polimorfismos genéticos (Silva *et al.*, 2010; Whitehorn *et al.*, 2013), idade (Gamble *et al.*, 2000) e doenças crônicas pré-existentes (Bravo, Guzmán & Kouri, 1987; Limonta *et al.* 2008). Além disso, certos genótipos podem ser associados a casos graves de dengue, demonstrando a influência de fatores virais na patogênese (Halsey *et al.*, 2012; Figueiredo *et al.*, 2008).

A infecção se inicia após a picada do mosquito do gênero *Aedes*, com inoculação do vírus na corrente sanguínea e infecção de células residentes do local, como macrófagos, células de Langerhans (células dendríticas residentes da derme) e queratinócitos da derme (Wu *et al.*, 2000; Limon-Flores *et al.*, 2005; Kyle, Beatty & Harris, 2007). A migração das primeiras células imunes infectadas para os linfonodos contribui para a disseminação do vírus através do sistema linfático e estabelecimento da viremia. Na corrente sanguínea, as principais células infectadas pelo DENV são monócitos e células dendríticas (Kou *et al.*, 2008; Flipse *et al.*, 2016). Outros tipos celulares, como hepatócitos e células endoteliais também são permissivos à infecção e alvos importantes, como será explorado posteriormente (Avirutnan *et al.*, 1998). De fato, após a disseminação sistêmica, o DENV é capaz de alcançar diversos órgãos, e

antígenos e RNA viral já foram detectados em autópsias de diferentes tecidos, como fígado, baço e rins (Couvelard *et al.*, 1999; Jessie *et al.*, 2004).

A resposta imune do hospedeiro possui grande papel na patogênese da dengue, sendo responsável por grande parte dos sinais clínicos observados. Citocinas pró-inflamatórias como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 (IL-1) e IL-6 já foram descritas como aumentadas no plasma de pacientes com dengue, principalmente em formas graves da doença (Hober *et al.*, 1993; Azeredo *et al.*, 2001; Bozza *et al.*, 2008). *In vitro*, já foi visto que linfócitos TCD4⁺ ativados na infecção produzem IL-2 e TNF- α (Gagnon, Ennis & Rothman, 1999). Esses mediadores, principalmente o TNF- α , contribuem para a lesão e permeabilidade endotelial (Martin *et al.*, 1988; Weinberg, 1988; Suttitheptumrong *et al.*, 2021). Além disso, a própria infecção e ativação de células endoteliais contribui para as disfunções vasculares vistas na dengue, como será discutido mais adiante.

A indução de apoptose em células infectadas já foi demonstrada e sugerida como fator contribuinte para a patogênese do vírus. Limonta e colaboradores (2007) mostraram a presença de antígenos virais e células apoptóticas em tecidos do fígado, intestino, cérebro e da microvasculatura pulmonar em um estudo *post mortem*. A indução de apoptose de células endoteliais microvasculares pela infecção com DENV também já foi descrita *in vitro* e pode estar envolvida no extravasamento de plasma observado durante a doença (Avirutnan *et al.*, 1998).

Fatores de virulência do DENV também contribuem para a manifestação da doença. A proteína viral não estrutural 1 (NS1), é secretada por células infectadas (Flamand *et al.*, 1999), e já foi reportada como associada à degradação de componentes do sistema complemento (Avirutnan *et al.*, 2010) e à indução de permeabilidade vascular (Pan *et al.*, 2021). Essa proteína carrega lipídios, tendo uma composição similar a lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Gutsche *et al.*, 2011), possivelmente interferindo na cascata de coagulação e sendo capaz de se associar à superfície de células endoteliais através de glicosaminoglicanos (GAGs) (Avirutnan *et al.*, 2007).

1.5. Cascatas de coagulação sanguínea

A hemostasia, equilíbrio entre coagulação sanguínea e fibrinólise, é um processo regulado por sistemas proteolíticos sanguíneos, que garantem o funcionamento ideal da coagulação sanguínea. Em contextos de lesão, a secreção do fator de von Willebrand (VWF) pelas células endoteliais no local de injúria e a exposição de componentes da

matriz subendotelial, como colágeno, laminina e fibronectina, promovem a ativação e agregação plaquetária. Contribuindo para o processo, plaquetas ativadas secretam grânulos ricos em fatores pró-coagulantes, como polifosfato, e inibidores da fibrinólise, como o inibidor de ativação do plasminogênio tipo 1 (PAI-1) (Revisado por Sang *et al.*, 2021).

Além da agregação e ativação plaquetária, o processo de formação do coágulo depende da formação de fibrina, a qual pode ser iniciada através das duas vias de coagulação, extrínseca ou intrínseca. A via extrínseca de coagulação é disparada pela lesão endotelial, com a exposição de células que expressam fator tecidual (TF), como fibroblastos da matriz subendotelial e células do músculo liso. O TF quando exposto à corrente sanguínea, interage com o fator VII (FVII) e o ativa, tornando-o capaz de ativar o fator X (FX) (revisado por Osterud & Bjorklid, 2012). Ao mesmo tempo, a via intrínseca de coagulação também é ativada nesse contexto e alimenta esse sistema. Essa via, também chamada de via de contato, tem a sua ativação dependente do contato do seu fator inicial, o fator XII (FXII), com moléculas negativamente carregadas. Sendo assim, a exposição de colágeno negativamente carregado da matriz subendotelial e secreção de polifosfato por plaquetas ativadas pós injúria tecidual é capaz de ativar FXII, que sofre autoclivagem e libera fator XIIa (FXIIa) (van der Meijden *et al.*, 2009; White-Adams *et al.*, 2015; Verhoef *et al.*, 2017). Assim, o FXIIa desencadeia uma cascata proteolítica sucessiva, com a ativação dos fatores FXI, FIX e, finalmente, FX. Portanto, ambas vias de coagulação convergem para a ativação do fator X em fator Xa, responsável por realizar a conversão de protrombina em trombina, que por sua vez converte fibrinogênio em fibrina (Revisado por Pryzdial *et al.*, 2018) (**Figura 5**).

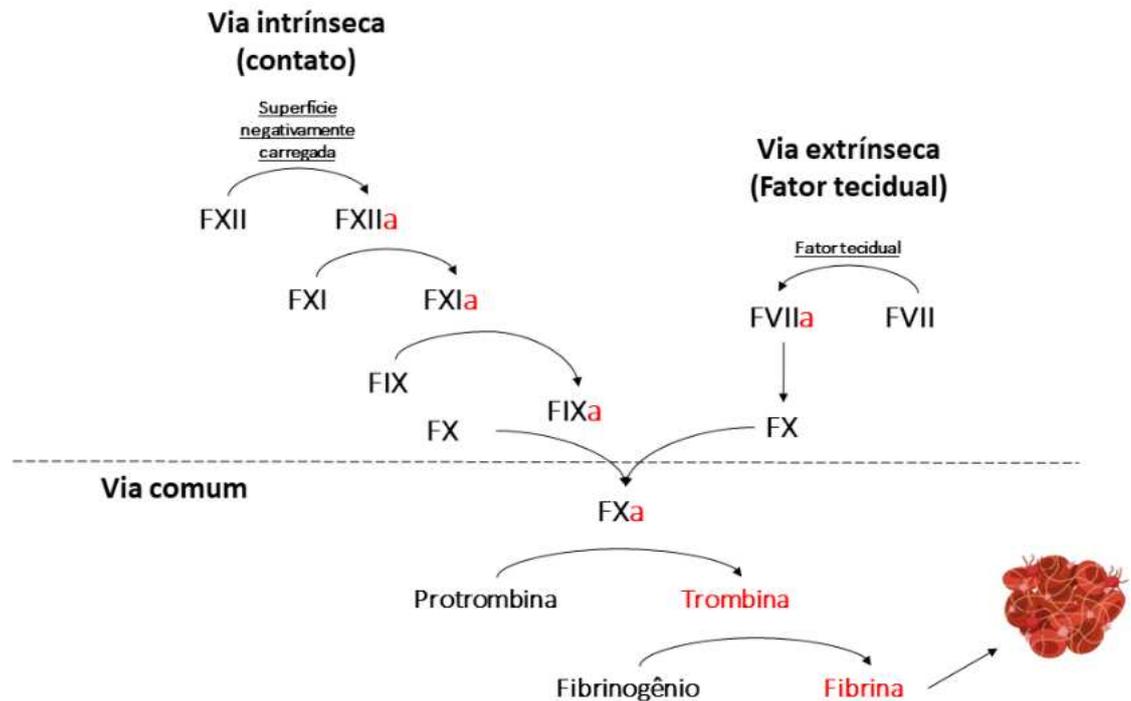


Figura 5: Vias intrínseca e extrínseca de coagulação sanguínea. A via intrínseca, ou via de contato, se inicia quando o fator XII (FXII) entra em contato com uma superfície negativamente carregada, como colágeno da matriz subendotelial exposta, e sofre autoclivagem, gerando FXIIa e desencadeando uma cascata proteolítica que resulta na ativação de FX. Já a via extrínseca é iniciada quando o fator tecidual interage com o fator VII (FVII), levando à sua ativação em FVIIa, que por sua vez ativa FX. Dessa forma, ambas vias convergem em uma via comum, com a formação de FX ativado (FXa), o qual converte protrombina em trombina, que transforma fibrinogênio em fibrina.

1.6. O sistema calicreína-cinina (KKS)

A ativação da via de contato pode levar, ainda, à estimulação do sistema calicreína-cinina (*kallikrein-kinin system*, KKS). Esse consiste em uma cascata proteolítica que culmina na formação de cininas vasoativas. A ativação de FXII e da via de contato, portanto, integra a coagulação e a inflamação, estando intimamente relacionada à patogênese de doenças tromboinflamatórias. Os fatores envolvidos nessa via são sintetizados majoritariamente pelo fígado e ficam disponíveis no plasma sanguíneo, sendo eles o fator XII (FXII) e a pré-calicreína (PK), que circula associada com seu cofator, o cininogênio de alto peso molecular (HK) (Renné *et al.*, 2005; revisado por Maas & Renné, 2018).

Na ativação desse sistema, o FXII sofre autoclivagem, gerando FXIIa, ao entrar em contato com superfícies negativamente carregadas. *In vivo*, podemos citar exemplos como colágeno da matriz subendotelial exposta, DNA e RNA e polifosfatos (Verhoef

et al., 2017; revisado por Björkqvist *et al.*, 2014). *In vitro*, moléculas negativamente carregadas, como dextran sulfato (DXS) e caolina, são capazes de mimetizar esse processo (Van der Graaf *et al.*, 1982; Fujiyoshi, Hayashi & Oh-ishi, 1989). Na via intrínseca da coagulação, o FXIIa leva à ativação sucessiva de outros fatores coagulativos, resultando na formação de fibrina. Porém, no contexto inflamatório, o FXIIa induz a clivagem de PK, havendo a formação de calicreína plasmática (PKa), que é responsável por clivar o HK, o cofator da PK, assim liberando a bradicinina (BK) (Ivanov *et al.*, 2017; revisado por Joseph & Kaplan, 2005; revisado por Maas & Renné, 2018) (**Figura 6**). Outro mecanismo de ativação do KKS pode ocorrer mediado pela fosfatidilserina expressa por células apoptóticas. Yang e colaboradores (2014) demonstraram que HK é capaz de se ligar à fosfatidilserina, criando uma plataforma para sua clivagem e ativação (HKa) na presença de PK e resultando na liberação de bradicinina (Yang *et al.*, 2014).

A bradicinina e seus metabólitos bioativos, como a Des-Arg⁹-BK, funcionam como peptídeos vasoativos. A Des-Arg⁹-BK e a BK são agonistas fisiológicos dos respectivos receptores: B1R, regulado positivamente em contextos inflamatórios, e B2R, expresso constitutivamente, com ampla distribuição em diferentes tecidos (revisado por Regoli *et al.*, 1998; Prado *et al.*, 2002). Ao sinalizar através desses receptores acoplados à proteína G (GPCRs), a BK e seus subprodutos causam aumento da produção de óxido nítrico (NO), permeabilidade vascular, hipotensão, edema, dor e febre, que também são sintomas característicos de quadros de dengue, como visto anteriormente (Regoli *et al.*, 1989; Kalayanarooj *et al.*, 1997).

O KKS é regulado fisiologicamente principalmente pelo inibidor de C1-esterase (C1Inh), uma serpina reguladora também do sistema complemento, capaz de inativar o FXIIa e a PK (Schreiber, Kaplan & Austen, 1973; Han *et al.*, 2002). A deficiência de C1Inh e a produção de C1Inh disfuncional causam angioedema hereditário (HAE) 1 e 2, respectivamente, cuja fisiopatologia envolve a ativação exacerbada do KKS com produção descontrolada de BK, gerando sintomas de hiperinflamação. Além da reposição de C1Inh, o tratamento de HAE pode ser feito com administração do antagonista do receptor B2, icatibanto (HOE-140) (revisado por Patel & Pongracic, 2019).

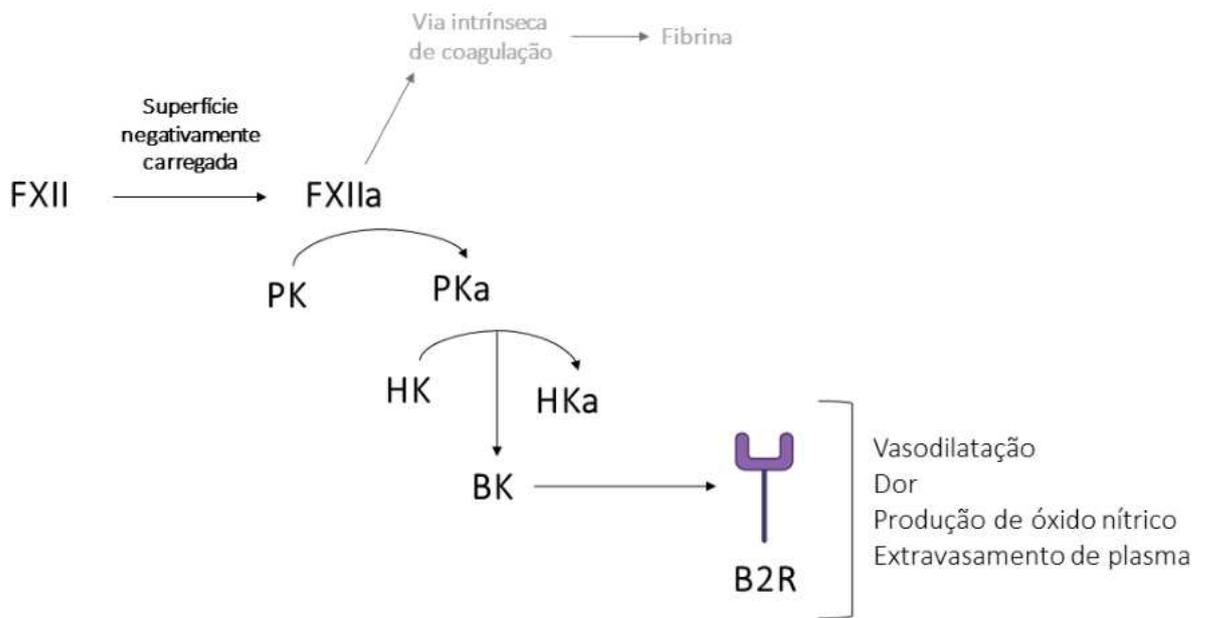


Figura 6: Cascata proteolítica do sistema caliceína-cinina (KKS). Ao entrar em contato com uma superfície negativamente carregada, o fator XII (FXII) sofre autoclivagem, gerando FXIIa, que pode tanto dar início à via intrínseca de coagulação sanguínea quanto desencadear a ativação do sistema caliceína-cinina. O FXIIa leva à clivagem da pré-caliceína (PK) em caliceína plasmática (PKa), a qual cliva seu cofator, cininogênio (HK), liberando o peptídeo vasoativo bradicinina (BK). A BK sinaliza através de seu receptor preferencial, B2R, e gera os efeitos de vasodilatação, dor, produção de óxido nítrico e extravasamento de plasma.

1.7. O endotélio vascular e as disfunções coagulativas na dengue

O endotélio vascular é formado pelas células endoteliais, associadas por junções oclusivas e aderentes. Ele funciona como barreira entre a vasculatura e os tecidos adjacentes, controlando a passagem de moléculas, células e líquido para órgãos e tecidos. A infecção de células endoteliais pelo DENV já foi descrita em estudos *post mortem*, através da autópsia do endotélio vascular do fígado, pulmão, coração e cérebro (Ramos *et al.*, 1998; Jessie *et al.*, 2004; Salgado *et al.*, 2010). *In vitro*, diversos modelos de células endoteliais já foram descritos permissivos ao DENV, sugerindo essas células como alvos da infecção (Avirutnan *et al.*, 1998; Azizan *et al.* 2006; Arévalo *et al.*, 2009; Conceição *et al.*, 2013).

Como visto até aqui, a infecção pelo DENV impacta direta e indiretamente na função da barreira endotelial. A infecção de células imunes contribui para a permeabilidade vascular através da liberação de citocinas e mediadores vasoativos. No entanto, a própria infecção e ativação de células endoteliais possui um papel nesse contexto. As células endoteliais infectadas também secretam mediadores inflamatórios e vasoativos, expressam mais moléculas de adesão, como ICAM-1 e VCAM-1, e sofrem

apoptose, contribuindo para a lesão endotelial (Anderson *et al.*, 1997; Avirutnan *et al.*, 1998; Conceição *et al.*, 2013). Também já foi visto que a infecção das células endoteliais pode contribuir para a permeabilidade induzindo a redistribuição das junções intercelulares aderentes e oclusivas e levando ao rearranjo do citoesqueleto celular (Kanlaya *et al.*, 2009; Dalrymple e Mackow, 2012).

Além de controlar a passagem de fluidos e solutos, o endotélio também está envolvido na regulação da coagulação e fibrinólise, através da expressão de fatores pró ou anti-coagulativos (revisado por Danese, Dejana & Fiocchi, 2007). Dessa forma, essas células tem participação ativa na regulação da hemostase, expressando prevalentemente fatores anti-coagulativos em condições normais. Porém, esse equilíbrio pode ser afetado em infecções pela ativação e lesão do endotélio, o que favorece a expressão de TF pelas células endoteliais, ativador da via extrínseca de coagulação sanguínea (revisado por Osterud & Bjorklid, 2012). Nesse sentido, já foi visto que pacientes com dengue podem apresentar alterações nos parâmetros de coagulação e fibrinólise. Análises mostraram disfunções coagulativas como trombocitopenia, prolongação do tempo necessário para formação de coágulo (tempo de tromboplastina parcial ativado- APTT) e aumento da expressão de enzimas do sistema proteolítico, como tPA (ativador de plasminogênio tecidual), em pacientes com dengue grave. Esses parâmetros podem indicar fibrinólise aumentada e inibição de vias de coagulação (Huang *et al.*, 2001; revisado por Chuan *et al.*, 2013). Por outro lado, já foi visto aumento de TF no soro de pacientes na fase aguda da doença, sugerindo aumento de processos pró-coagulativos, como demonstrados pelos casos de CID (Srichaikul *et al.*, 1977; Sosothikul *et al.*, 2007). Sendo assim, é evidente que as células endoteliais contribuem de diferentes formas para a patogênese da dengue e as vias de coagulação sanguínea podem ser afetadas de diferentes formas nesse contexto, porém os mecanismos por trás desses fenômenos ainda precisam ser melhor elucidados.

1.8. Dengue e KKS

Sabe-se que o KKS é ativado e contribui para a patologia de diferentes infecções virais. Por exemplo, Taylor e colaboradores (2013) demonstraram que a infecção de células endoteliais por hantavírus leva à ativação do KKS e permeabilidade mediada por BK (Taylor *et al.*, 2013). Dados anteriores gerados pelo nosso grupo mostraram que a infecção de células de microvasculatura cerebral humana (HBMECs) pelo vírus Sindbis (SINV) leva à superexpressão de receptores de bradicinina (B2R) e a adição de

BK inibe a morte celular e favorece a replicação viral (Rust *et al.*, 2012). Na dengue, já foi descrita a diminuição dos níveis de FXII, PK e BK em pacientes com diferentes formas da doença (Edelman *et al.*, 1975; Tsai *et al.*, 2013). Além disso, reguladores fisiológicos do KKS já foram vistos aumentados em pacientes com a forma grave da doença (Albuquerque *et al.*, 2009).

Recentemente, o nosso grupo contribuiu descrevendo o consumo dos fatores do KKS no plasma de pacientes com dengue em diferentes fases da doença, indicando que há a ativação do sistema durante a doença. Também vimos que a infecção de HBMECs pelo DENV é favorecida quando há adição de BK no sistema, por mecanismos que dependem de diminuição da produção de NO e retardo na indução de morte celular (Coelho *et al.*, 2021). No entanto, ainda há muito a ser elucidado sobre a relação do KKS com a dengue, tendo em vista que não há estudos sobre os possíveis mecanismos que podem levar à sua ativação nesse contexto. Além disso, os efeitos da BK na permeabilidade endotelial durante a infecção ainda precisam ser explorados. Portanto, diante dos efeitos fisiológicos das cininas na modulação da permeabilidade vascular e em processos inflamatórios, nosso grupo tem investigado o papel e os mecanismos de ativação do sistema caliceína-cinina na patogênese da dengue.

2. JUSTIFICATIVA

A doença causada pelo vírus da dengue é caracterizada por disfunções coagulativas e aumento da permeabilidade vascular, contribuindo para o extravasamento de plasma nos pacientes. Através de um estudo *ex vivo*, nosso grupo demonstrou que há ativação do KKS na infecção pelo DENV, o que foi evidenciado pelo consumo de FXII e HK em plasmas coletados de pacientes. Além disso, também demonstramos que a infecção de células endoteliais pelo DENV regula positivamente a expressão de receptores de bradicinina (B2R), além da adição de BK em culturas aumentar a replicação viral (Coelho *et al.*, 2021). Esses resultados prévios sugerem que a geração de bradicinina pode ter um papel importante para o sucesso da infecção e nas suas consequências fisiológicas. Sendo assim, hipotetizamos que o sistema caliceína-cinina pode estar intimamente relacionado à patogênese desse vírus. No entanto, ainda não foi descrito qual é o mecanismo de ativação do KKS durante a infecção e qual o papel do endotélio nesse processo. Assim, ainda não se sabe quais células e moléculas que podem ser capazes de disparar a via durante a infecção pelo DENV. Além disso, a ação da bradicinina no endotélio durante a infecção pelo DENV ainda precisa ser melhor elucidada, buscando compreender o

seu papel nas alterações vasculares observadas na doença, particularmente, na permeabilidade vascular.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivos gerais

Investigar se a infecção de células de microvasculatura cerebral humana (HBMECs) com DENV leva à ativação do sistema caliceína-cinina, qual o mecanismo de ativação e se a bradicinina gerada afeta a permeabilidade vascular nesse contexto.

3.2. Objetivos específicos

- 3.2.1.** Avaliar se a infecção de HBMECs pelo DENV induz a ativação do sistema caliceína-cinina.
- 3.2.2.** Investigar o papel da indução de apoptose e da expressão da fosfatidilserina na ativação do sistema caliceína-cinina.
- 3.2.3.** Avaliar o papel da bradicinina na modulação da integridade da barreira de células endoteliais na infecção pelo DENV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção de plasma

Amostras de sangue de doadores não identificados foram obtidas no Serviço de Hemoterapia do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). O sangue foi centrifugado a 500 g por 30 minutos, sem freio, para obtenção do plasma sanguíneo. O protocolo do estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética Experimental da UFRJ (Número de Permissão: 105/07).

4.2. Linhagens celulares

As condições de cultivo de células livres de micoplasma foram constantemente certificadas pela verificação de DNA citoplasmático por microscopia de fluorescência, utilizando 1,5 µg/mL de DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, Santa Cruz Biotechnology) como marcador, e por PCR, com oligonucleotídeos para detecção de micoplasmas, como previamente descrito por Freshney (2005). Foi utilizado 100 µg/mL de gentamicina para suplementar todos os meios, a fim de evitar contaminações bacterianas.

4.2.1. HBMEC

A linhagem celular HBMEC (Células de microvasculatura cerebral humana), gentilmente cedidas pelo Dr. Dennis J. Grab (The John Hopkins University, Baltimore, MD, EUA), foi cultivada em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) de alta glicose (Life Technologies, Grand Island, NY) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB-Invitrogen). As células foram mantidas na estufa a 37°C em ambiente úmido e 5% de CO₂ em injeção, na concentração de 10⁶ células/mL e passadas 2 vezes por semana.

4.2.2. C6/36

Células glandulares de mosquitos *A. albopictus* clone C6/36 (ATCC-CLR1660), gentilmente cedidas pela Dra. Andrea T. Da Poian (Instituto de Bioquímica Médica, UFRJ), foram cultivadas em meio Leibovitz (L-15) (Life Technologies) suplementado com 0,3% de fosfato de triptose, 0,75% de bicarbonato de sódio, 0,2% de L-glutamina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO), além de 10% de SFB e 0,2 mM de aminoácidos não essenciais (Baktron Microbiologia). As células foram mantidas em incubadoras BOD (Biolab) a 28°C, na concentração de 10⁶ células/mL e passadas 3 vezes por semana.

4.2.3. BHK-21

Células de rim de hamster bebê (BHK-21 [C-13]; ATCC® CCL-10™) foram cultivadas em Meio Essencial Mínimo Alpha (α -MEM) (Invitrogen) suplementado com 2,09 g de NaCl, 2,4 g de HEPES e 5% SFB. As células foram mantidas em estufa a 37°C em ambiente úmido e 5% de CO₂ em injeção, na concentração de 10⁶ células/mL e passadas 3 vezes por semana.

4.3. Vírus

A cepa asiática do DENV-2 16.681 (GenBank M29095) foi propagada em linhagem celular C6/36. Os sobrenadantes de células infectadas ou não foram coletados, filtrados e armazenados a -80°C. Os sobrenadantes de células não infectadas (Mock) foram utilizados como controle. O título do estoque de DENV foi determinado por ensaio de plaque em células BHK, como descrito a seguir (4.4).

O vírus da dengue inativado (iDENV) foi obtido após exposição à radiação ultravioleta por 2 horas e a inativação foi confirmada por ensaio de plaque em células BHK-21 e qRT-PCR.

4.4. Titulação do estoque viral por ensaio de plaque

As células BHK foram cultivadas em placas de 24 poços na concentração de 4×10^4 células por poço, contendo 500 μ l de meio DMEM de alta glicose suplementado com 5% de SFB, e incubadas *overnight* para adesão completa. No dia seguinte, o meio metabolizado foi removido e as células foram lavadas com PBS 1x e foram cultivadas com 200 μ L de diluições seriadas na base 10 de amostras de DENV-2 cepa 16.681 (200 μ L/poço), em meio DMEM de alta glicose sem SFB. Após 90 minutos, o sobrenadante foi removido, as células foram novamente lavadas com PBS 1X e foi adicionado 1,5% carboximetilcelulose (CMC- Sigma Aldrich) em 1 mL de DMEM de alta glicose suplementado com 2% de SFB.

A placa foi incubada em estufa a 37°C com injeção de 5% de CO₂ por 5 dias e, após esse período, foram fixadas com formaldeído 4% *overnight*. Posteriormente, as células foram coradas com cristal violeta 1% diluído em 20% de metanol por 1 hora, seguido de lavagem com água corrente. Os plaques formados foram contados e os títulos virais foram calculados, utilizando-se a fórmula: n° de plaques x diluição x 5, e o resultado expresso na unidade de PFU/mL.

4.5. Infecção de HBMECs

As HBMECs foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) em 500 μ L de DMEM de alta glicose contendo 10% de SFB em placas de 24 poços (Cellstar) e incubadas *overnight* para adesão completa. Após esse período, as células foram lavadas com 200 μ L de meio DMEM de alta glicose sem SFB e infectadas com DENV-2 cepa 16.681 com título $2,5 \times 10^6$ PFU/mL e na multiplicidade de infecção (MOI) de 1. Alternativamente, as células foram incubadas com o sobrenadante de células C6/36 não infectadas (Mock) ou DENV inativado por UV (iDENV) em volume proporcional ao volume de vírus utilizado. As células foram incubadas por 90 minutos na estufa a 37°C, realizando agitação da placa de 15 em 15 minutos para facilitar a adsorção viral. Então, os sobrenadantes foram retirados e as células foram lavadas duas vezes como anteriormente e em seguida cultivadas em 500 μ L do mesmo meio suplementado com 10% de SFB.

Como previamente descrito pelo nosso grupo (Conceição *et al.*, 2013), em 48 horas após infecção (h.p.i.) observa-se o pico de replicação do DENV nessa linhagem celular. Então, nesse momento da infecção, as células foram lavadas e tratadas com plasma humano ou com fatores purificados do KKS, como descrito a seguir (4.6).

4.6. Avaliação da ativação de elementos do sistema calicreína-cinina em culturas de HBMECs infectadas com DENV

4.6.1. Ensaios utilizando plasma humano

Após 3 lavagens com DMEM sem SFB, as células foram incubadas por 1 hora a 4°C com 200 µL de DMEM contendo 2% de SFB, 25% de plasma humano inativado (iPN) ou 25% de plasma humano (PN), de acordo com o desenho experimental. Todas as condições foram feitas na presença de 50 µM de Zn²⁺.

Posteriormente, os sobrenadantes foram coletados, as células foram lavadas como anteriormente e recolhidas em 100 µL/poço de tampão de lise RIPA (10 mM de Tris-HCl pH 7,5, 5 mM de EDTA pH 8,9, 150 mM de NaCl, 1% de triton X-100) juntamente com um coquetel de inibidores de protease (IP-1 mM PMSF, 5 µg/mL aprotinina e 5 µg/mL leupeptina).

Como controle positivo de clivagem do HK, foram utilizados PNs tratados por 1 hora a 4°C com 20 nM de dextran sulfato (DXS), um polissacarídeo aniônico sintético conhecido por ativar o KKS (Van der Graaf *et al.*, 1982).

4.6.2. Ensaios utilizando proenzimas purificadas do sistema calicreína-cinina

Como controle de ativação do KKS em fase fluida, diferentes combinações de 50 nM de HK, PK e FXII foram diluídos em tampão HEPES Tyrode gelatina (HTG) (0,135 M NaCl, 2,7 mM NaHCO₃, 0,36 mM NaH₂PO₄, 14,7 mM HEPES, 100 mg/mL dextrose e 0,1% gelatina, pH 7,35) (Hasan, Zisman & Schmaier *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001) e incubados a 4°C ou 37°C por 1 hora. Como controle positivo, os 3 fatores do sistema foram incubados nas mesmas condições com caolina (10 µg/mL), molécula negativamente carregada semelhante ao DXS, igualmente capaz de ativar o sistema (Fujiyoshi, Hayashi & Oh-ishi, 1989).

Já nos ensaios em HBMECs, as células foram lavadas 3 vezes com tampão HTG e então incubadas com 50 nM de cininogênio (HK) (Enzyme Research, South Bend, EUA) com ou sem Zn^{2+} (50 μ M) em tampão HTG por 1 hora a 4 ou 37°C, como será indicado nas legendas das figuras. Em seguida, foram feitas 2 lavagens com tampão HTG e as células foram incubadas da mesma forma com 50 nM de pré-caliceína (PK) ou 50 nM de PK e fator XII (FXII) (Enzyme Research, South Bend, EUA), com ou sem Zn^{2+} . Nessa etapa, também foram adicionados na cultura 25 μ M de lisinopril (Sigma-Aldrich), inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA), capaz de transformar metabólitos ativos da bradicinina (BK) em inativos, e 100 nM de HOE-140 (Sigma-Aldrich), um antagonista de B2R, receptor preferencial para a ligação da bradicinina. Dessa forma, a BK gerada no sistema não foi perdida e poderá ser quantificada posteriormente no sobrenadante das células. Em seguida, os sobrenadantes foram coletados, as células foram lavadas 2 vezes com tampão HTG e o lisado celular recolhido em RIPA com IP. A caolina foi utilizada novamente como controle positivo de ativação do KKS.

4.7. Western blotting

A técnica de western blotting (WB) foi empregada a fim de observar e comparar o perfil de ligação e clivagem do HK nas diferentes condições experimentais.

Os extratos proteicos foram dosados pelo método de Bradford para quantificar proteínas totais. Foram utilizados 20 μ g de proteína dos lisados de HBMEC tratadas com plasma e 10 μ g de proteína dos lisados de HBMEC tratadas com os fatores purificados da via. As amostras foram preparadas em tampão de amostra (0,1% de azul de bromofenol, 50 mM de Tris-HCl (pH 6,8), 100 mM de β -mercaptoetanol, 2% de SDS e 10% de glicerol) e foram posteriormente aquecidas a 95°C por 5 minutos para completar a desnaturação.

Posteriormente, foi feita a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 8%, composto pelo gel de empacotamento (SDS 0,1%, acrilamida 5%, bis-acrilamida 0,25%, Tris-HCl 0,22 M pH 6,8, TEMED 0,04% e persulfato de amônio 0,08%) e pelo gel de separação (SDS 0,1%, acrilamida 10-15%, bis-acrilamida 0,4-0,5%, Tris-HCl 0,38 M pH 8,8, TEMED 0,02% e persulfato de amônio 0,5%). A polimerização e montagem do gel foram feitas utilizando o sistema mini-gel (Biorad), seguindo as instruções do fabricante. Como padrão de peso molecular, foi utilizado o PageRuler™

(Thermo Scientific). A eletroforese foi corrida a 90 Volts em tampão Tris-glicina, pH 8,8, contendo SDS, e a transferência para membrana de nitrocelulose foi feita *overnight*, através do sistema de transferência Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad-EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Em seguida, as membranas foram bloqueadas por 1 hora com 9% de leite desnatado Molico diluído em TBS 1x 0,1% Tween-20 (tampão de lavagem). Então, as membranas foram imunomarcadas. Como anticorpo primário foi utilizado o anticorpo monoclonal (IgG) de coelho anti-HK (Santa Cruz- 1:1000) com incubação *overnight* a 4°C, seguida por 3 lavagens de 5 minutos da membrana com tampão de lavagem. Após essa etapa, as membranas foram incubadas com anticorpo (IgG) secundário anti-IgG de coelho conjugado com uma peroxidase (KPL- 1:5000) por 1 hora em temperatura ambiente sob agitação e, posteriormente, lavadas 3 vezes por 15 minutos com o tampão de lavagem. A revelação foi feita em sala escura utilizando luminol e peróxido de hidrogênio (Pierce™ ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific). Como controle de carregamento para as amostras de lisado celular, as membranas foram marcadas posteriormente com anticorpo anti- β -actina murino (IgG) (Sigma-Aldrich- 1:30.000) e anticorpo (IgG) secundário anti-IgG murino (Sigma-Aldrich- 1:10.000) seguindo as mesmas etapas de lavagem e revelação em câmara escura.

Os filmes foram escaneados e as bandas foram quantificadas por densitometria pelo software ImageJ (ImageJ, U. S., National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, v 1.8.0 4.1). A porcentagem de clivagem foi calculada de acordo com a quantidade de HK clivado em relação à quantidade total de HK de cada amostra. A ligação de HK na superfície celular foi calculada pela relação HK total/ β -actina de cada amostra.

4.8. Avaliação da expressão e do bloqueio de fosfatidilserina por citometria de fluxo

HBMECs foram plaqueadas (3×10^5 /poço em 1,5 mL de DMEM de alta glicose contendo 10% de SFB) em placas de 6 poços (CellStar) e incubadas *overnight* para adesão celular. Então, as células foram infectadas com MOI 1 de DENV-2 por 48 horas ou tratadas com 1 μ M de estaurosporina (STS- Sigma-Aldrich) por 24 horas. As células foram tripsinizadas, centrifugadas, ressuspendidas em *binding buffer* 1X marcadas com Anexina V conjugada com FITC (BD Pharmingen™ FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II) por 20 minutos em temperatura ambiente. Nas condições de bloqueio,

as células foram previamente incubadas com Anexina V não marcada nas mesmas condições. Então, as células foram analisadas por citometria de fluxo utilizando FACScalibur para confirmar a exposição da fosfatidilserina ou o seu bloqueio. Os dados obtidos no FACScalibur foram analisados utilizando o software FlowJo (v.10.7.1; Becton Dickson Immunocytometry System; LCC, Ashland, USA).

4.9. Avaliação da ativação do KKS em HBMECs apoptóticas após bloqueio de fosfatidilserina com Anexina V

HBMECs foram plaqueadas (5×10^4 células/poço) em 500 μ L de DMEM de alta glicose contendo 10% de SFB em placas de 24 poços (Cellstar) e incubadas *overnight* para adesão. Após tratamento com 1 μ M de STS por 24hrs, as HBMECs foram incubadas com 5 μ g de Anexina V não marcada por 20 minutos com agitação da placa a cada 5 minutos em temperatura ambiente. Após isso, as HBMECs foram lavadas com PBS 1x e tratadas com as proenzimas purificadas do KKS como descrito no tópico 4.6.2. As células foram coletadas da mesma forma em RIPA com IP e o perfil de clivagem do HK foi analisado por WB.

4.10. Ensaio de Transwell

HBMECs foram cultivadas no inserto *transwell* (Corning Costar, ME, USA; membrana com poros de 0,4 μ m) na concentração de 5×10^4 células por inserto em meio DMEM com 10% de SFB. Um inserto foi mantido sem células para ser utilizado como “branco”. A resistência elétrica transendotelial (TEER) foi acompanhada diariamente com um voltímetro (Millicell ERS-2) até aproximadamente 72 horas após o plaqueamento, até as células atingirem a confluência desejada ($100 \Omega/\text{cm}^2$). Então, as células foram infectadas ou não com MOI de 1 ou 0,1 de DENV-2 cepa 16.681 ou tratadas com diferentes concentrações de BK (Sigma-Aldrich). O TEER foi medido por diferentes períodos de tempo. A concentração de 1 μ M de BK foi utilizada para observar a abertura da barreira endotelial. Para calcular o valor do TEER de cada condição, a resistência obtida no poço “branco” foi subtraída do TEER obtido nas outras condições, a fim de desconsiderar a resistência apenas da membrana, e foi calculada em Ω/cm^2 como descrito por Srinivasan e colaboradores (2016). A porcentagem de TEER (% TEER) foi calculada em relação ao maior valor atingido em cada condição.

4.11. Análise estatística

A análise dos dados foi feita no software GraphPad Prism (GraphPad Software v.8.4.0, San Diego, CA, EUA) e a análise estatística entre as condições foi realizada utilizando teste *t* ou *two-way* ANOVA (valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos), como será indicado nas legendas das figuras.

5. RESULTADOS

5.1. A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de plasma humano

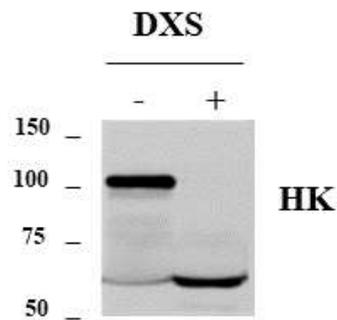
Dados anteriores do grupo evidenciaram a ativação do KKS, com clivagem de FXII e HK, nos plasmas de pacientes infectados com dengue (Coelho *et al.*, 2021). Sendo assim, nosso primeiro objetivo foi a caracterização de um modelo celular que estaria potencialmente envolvido com a ativação do KKS e a suposta geração de BK durante a infecção pelo DENV. Portanto, avaliamos a possibilidade de células endoteliais estarem envolvidas neste processo, utilizando como modelo HBMECs.

Para responder isso, testamos se HBMECs infectadas por DENV seriam capazes de reter na sua superfície mais HK derivado de plasma humano e se essa interação poderia levar a ativação do mesmo, evidenciada por sua clivagem, o que sugere liberação de BK. Como controle positivo de ativação do plasma, utilizamos dextran sulfato (DXS). As figuras **7A e B** demonstram o perfil de HK plasmático de diferentes doadores analisado por western blotting, na ausência ou presença de DXS. Em seguida, HBMECs foram tratadas com mock ou infectadas com DENV-2 (MOI=1) por 48h. As células foram então lavadas e tratadas por 1 hora a 4°C com plasma humano (PN) obtido dos doadores saudáveis A, B e C. Os mesmos plasmas inativados por calor (iPN) ou SFB foram utilizados como controles negativos da reação. Após a incubação, as células foram lavadas, os lisados celulares foram coletados e a expressão de HK foi avaliada por western blotting (**Figura 7C-E**). No experimento realizado utilizando o plasma do doador A, nas HBMECs infectadas e incubadas com PN foi possível ver consumo total do HK íntegro (~120 KDa), o qual foi convertido no fragmento de ~56 KDa, indicando sua clivagem e sugerindo liberação de bradicinina (**Figura 7C**). Como esperado, a incubação dessas células com SFB ou plasma inativado não levou à clivagem total de HK. Análises da ativação utilizando plasmas de outros doadores revelaram um certo grau de variabilidade entre os experimentos. A incubação de HBMECs infectadas com DENV com plasma B não levou a ativação da via (**Figura 7D**), enquanto a incubação

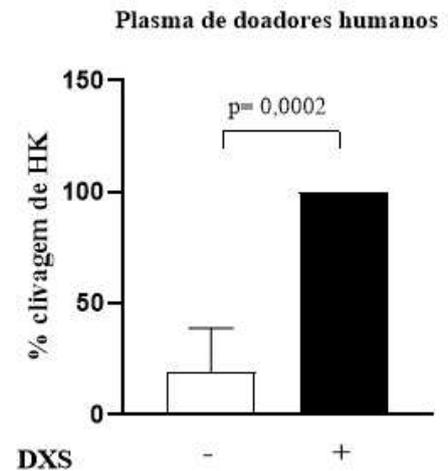
com plasma C levou a uma ativação parcial, com maior retenção de HK e maior taxa de clivagem em relação às células cultivadas com mock ou incubadas com plasma inativado (**Figura 7E**). As figuras **7F** e **G** indicam as médias de retenção e clivagem de HK dos experimentos com plasmas de diferentes doadores indicados por cor.

Em conjunto, esses achados sugerem que HBMECs ativam o KKS, no entanto, plasmas de doadores diferentes estão sujeitos a variáveis intrínsecas a cada indivíduo, tais como reguladores fisiológicos do sistema e ativação *in vivo* prévia aos estímulos, o que pode dificultar a visualização da ativação ocorrida *in vitro* e requer um número maior de doadores a fim de confirmar a hipótese.

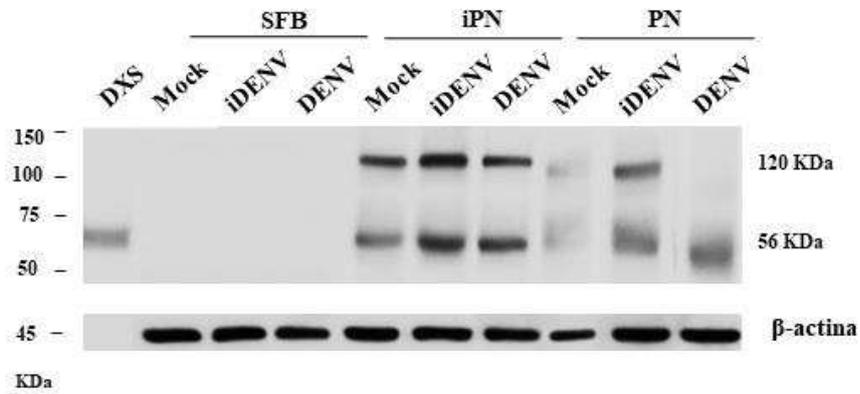
A)



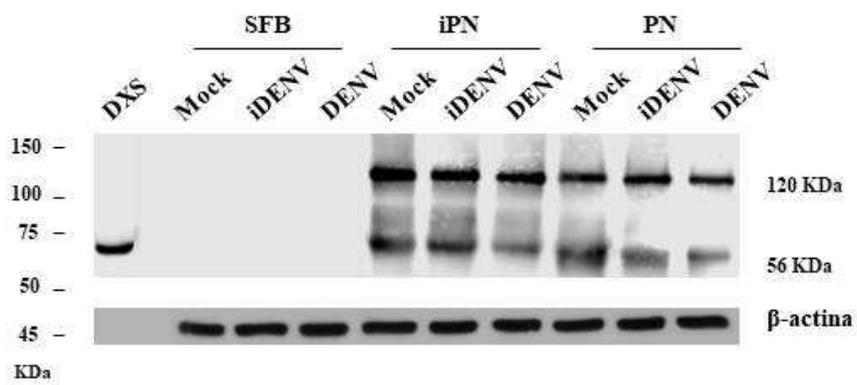
B)



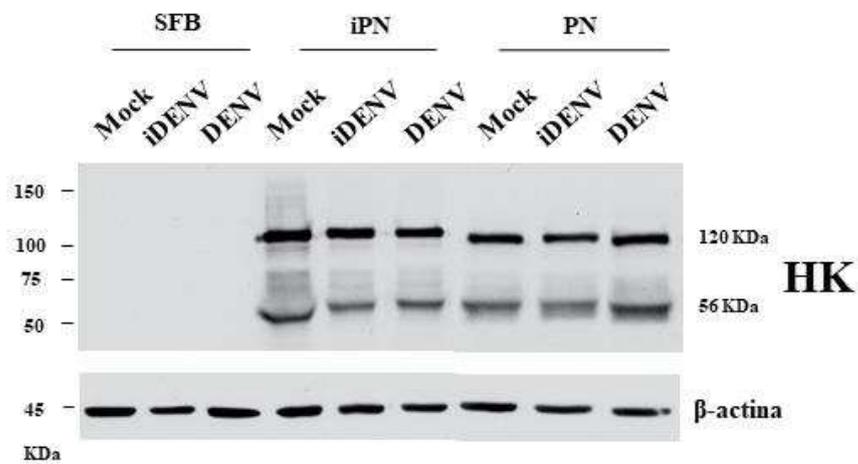
C)

Doador A

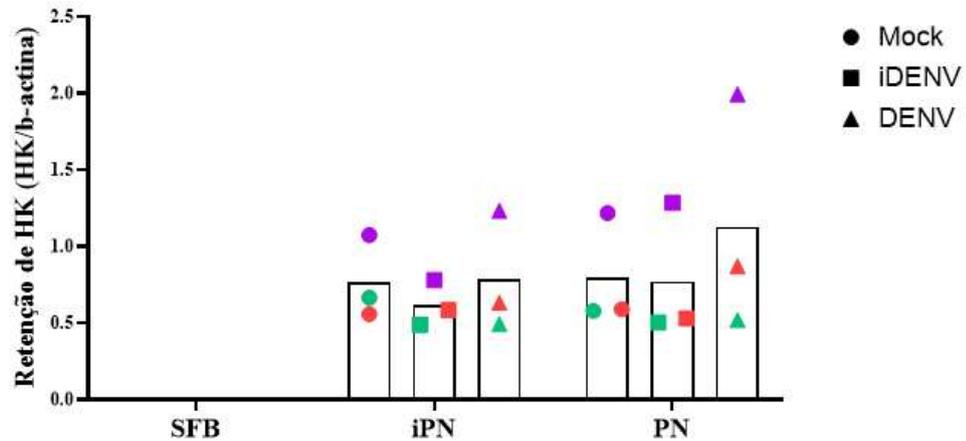
D)

Doador B

E)

Doador C

F)



G)

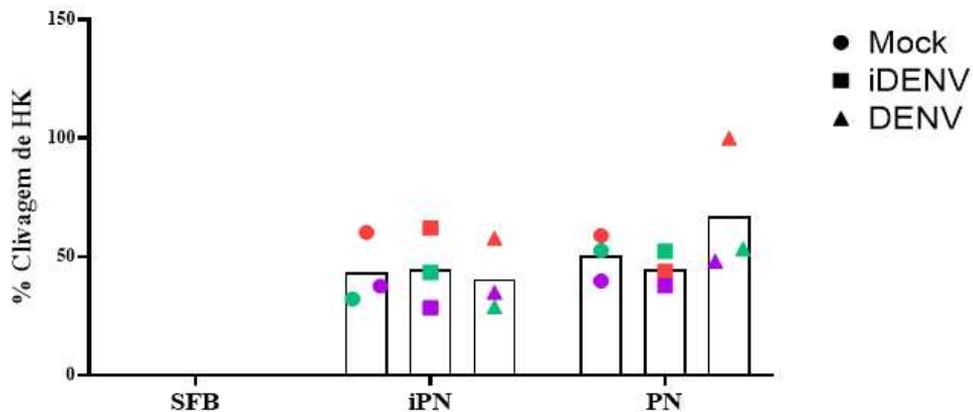


Figura 7: A infecção de células da microvasculatura cerebral humana (HBMECs) pelo DENV induz a ativação do KKS na presença de plasma humano. HBMECs foram infectadas com DENV com multiplicidade de infecção (MOI) = 1 e, em 48 horas após a infecção (h.p.i.), incubadas com plasma dos doadores saudáveis A, B e C por 1 hora a 4°C. Então, as células foram lavadas e coletadas em RIPA para análise por western blotting. A análise estatística foi realizada utilizando teste *t*. (A, B) Controle da clivagem do plasma de diferentes doadores na presença e ausência de 20 nM de dextran sulfato. N= 4. (C-E) Western blotting do perfil de clivagem e retenção de HK por HBMECs sob diferentes estímulos e na presença do plasma de diferentes doadores. (F) Quantificação da retenção de HK pelas HBMECs, calculada através da normalização de HK total pela β -actina de cada amostra. (G) Porcentagem de clivagem de HK calculada em relação ao HK total. Cada cor representa um experimento com plasma de um doador. Doador A- rosa; doador B- verde; doador C- roxo.

5.2. A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema

Diante da variabilidade nos ensaios utilizando plasmas, repetimos os experimentos utilizando apenas os fatores purificados da via (HK, PK e FXII). Para isso, os fatores foram diluídos em tampão HEPES Tyrode gelatina (HTG), o qual contém

todos os cofatores necessários para que ocorra a ligação e clivagem do HK (Hasan, Zisman & Schmaier *et al.*, 1998; Zhao *et al.*, 2001).

Antes de utilizar as proenzimas para investigar a ativação do KKS nas HBMECs infectadas, testamos diferentes condições de incubação dessas proteínas a fim de definir a condição que permitisse o menor índice de clivagem basal do HK nos nossos controles, devido à ausência de inibidores fisiológicos do sistema. Primeiro, testamos se os componentes do tampão HTG poderiam gerar a clivagem do HK por si só, tendo em mente a presença de diversos sais e íons em sua composição que poderiam influenciar na ativação da via (revisado por Long *et al.*, 2016). Os fatores do KKS foram incubados por 1 hora a 37°C em tampão HTG ou em PBS, seguido de análise do HK por WB. Vimos que, por mais que o tampão facilite a ativação, a incubação das proenzimas na ausência do tampão não impediu o consumo do HK íntegro (120 KDa) na presença de PK. Além disso, o tampão se mostrou importante para possibilitar a ativação do sistema na presença de caolina, nosso controle positivo de ativação (**Figura 8A e B**).

Em seguida, nos perguntamos se a diminuição da temperatura de incubação dos fatores de 37°C para 4°C geraria uma condição subótima de ativação. Assim, nosso objetivo era gerar uma menor ativação basal da via para facilitar a visualização da ativação induzida pela infecção das HBMECs posteriormente. Os fatores do sistema foram incubados por 1 hora a 4°C em tampão HTG, seguido da análise do perfil de clivagem do HK por WB. Porém, observamos um padrão de clivagem muito semelhante ao anteriormente descrito (**Figura 8C**).

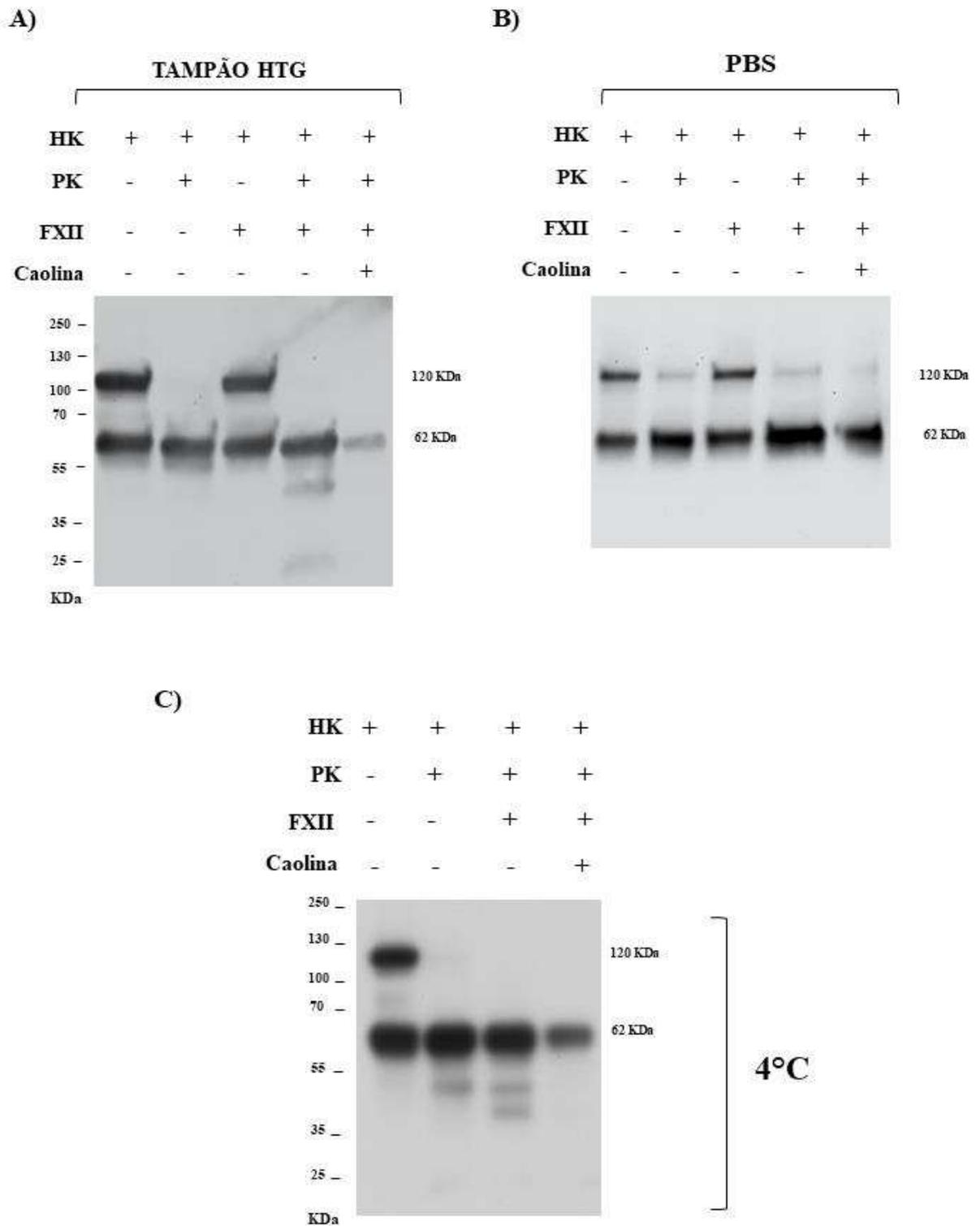
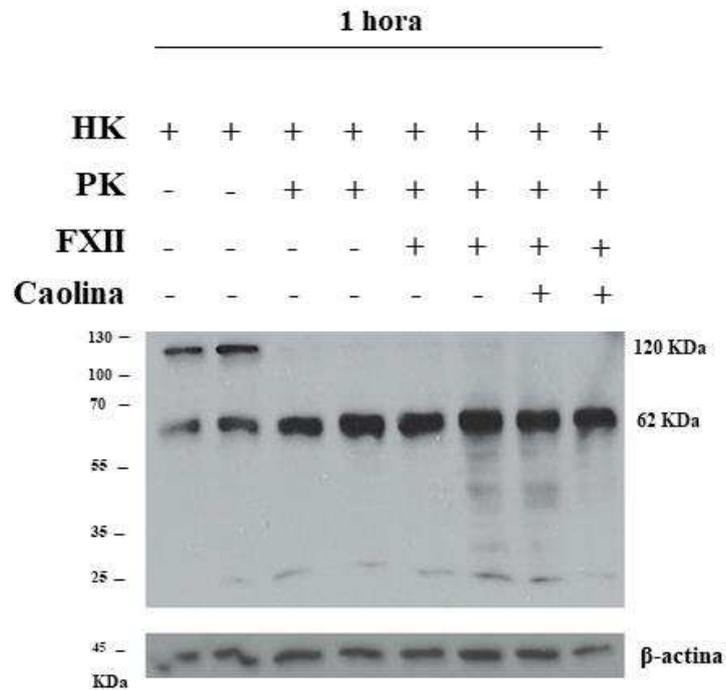


Figura 8: Controles da ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema em fase fluida. (A e B) HK, PK e FXII foram incubados em diferentes combinações diluídos em tampão HEPES Tyrode gelatina (HTG) ou em PBS, por 1 hora a 37°C. (C) HK, PK e FXII foram incubados em diferentes combinações diluídos em tampão HTG por 1 hora a 4°C.

Em seguida, testamos se a ativação do sistema estava sendo otimizada pelo excesso de HK disponível, por se tratar de uma ativação em fase fluida. Assim, incubamos as HBMECs com HK por 1 hora a 4°C em tampão HTG, retiramos o sobrenadante e realizamos duas lavagens nas células, a fim de retirar o HK não aderido às células. Foi feita uma segunda incubação nas mesmas condições com PK, com ou sem FXII. As células foram lavadas, e o lisado foi coletado para análise da expressão de HK por WB. Observamos que, por mais que o HK íntegro fosse consumido na presença de PK, bandas menores aparecem mediante ativação (**Figura 9A**). Também nos perguntamos se a diminuição do tempo de incubação de PK e FXII para 30 e 10 minutos diminuiria a clivagem basal de HK. Porém, os menores tempos de incubação não impediram o consumo do HK 120 KDa na presença de PK (**Figura 9B**).

A)



B)

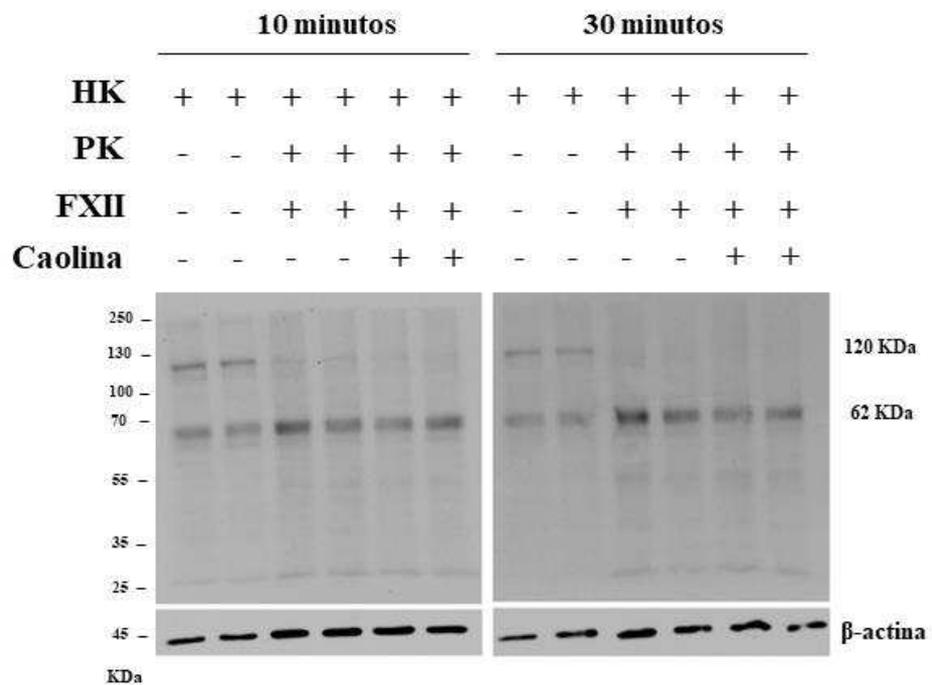


Figura 9: Controles da ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema na superfície celular. (A) As HBMECs foram incubadas com HK por 1 hora a 4°C, seguido de 2 lavagens e adição de PK e FXII por mais 1hr. (B) As HBMECs foram incubadas com HK por 1 hora a 4°C, seguido de 2 lavagens e adição de PK e FXII por 10 ou 30 minutos. Os fatores foram diluídos em tampão HTG em ambos experimentos.

A partir desses dados, chegamos à conclusão de que a incubação dos fatores por 1 hora a 4°C seria a melhor condição para avaliar o efeito da infecção das HBMECs pelo DENV na ativação da via, mesmo que ainda ocorra certa clivagem mediada apenas pela presença de PK nos controles. As HBMECs foram infectadas com MOI 1 de DENV por 48h e então, foram incubadas com HK por 1 hora a 4°C, seguido de 2 lavagens. Em seguida, adicionamos PK, com ou sem FXII, e incubamos por mais 1 hora a 4°C. As células foram lavadas, e o seu lisado foi coletado para análise da expressão de HK por WB. Como controles negativos, as células foram cultivadas com mock ou DENV inativado (iDENV); e como controle positivo, foi adicionada a caolina na cultura. Observamos que, nas células infectadas pelo DENV e posteriormente incubadas com os 3 fatores da via, ocorreu consumo tanto da forma íntegra quanto clivada do HK, sugerindo a sua degradação sucessiva, formando fragmentos de tamanho insuficiente para serem retidos durante o SDS-PAGE (**Figura 10A e B**). O mesmo padrão de clivagem foi observado na presença da caolina. É possível notar que o consumo de HK não ocorreu na presença de apenas HK e PK, indicando que o mecanismo de disparo do sistema neste caso seria dependente de FXII (**Figura 10A e B**). O HK total em cada condição foi quantificado e está representado na figura **10C**. Sendo assim, nossos dados sugerem que a infecção das HBMECs pelo DENV é capaz de levar à ativação do KKS tanto na presença de plasma, quanto dos fatores purificados da via.

Vale notar que na figura **10A** algum nível de clivagem foi observado mesmo nas condições controle, o que poderia ser facilitado pela adição de Zn^{2+} em todas as condições, já que o Zn^{2+} já foi descrito como um facilitador da ativação do sistema, sendo um cofator essencial para estabilização e retenção das proenzimas na superfície celular (Bernardo, Olson & Shore, 1993; revisado por Vu, Fredenburgh & Weitz, 2013). Portanto, nos perguntamos se a realização dos ensaios na ausência de Zn^{2+} , gerando uma condição subótima de ativação, permitiria a detecção de uma diferença maior nos níveis de ativação pelas células infectadas em relação aos controles. Embora ainda tenha sido observada alguma clivagem nos controles (o que é esperado devido à ausência de reguladores fisiológicos nesse sistema), as diferenças entre as células infectadas e não infectadas foi mais clara na ausência de Zn^{2+} (**Figura 10B**).

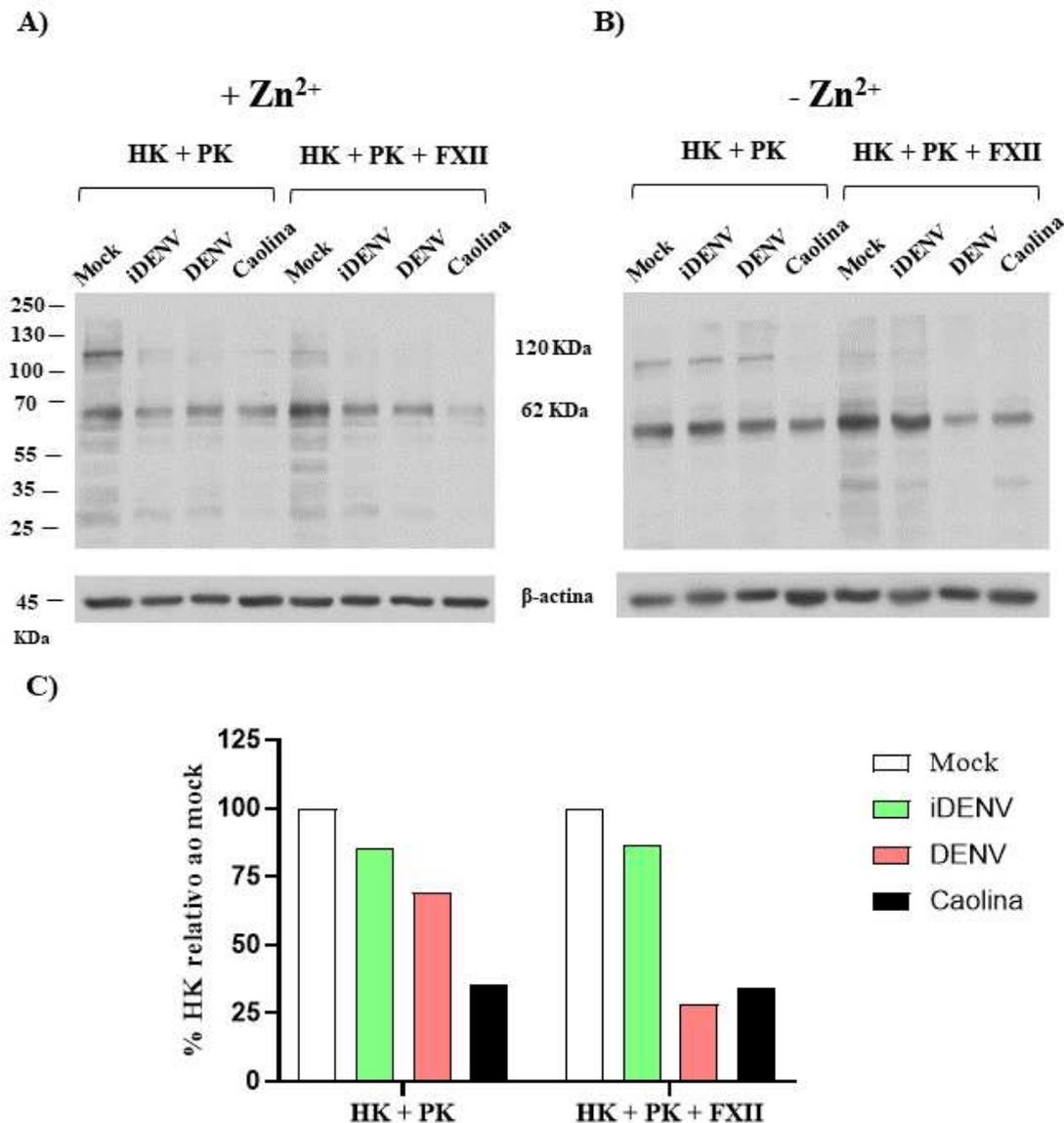


Figura 10: A infecção de HBMECs com DENV induz a ativação do KKS na presença de fatores purificados do sistema. HBMECs foram infectadas com DENV (MOI= 1) e, em 48 h.p.i., foi adicionado HK, seguido de PK com ou sem FXII, diluídos em tampão HTG. Após as incubações, as células foram lavadas e coletadas em RIPA para análise por western blotting. (A-B) Western blotting representativo do perfil de clivagem e retenção de HK pelas HBMECs sob diferentes estímulos e na presença ou na ausência de Zn²⁺. (C) Porcentagem de HK total, normalizado pela β -actina de cada amostra, relativo ao mock. Quantificação referente às condições na ausência de Zn²⁺ (B). Figura representativa de 2 experimentos independentes.

5.3. A exposição de fosfatidilserina em HBMECs apoptóticas pode levar à ativação do KKS

Sabe-se que o HK é capaz de se ligar à fosfatidilserina expressa por células apoptóticas, o que resulta na sua clivagem em fragmentos menores e bradicinina (Yang *et al.*, 2014). Assim, hipotetizamos que a retenção e clivagem aumentada de HK vista nas HBMECs infectadas poderia ser pela indução de apoptose nessas células, decorrente da infecção. Dessa forma, a retenção de HK na superfície celular pela sua adesão à fosfatidilserina geraria uma plataforma para a clivagem desse fator e geração de BK.

Como prova de conceito, primeiramente realizamos ensaios com o indutor de apoptose estaurosporina e os fatores do KKS. Para isso, primeiramente testamos o bloqueio de fosfatidilserina utilizando Anexina V não marcada. HBMECs foram incubadas com 1 μ M de estaurosporina (STS) por 24 horas, a fim de induzir a exposição da fosfatidilserina na membrana celular. As células foram, então, incubadas com 10 μ g de Anexina V não marcada em *binding buffer* por 20 minutos em temperatura ambiente, para em seguida serem incubadas da mesma forma com Anexina V-FITC. As células foram analisadas por citometria de fluxo e o bloqueio se mostrou eficiente (**Figura 11**).

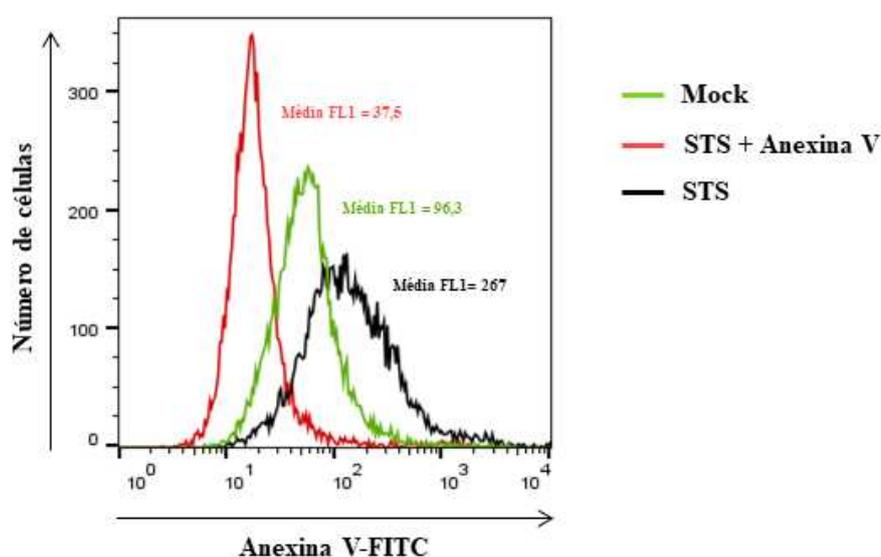


Figura 11: Anexina V é eficaz em bloquear a fosfatidilserina induzida pelo tratamento com estaurosporina (STS). As HBMECs foram tratadas por 24 horas com 1 μ M de STS para indução de apoptose e incubadas ou não por 20 minutos com Anexina V. Em seguida, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e analisadas por citometria de fluxo para avaliação da exposição e do bloqueio de fosfatidilserina. Média de FL1 está representada na figura.

Sendo assim, utilizamos o mesmo método de bloqueio da fosfatidilserina, previamente à incubação das HBMECs com as proenzimas purificadas da via. Pela análise por WB, foi visto que o tratamento com a STS foi capaz de levar à degradação de HK íntegro retido na superfície celular, o que não foi visto na ausência do tratamento com STS ou na presença da anexina V. Além disso, a clivagem de HK vista aqui foi dependente de FXII, assim como visto por nós nas HBMECs infectadas (**Figura 10**). Esse resultado indica que a exposição de fosfatidilserina pode ser um mecanismo pelo qual células infectadas apoptóticas podem levar à ativação do KKS (**Figura 12A e B**).

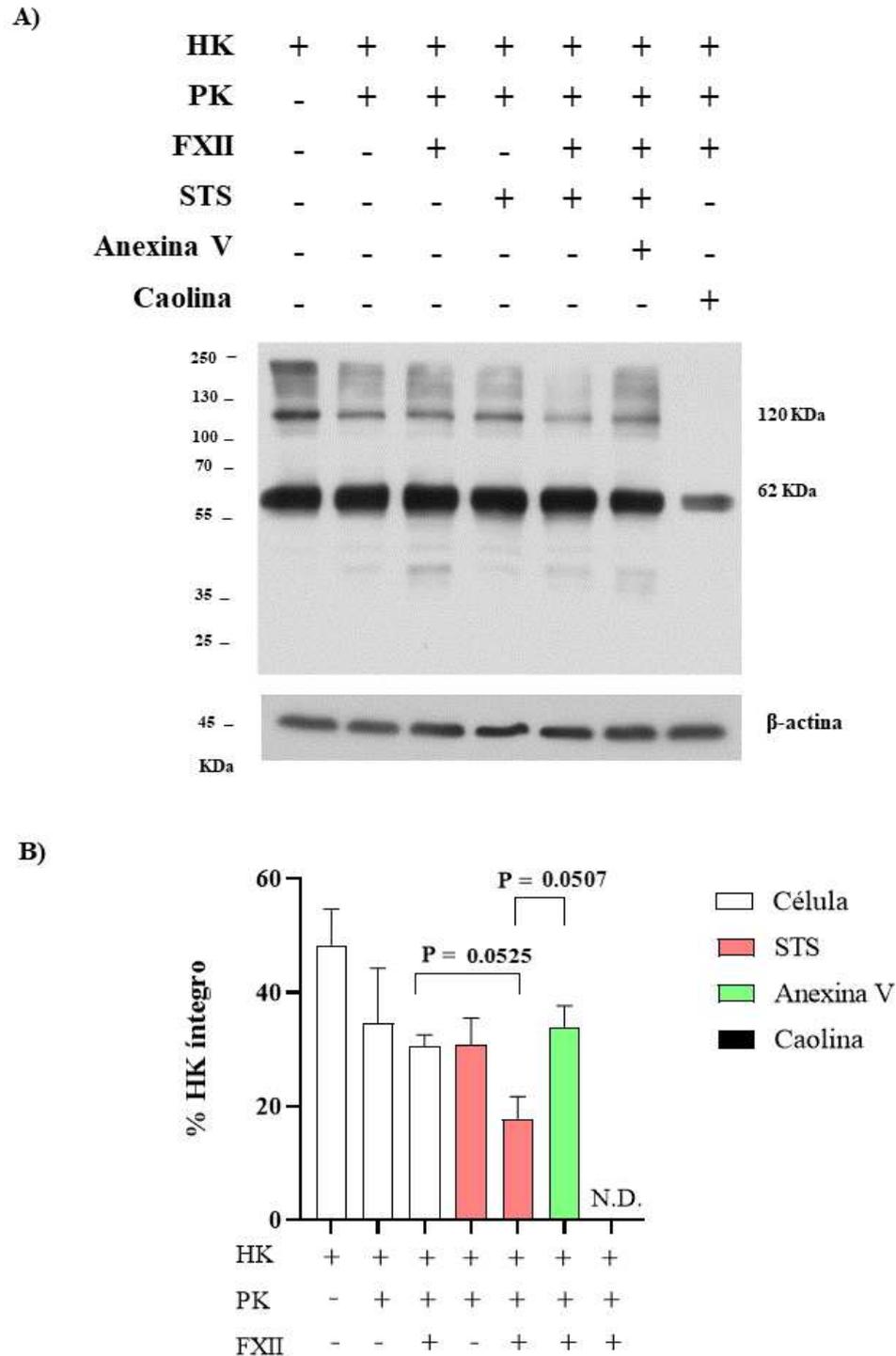


Figura 12: A exposição de fosfatidilserina por HBMECs apoptóticas é capaz de levar à ativação do KKS. As HBMECs foram tratadas por 24 horas com 1 μ M de STS para indução de apoptose e incubadas ou não por 20 minutos com Anexina V. Em seguida, as células foram incubadas com HK, PK e/ou FXII e posteriormente lavadas e coletadas em RIPA para análise por WB. **(A)** Western blotting do perfil de clivagem de HK retido nas HBMECs **(B)** Porcentagem de HK íntegro (120 kDa), calculada em relação ao HK total. A análise estatística foi realizada utilizando teste *t*. Valores de *p* estão representados na figura. N=1. Experimento realizado em duplicata.

5.4. HBMECs apresentam fosfatidilserina de membrana exposta em 48 h.p.i.

Em seguida, decidimos explorar se a exposição de fosfatidilserina poderia ser o mecanismo por trás da ativação do KKS em HBMECs infectadas com DENV no momento de 48 h.p.i., observada por nós nos primeiros experimentos. Como indicativo disso, analisamos a exposição de fosfatidilserina por HBMECs nesse momento da infecção. As células foram infectadas com MOI de 1 ou tratadas com mock e incubadas ou não com anexina V recombinante não marcada. Em seguida, marcamos todas as células com anexina V conjugada com FITC e observamos através de citometria de fluxo que HBMECs, em 48 h.p.i., de fato apresentam mais fosfatidilserina exposta do que células tratadas com mock. Além disso, o bloqueio de fosfatidilserina com anexina V não marcada em células infectadas se mostrou eficiente (**Figura 13**). Portanto, para confirmar a hipótese, planejamos infectar as células e, em 48 h.p.i., tratá-las com anexina V previamente à adição de HK, PK e FXII. Dessa forma, esperamos que ocorra a diminuição da ligação e clivagem de HK na superfície celular após o bloqueio de fosfatidilserina. Além disso, inibidores de apoptose ainda serão adicionados aos experimentos para confirmação dos dados.

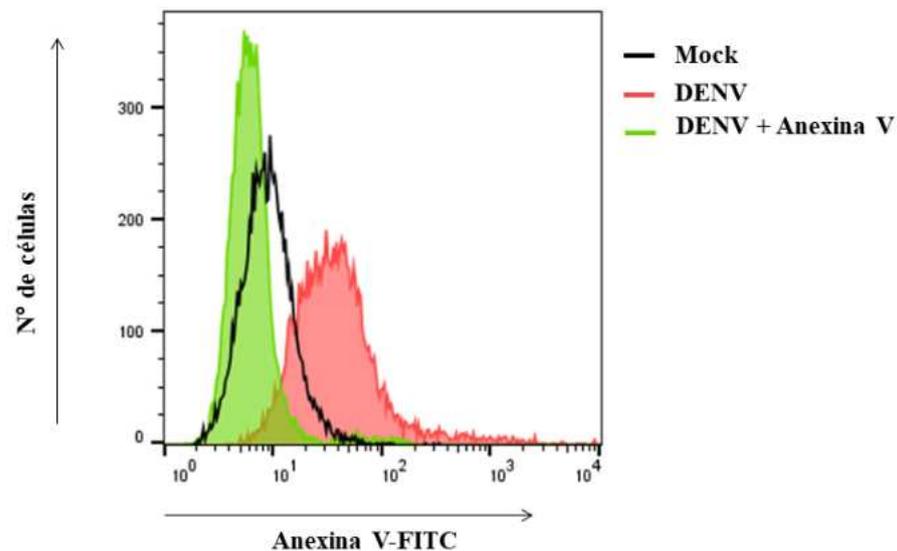


Figura 13: HBMECs infectadas com DENV apresentam fosfatidilserina exposta em 48 h.p.i., a qual pode ser bloqueada com Anexina V. HBMECs foram infectadas com DENV (MOI=1) ou tratadas com mock e, em 48 h.p.i., foram incubadas ou não com 10 µg de anexina V recombinante por 20 minutos. Em seguida, todas as células foram incubadas com anexina V conjugada com FITC e a exposição de fosfatidilserina foi analisada por citometria de fluxo. N= 1.

5.5. A infecção de HBMECs com DENV leva à reversão da abertura da barreira endotelial mediada por BK

A BK é um indutor clássico de NO, sendo um dos mecanismos pelo qual esse peptídeo induz aumento da permeabilidade vascular ao sinalizar por B2R (Palmer, Ferrige & Moncada, 1987; Kuhr *et al.*, 2010). No entanto, em um estudo previamente publicado, vimos que a adição de BK em HBMECs infectadas com DENV leva à

diminuição da produção intracelular de NO, o que foi revertido pela adição de HOE-140 na cultura. Por outro lado, também demonstramos que HBMECs infectadas pelo DENV superexpressam B2R (Coelho *et al.*, 2021). Dessa forma, nos perguntamos como essas células infectadas respondem à BK no contexto da permeabilidade vascular. Inicialmente, acompanhamos o efeito de diferentes concentrações de BK e de diferentes MOIs de infecção sobre a permeabilidade das HBMECs, individualmente, acompanhando a resistência elétrica transendotelial (TEER) de culturas estimuladas ao longo do tempo (**Figura 14A, B**). Nós observamos que ambas as concentrações de BK testadas (1 μ M e 100 nM) levaram à redução da resistência a partir de 4 horas de tratamento, indicando abertura da barreira endotelial, a qual se manteve estável até 72 horas de tratamento (**Figura 14A**). Ao testarmos diferentes MOIs de DENV, observamos que os MOIs de 1 e 0,1 levaram ao decaimento do TEER apenas a partir de 48 h.p.i (**Figura 14B**).

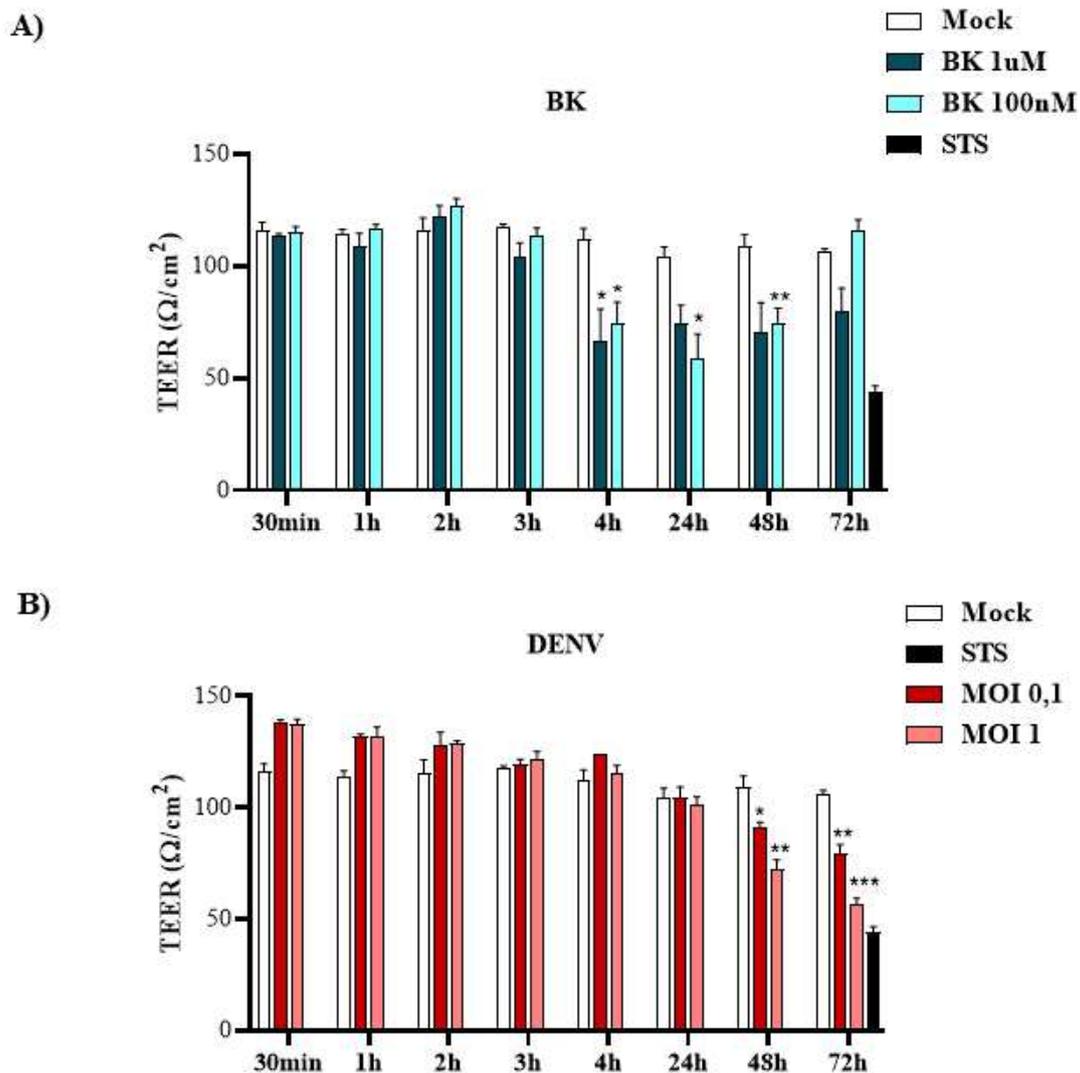
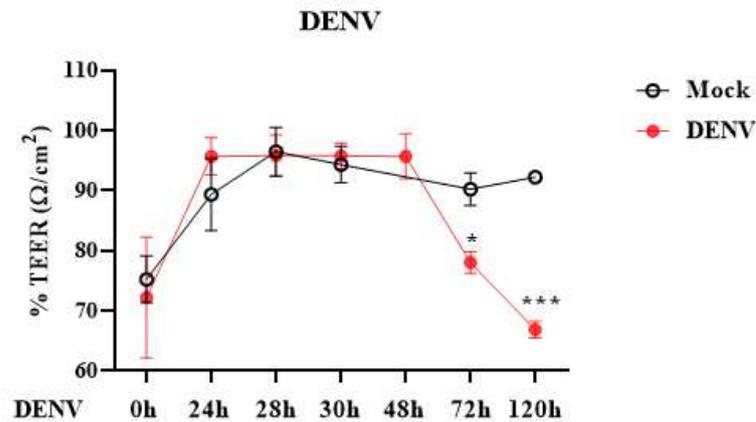


Figura 14: Curva temporal de resistência elétrica transendotelial (TEER) em células tratadas com BK ou infectadas com DENV. HBMECs foram plaqueadas em insertos *transwell* e tratadas com BK ou infectadas com DENV e TEER foi medida nos tempos indicados. **(A)** Curva temporal de TEER em HBMECs estimuladas com diferentes concentrações de BK em diferentes tempos. **(B)** Curva temporal de TEER em HBMECs infectadas com diferentes MOIs de DENV. STS foi utilizada como controle positivo de indução de permeabilidade. N= 1. Experimento realizado em monoplicata, com 3 medições de TEER em cada ponto temporal. A análise estatística foi realizada utilizando *two-way* ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

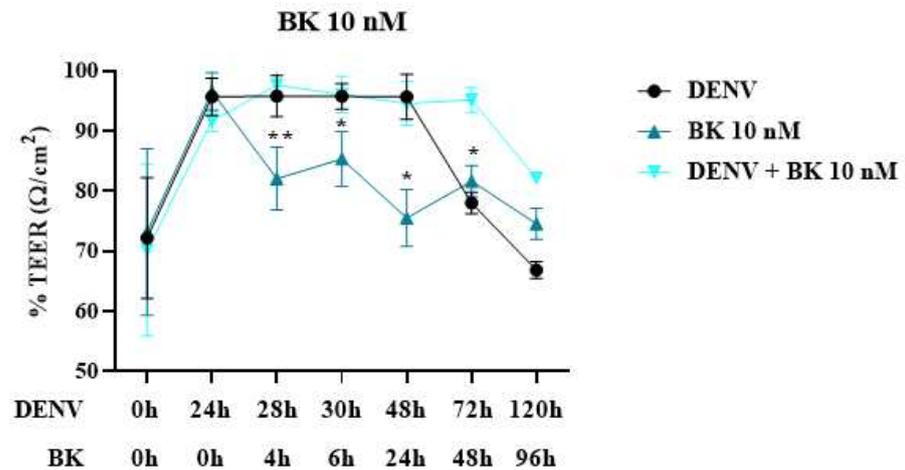
Diante dos dados preliminares indicando que a infecção com DENV induzia aumento de expressão de B2R, tornando as células mais responsivas a BK, em seguida, avaliamos se a adição de BK sobre HBMECs previamente infectadas potencializaria seu efeito sobre a permeabilidade endotelial. Nesse ensaio, HBMECs infectadas com MOI de 1 de DENV apresentaram perda de TEER apenas em 72 h.p.i. (**Figura 15A**). O tratamento das células com 10nM de BK levou à abertura da barreira endotelial a partir de 4 horas (**Figura 15B**), enquanto que o tratamento com 100nM de BK reduziu o TEER a partir de 6 horas, com pico em 24 horas (**Figura 15C**). De forma interessante, células

infectadas e tratadas com BK 10 ou 100 nM não apresentaram redução significativa do TEER até 72 h.p.i., em período mais tardio do que aquele induzido por BK ou DENV individualmente (**Figura 15B e C**). Esses dados sugerem que a infecção por DENV protege as células da permeabilidade induzida por BK, possivelmente devido à menor produção de NO e retardo da apoptose após tratamento com BK em HBMECs infectadas (Coelho *et al.*, 2021).

A)



B)



C)

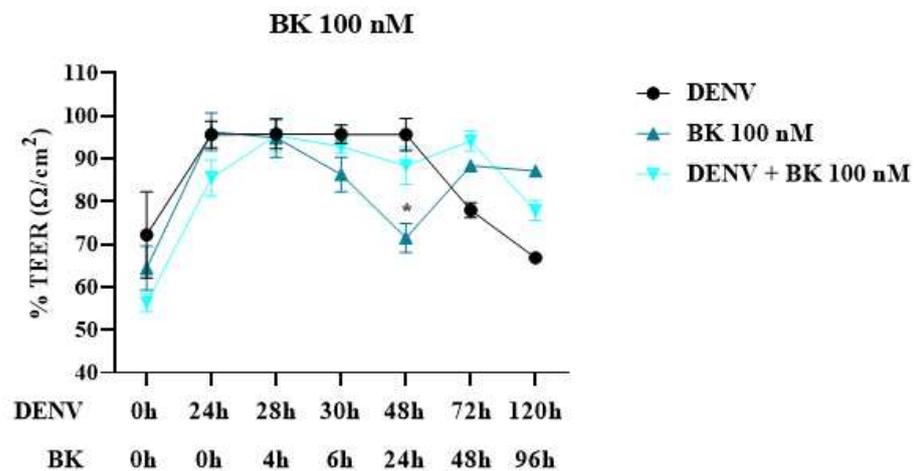


Figura 15: Curva temporal de porcentagem TEER (% TEER) em HBMECs infectadas e/ou estimuladas com 10 nM ou 100 nM de BK. (A) HBMECs foram tratadas com mock ou infectadas com MOI de 1 e o TEER foi acompanhado nos tempos indicados. (B e C) HBMECs foram infectadas com MOI 1 e tratadas ou não com 10 ou 100 nM de BK, e o TEER foi acompanhado nos tempos indicados. A % TEER foi calculada em relação ao maior valor de TEER obtido em cada condição. Gráficos representam N=2 experimentos independentes, realizados em monocultiva, com 3 medições de TEER em cada ponto temporal. A análise estatística foi realizada utilizando *two-way* ANOVA. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

6. Discussão

Disfunções coagulativas são desencadeadas por infecções virais de diferentes etiologias, desde viroses hemorrágicas, como a dengue, até viroses respiratórias, como a COVID-19, associada à ocorrência de eventos trombogênicos (Ackermann *et al.*, 2020; Wichmann *et al.*, 2020). Sendo assim, a relação entre sistemas de coagulação e infecções virais vem sendo cada vez mais discutida. Portanto, o estudo do sistema caliceína-cinina pode ser uma ferramenta para entender melhor a relação entre alterações na hemostasia e o combate a infecções, tendo em vista a sua íntima relação tanto com a coagulação sanguínea quanto com a inflamação (revisado por Maas & Renné, 2018).

Estudos sobre o papel da ativação do KKS em infecções virais ainda são insipientes, porém existem relatos de ativação desse sistema ou de modulação da expressão de receptores de BK durante infecções por diferentes vírus, como hantavírus, DENV, SINV e Sars-CoV-2. (Rust *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2013; Coelho *et al.*, 2021; Martens *et al.*, 2021). Taylor e colaboradores demonstraram que a clivagem de HK ocorre na superfície de células endoteliais (HUVECs) infectadas com hantavirus, de forma semelhante ao que observamos na superfície de HBMECs infectadas com DENV (Taylor *et al.*, 2013). Os autores ainda demonstraram que essa clivagem está associada à maior geração de bradicinina e que a adição de HK, PK e FXII purificados em culturas infectadas promove o aumento da permeabilidade das células endoteliais, o que é revertido na presença de inibidores de FXII e PKa e de HOE-140, antagonista de B2R. Dessa forma, imaginamos que a ativação do KKS vista nesse presente estudo também pode estar associada à permeabilidade vascular observada na dengue. Para explorar isso, experimentos de *transwell* são uma ferramenta útil para observar se células infectadas com DENV e na presença dos fatores do KKS apresentam maior permeabilidade do que aquela causada apenas pelo DENV. Dessa forma, ainda é possível adicionar o antagonista de B2R na cultura, HOE-140, e confirmar o papel de BK na indução de permeabilidade. Além disso, a quantificação de BK nos sobrenadantes das culturas em que observamos a clivagem de HK também seria valiosa para confirmar a geração desse peptídeo.

Já demonstramos em um estudo previamente publicado que FXII e HK se encontram majoritariamente clivados no plasma de pacientes com dengue em diferentes fases da doença (Coelho *et al.*, 2021). Porém, agora observamos que as células endoteliais podem desempenhar um papel para que isso ocorra. Vimos que utilizando plasma ou proenzimas purificadas como fonte dos fatores do KKS, as células endoteliais infectadas pelo DENV induzem a ativação do sistema, evidenciada pela clivagem de HK e suposta liberação de BK. De forma esperada, utilizando o plasma humano, obtivemos alguma variação entre experimentos, considerando a individualidade de cada sistema biológico. Entretanto, ainda observamos que utilizando plasma de 2 dos 3 doadores, a clivagem de HK ocorreu de forma mais visível nas condições de células infectadas, por mais que ainda seja possível observar alguma clivagem nos controles. Confirmando esse resultado, observamos em 2 experimentos independentes utilizando fatores purificados do KKS, o maior consumo de HK retido na superfície de células infectadas. Porém, a clivagem de HK nesse sistema se mostrou diferente, sem os reguladores fisiológicos do KKS naturalmente presentes no plasma humano, como C1Inh. Trabalhos estudando a proteólise de HK mostram que a sua clivagem pela PKa resulta na liberação de um HK composto por duas cadeias, uma cadeia

leve e uma pesada, além da bradicinina. Enquanto o HK íntegro possui peso molecular de aproximadamente 120 KDa, cada cadeia liberada após clivagem apresenta aproximadamente 62 KDa, a cadeia leve podendo ainda ser degradada até fragmentos menores de aproximadamente 56 KDa (Schiffman, Mannhalter & Tyner, 1979; Reddigari & Kaplan, 1988). Isso está de acordo com o padrão de clivagem que observamos em nossos testes de incubação das proenzimas purificadas, nos quais observamos que a adição de PK no sistema gerava o consumo da banda de ~120 KDa e aparecimento do HK de ~62 KDa, enquanto a adição de FXII no sistema potencializava a reação com o aparecimento do HK ~56 KDa em fase fluida. Essas reações foram favorecidas quando as proenzimas foram incubadas em tampão HEPES Tyrode gelatina, de forma que o tampão se mostrou necessário para a atividade de FXII, já que na sua ausência não observamos a geração de HK 56 KDa em nenhuma condição. Além disso, a falta dos componentes do tampão também impediu a ativação do sistema pela caolina, um silicato ativador de FXII. Por outro lado, vimos que a temperatura de incubação não influenciou na proteólise de HK, que manteve o mesmo padrão em 37°C ou 4°C. Na superfície celular, esses dados se mostraram consistentes e a clivagem de HK na presença de PK e FXII manteve o mesmo padrão. Também vale notar que o tamanho de 56 KDa não é o menor fragmento que foi detectado em nossos experimentos, podendo ainda haver a sua clivagem sucessiva em tamanhos menores na superfície celular. Isso pode explicar por que na presença do nosso controle positivo de ativação, caolina, observamos o consumo do HK 62 KDa sem a presença de bandas de menor peso molecular. Com forte estímulo ativador, a clivagem sucessiva do HK pode formar fragmentos ainda menores, provavelmente não retidos pelo nosso gel, assim como visto por nós com o HK retido em HBMECs infectadas com DENV. Ao comparar nossos dados com outros dados utilizando esse mesmo sistema de proenzimas purificadas na literatura, outros grupos também observaram a ativação do sistema com padrão semelhante de clivagem de HK (Zhao *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2013).

Diversas moléculas aniônicas já foram descritas como possíveis ativadores do KKS *in vivo*, algumas derivadas da ativação de células do sistema imunitário, evidenciando a relação desse sistema com os mecanismos de defesa inatos. Heparina secretada por mastócitos ativados e DNA de redes extracelulares liberadas por neutrófilos (NETs) são exemplos de moléculas negativamente carregadas que podem levar à ativação de FXII (revisado por Björkqvist *et al.*, 2014). Em células endoteliais, os mecanismos de ativação de FXII são melhor descritos no contexto de iniciação da coagulação. Por exemplo, a exposição de colágeno e laminina da matriz subendotelial, graças à lesão e morte celular, é capaz de ativar FXII, o que é importante para disparo de via intrínseca de coagulação. Porém, no contexto de infecção, poucos estudos exploram os mecanismos de ativação do FXII e do KKS. No entanto, um estudo feito por Yang e colaboradores mostrou que o HK é capaz de se ligar à fosfatidilserina de células apoptóticas e a incubação dessas células com plasma é suficiente para levar à produção de BK. Assim, eles sugerem que a membrana de células apoptóticas é uma superfície de ativação do KKS no plasma (Yang *et al.*, 2015). Trabalhos *in vitro* e análises de tecidos *post mortem* já mostraram que a infecção pelo DENV é capaz de induzir apoptose em suas células alvo, incluindo células endoteliais (Avirutnan *et al.*, 1998; Limonta *et al.*, 2007). Sendo assim, hipotetizamos que a infecção de HBMECs com DENV induz apoptose, com consequente exposição de fosfatidilserina, a

qual serve como plataforma para a adesão de HK na superfície celular e facilitando clivagem por PKa. Observamos que, de fato, a infecção de HBMECs pelo DENV induz apoptose, e no momento da infecção em que observamos a ativação do KKS, essas células possuem fosfatidilserina exposta em sua membrana. Também observamos nos experimentos de ativação do sistema, com plasma do doador C, que as HBMECs infectadas apresentaram maior retenção de HK em sua superfície, o que poderia ser proporcionado pela sua ligação com a fosfatidilserina. Sendo assim, até aqui nossos dados sugerem que a infecção das células endoteliais induz apoptose, com exposição de fosfatidilserina, a qual é capaz de levar à ativação do KKS. Para confirmar esse mecanismo, ainda é necessário realizar ensaios para observar se a retenção de HK e a ativação do KKS em HBMECs infectadas é dependente de fosfatidilserina. Para isso, é possível bloquear a fosfatidilserina com anexina V após a infecção e analisar a ligação e clivagem de HK na superfície celular. Ensaios adicionando inibidores de apoptose às células infectadas também serão valiosos para determinar se, de fato, a indução de apoptose é essencial para a ativação de KKS. Além disso, ainda pretendemos adicionar apenas HK purificado após a incubação com anexina V em HBMECs infectadas, a fim de avaliar se a retenção de HK é facilitada pela fosfatidilserina.

A ação da BK na indução de permeabilidade através da sinalização de seus receptores é bem descrita (Regoli *et al.*, 1989). Sendo assim, nos perguntamos como a BK gerada após a ativação do KKS em células endoteliais infectadas agiria no próprio endotélio. Em artigo prévio do nosso grupo, vimos que a infecção de HBMECs com DENV leva à superexpressão de receptores B2, tornando-as mais responsivas à BK (Coelho *et al.*, 2021). Dessa forma, nossa primeira hipótese era que sinalização por BK no endotélio seria amplificada em células infectadas, potencializando a permeabilidade celular mediada por esse peptídeo. Curiosamente, descobrimos que HBMECs infectadas e tratadas com BK apresentam menor permeabilidade do que as células apenas infectadas ou tratadas. No estudo anterior, havíamos demonstrado que HBMECs infectadas e tratadas com BK produzem menos NO do que células apenas infectadas ou tratadas separadamente, assim como a morte celular é retardada, favorecendo a produção de novas partículas virais, de forma B2R-dependente (Coelho *et al.*, 2021). Uma vez que a infecção pelo DENV leva à produção de NO e causa morte celular, e que esses eventos podem estar contribuindo para a perda de integridade e abertura da monocamada, é possível que o retardo na indução de permeabilidade em células infectadas e tratadas com BK se deva à modulação da geração de NO e inibição da viabilidade celular observados anteriormente. Essa hipótese pode ser testada utilizando fármacos inibidores da via de produção de óxido nítrico, como o inibidor da óxido nítrico sintase L-NMMA, e doadores de NO, como SNAP. O efeito da BK sobre a permeabilidade de células endoteliais podem ainda ser confirmados *in vivo*, tendo em vista que já observamos que o tratamento com HOE-140 reduz a carga viral no cérebro em um modelo de neuroinfecção de camundongos Balb/c com DENV (Coelho *et al.*, 2021). Assim, é possível utilizar o mesmo modelo de infecção e tratamento com HOE-140 para observar o efeito do bloqueio de B2R na permeabilidade da barreira hematoencefálica. A integridade da barreira pode ser medida através da administração intravenosa de marcadores fluorescentes, seguido da análise da presença da molécula no tecido cerebral.

Em conjunto, os dados sugerem que a infecção de células endoteliais por DENV ativa KKS e que a BK gerada por essa ativação parece ter um duplo papel na patogênese da infecção, potencializando a replicação viral, mas protegendo as células da morte celular e aumento de permeabilidade. Embora estudos mecanísticos *in vitro* e ensaios *in vivo* ainda sejam necessários, as evidências trazidas neste trabalho contribuem para o entendimento do papel de vias hemostáticas na patogênese de infecções virais, apontando o sistema calicreína-cinina como uma resposta inata a patógenos.

7. Conclusões

- 7.1. A infecção de HBMECs pelo vírus da dengue é capaz de levar à clivagem de cininogênio retido na superfície celular, de forma dependente de fator XII, indicando ativação do sistema calicreína-cinina e potencial liberação de bradicinina.
- 7.2. A exposição de fosfatidilserina por HBMECs apoptóticas é capaz de levar à ativação do sistema calicreína-cinina, de forma semelhante ao observado na superfície de células infectadas.
- 7.3. HBMECs infectadas com DENV apresentam fosfatidilserina exposta em sua membrana no pico da replicação viral e esse pode ser o mecanismo pelo qual a ativação do sistema ocorre nesse contexto.
- 7.4. A infecção de HBMECs com DENV protege as células da indução de permeabilidade por BK, por mecanismos que podem depender de regulação da morte celular e da produção de NO.

8. REFERÊNCIAS

- Ackermann M, Verleden SE, Kuehnel M, Haverich A, Welte T, Laenger F, Vanstapel A, Werlein C, Stark H, Tzankov A, Li WW, Li VW, Mentzer SJ, Jonigk D. Pulmonary Vascular Endothelialitis, Thrombosis, and Angiogenesis in Covid-19. *N Engl J Med*. 2020 Jul; 120-128. doi: 10.1056/NEJMoa2015432.
- Acosta EG, Castilla V, Damonte EB. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *J Gen Virol*. 2008 Feb;89(Pt 2):474-484. doi: 10.1099/vir.0.83357-0. PMID: 18198378.
- Albuquerque LM, Trugilho MR, Chapeaurouge A, Jurgilas PB, Bozza PT, Bozza FA, Perales J, Neves-Ferreira AG. Two-dimensional difference gel electrophoresis (DiGE) analysis of plasmas from dengue fever patients. *J Proteome Res*. 2009 Dec;8(12):5431-41. doi: 10.1021/pr900236f.
- Anderson R, Wang S, Osiowy C, Issekutz AC. Activation of endothelial cells via antibody-enhanced dengue virus infection of peripheral blood monocytes. *J Virol*. 1997 Jun;71(6):4226-32. doi: 10.1128/JVI.71.6.4226-4232.1997.
- Arévalo MT, Simpson-Haidaris PJ, Kou Z, Schlesinger JJ, Jin X. Primary human endothelial cells support direct but not antibody-dependent enhancement of dengue viral infection. *J Med Virol*. 2009 Mar;81(3):519-28. doi: 10.1002/jmv.21408.
- Avirutnan P, Fuchs A, Hauhart RE, Somnuk P, Youn S, Diamond MS, Atkinson JP. Antagonism of the complement component C4 by flavivirus nonstructural protein NS1. *J Exp Med*. 2010 Apr 12;207(4):793-806. doi: 10.1084/jem.20092545.

Avirutnan P, Malasit P, Seliger B, Bhakdi S, Husmann M. Dengue virus infection of human endothelial cells leads to chemokine production, complement activation, and apoptosis. *J Immunol.* 1998 Dec 1;161(11):6338-46.

Avirutnan P, Zhang L, Punyadee N, Manuyakorn A, Puttikhunt C, Kasinrerak W, Malasit P, Atkinson JP, Diamond MS. Secreted NS1 of dengue virus attaches to the surface of cells via interactions with heparan sulfate and chondroitin sulfate E. *PLoS Pathog.* 2007 Nov;3(11): e183. doi: 10.1371/journal.ppat.0030183.

Azeredo EL, Zagne SM, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PC, Nogueira RM, Miagostovich MP, Kubelka CF. Characterisation of lymphocyte response and cytokine patterns in patients with dengue fever. *Immunobiology.* 2001 Dec;204(4):494-507. doi: 10.1078/0171-2985-00058.

Azizan A, Sweat J, Espino C, Gemmer J, Stark L, Kazanis D. Differential proinflammatory and angiogenesis-specific cytokine production in human pulmonary endothelial cells, HPMEC-ST1.6R infected with dengue-2 and dengue-3 virus. *J Virol Methods.* 2006 Dec;138(1-2):211-7. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.08.010.

Barcelos Figueiredo L, Batista Cecílio A, Portela Ferreira G, Paiva Drumond B, Germano de Oliveira J, Bonjardim CA, Peregrino Ferreira PC, Kroon EG. Dengue virus 3 genotype 1 associated with dengue fever and dengue hemorrhagic fever, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2008 Feb;14(2):314-6. doi: 10.3201/eid1402.070278.

Bera AK, Kuhn RJ, Smith JL. Functional characterization of cis and trans activity of the Flavivirus NS2B-NS3 protease. *J Biol Chem.* 2007 Apr 27;282(17):12883-92. doi: 10.1074/jbc.M611318200.

Bernardo, MM, Day DE, Olson ST, Shore JD. Surface-independent acceleration of factor XII activation by zinc ions. I. Kinetic characterization of the metal ion rate enhancement. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12468-76.

Bhatt, S., Gething, P., Brady, O. et al. The global distribution and burden of dengue. 2013. *Nature.* 496, 504–507.

Björkqvist J, Nickel KF, Stavrou E, Renné T. In vivo activation and functions of the protease factor XII. *Thromb Haemost.* 2014 Nov;112(5):868-75. doi: 10.1160/TH14-04-0311.

Bollati M, Alvarez K, Assenberg R, Baronti C, Canard B, Cook S, Coutard B, Decroly E, de Lamballerie X, Gould EA, Grard G, Grimes JM, Hilgenfeld R, Jansson AM, Malet H, Mancini EJ, Mastrangelo E, Mattevi A, Milani M, Moureau G, Neyts J, Owens RJ, Ren J, Selisko B, Speroni S, Steuber H, Stuart DI, Unge T, Bolognesi M. Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res.* 2010 Aug;87(2):125-48. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.11.009.

Bozza, F.A., Cruz, O.G., Zagne, S.M. et al. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infect Dis* 8, 86 (2008). <https://doi.org/10.1186/1471-2334-8-86>

Bravo JR, Guzmán MG, Kouri GP. Why dengue haemorrhagic fever in Cuba? 1. Individual risk factors for dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987;81(5):816-20. doi: 10.1016/0035-9203(87)90041-1.

Burke DS, Nisalak A, Johnson DE, Scott RM. A prospective study of dengue infections in Bangkok. *Am J Trop Med Hyg.* 1988 Jan;38(1):172-80. doi: 10.4269/ajtmh.1988.38.172.

Chen YC, Wang SY, King CC. Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol.* 1999 Apr;73(4):2650-7. doi: 10.1128/JVI.73.4.2650-2657.1999.

Chen, Y., Maguire, T., Hileman, R. et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. 1997. *Nat Med* 3, 866–871. <https://doi.org/10.1038/nm0897-866>

Choudhury MA, Lott WB, Aaskov J. Distribution of Fitness in Populations of Dengue Viruses. *PLoS ONE.* 2014. 9(9): e107264. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107264>.

Christine Cruz-Oliveira and others, Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells, *FEMS Microbiology Reviews*, 2015, Volume 39, Issue 2, Pages 155–170, <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>

Chuang YC, Lin YS, Liu CC, Liu HS, Liao SH, Shi MD, Lei HY, Yeh TM. Factors contributing to the disturbance of coagulation and fibrinolysis in dengue virus infection. *J Formos Med Assoc.* 2013 Jan;112(1):12-7. doi: 10.1016/j.jfma.2012.10.013.

Coelho SVA, Rust NM, Vellasco L, Papa MP, Pereira ASG, Silva Palazzo MFD, Juliano MA, Costa SM, Alves AMB, Cordeiro MT, Marques ETA, Scharfstein J, Arruda LB. Contact System Activation in Plasma from Dengue Patients Might Harness Endothelial Virus Replication through the Signaling of Bradykinin Receptors. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2021 Jan 12;14(1):56. doi: 10.3390/ph14010056.

Courageot MP, Frenkiel MP, Dos Santos CD, Deubel V, Desprès P. Alpha-glucosidase inhibitors reduce dengue virus production by affecting the initial steps of virion morphogenesis in the endoplasmic reticulum. *J Virol.* 2000 Jan;74(1):564-72. doi: 10.1128/jvi.74.1.564-572.2000.

Couvelard A, Marianneau P, Bedel C, Drouet MT, Vachon F, Hénin D, Deubel V. Report of a fatal case of dengue infection with hepatitis: demonstration of dengue antigens in hepatocytes and liver apoptosis. *Hum Pathol.* 1999 Sep;30(9):1106-10. doi: 10.1016/s0046-8177(99)90230-7.

Crill WD, Roehrig JT. Monoclonal antibodies that bind to domain III of dengue virus E glycoprotein are the most efficient blockers of virus adsorption to Vero cells. *J Virol.* 2001 Aug;75(16):7769-73. doi: 10.1128/JVI.75.16.7769-7773.2001.

da Conceição TM, Rust NM, Berbel AC, Martins NB, do Nascimento Santos CA, Da Poian AT, de Arruda LB. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology.* 2013 Jan 20;435(2):281-92. doi: 10.1016/j.virol.2012.09.038.

Dalrymple N, Mackow ER. Productive dengue virus infection of human endothelial cells is directed by heparan sulfate-containing proteoglycan receptors. *J Virol.* 2011 Sep;85(18):9478-85. doi: 10.1128/JVI.05008-11.

Dalrymple NA, Mackow ER. Roles for endothelial cells in dengue virus infection. *Adv Virol.* 2012; 840654. doi: 10.1155/2012/840654.

Danese S, Dejana E, Fiocchi C. Immune regulation by microvascular endothelial cells: directing innate and adaptive immunity, coagulation, and inflammation. *J Immunol.* 2007 May 15;178(10):6017-22. doi: 10.4049/jimmunol.178.10.6017.

Daughaday CC, Brandt WE, McCown JM, Russell PK. Evidence for two mechanisms of dengue virus infection of adherent human monocytes: trypsin-sensitive virus receptors and trypsin-resistant immune complex receptors. *Infect Immun.* 1981 May;32(2):469-73. doi: 10.1128/iai.32.2.469-473.1981.

David A. Muller and others, Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 215, Issue suppl_2, 1 March 2017, Pages S89–S95, <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw649>

Dengue instruções para pessoal de combate ao vetor: manual de normas técnicas. - 3. ed., rev. - Brasília: Ministério da Saúde: Fundação Nacional de Saúde, 2001. 84
: https://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/man_dengue.pdf

ECDC. Dengue virus disease cases reported April 2022 - March 2023. 2023. <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/dengue-virus-disease-cases-reported-april-2022-march-2023>.

Edelman R, Nimmannitya S, Colman RW, Talamo RC, Top FH Jr. Evaluation of the plasma kinin system in dengue hemorrhagic fever. *J Lab Clin Med.* 1975 Sep;86(3):410-21.

Elshuber S, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW. Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus. *J Gen Virol.* 2003 Jan;84(Pt 1):183-191. doi: 10.1099/vir.0.18722-0.

- Endy TP, Chunsuttiwat S, Nisalak A, Libraty DH, Green S, Rothman AL, Vaughn DW, Ennis FA. Epidemiology of inapparent and symptomatic acute dengue virus infection: a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *Am J Epidemiol*. 2002 Jul 1;156(1):40-51. doi: 10.1093/aje/kwf005.
- Falgout B, Markoff L. Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum. *J Virol*. 1995 Nov;69(11):7232-43. doi: 10.1128/JVI.69.11.7232-7243.1995.
- Flamand M, Megret F, Mathieu M, Lepault J, Rey FA, Deubel V. Dengue virus type 1 nonstructural glycoprotein NS1 is secreted from mammalian cells as a soluble hexamer in a glycosylation-dependent fashion. *J Virol*. 1999 Jul;73(7):6104-10. doi: 10.1128/JVI.73.7.6104-6110.1999.
- Flipse J, Torres S, Diosa-Toro M, van der Ende-Metselaar H, Herrera-Rodriguez J, Urcuqui-Inchima S, Huckriede A, Rodenhuis-Zybert IA, Smit JM. Dengue tropism for macrophages and dendritic cells: the host cell effect. *J Gen Virol*. 2016 Jul;97(7):1531-1536. doi: 10.1099/jgv.0.000474.
- Freshney, R. Ian. Contamination. *Culture Of Animal Cells*, 14 out. 2005. John Wiley & Sons, Inc.. <http://dx.doi.org/10.1002/0471747599.cac019>.
- Fujiyoshi, Toshio; Hayashi, Izumi; Ohishi, Sachiko. Kaolin-induced writhing response in mice: activation of the plasma kallikrein-kinin system by kaolin. *Journal Of Pharmacobio-Dynamics*, v. 12, n. 8, p. 483-487, 1989. Pharmaceutical Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.1248/bpb1978.12.483>.
- Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999 May;73(5):3623-9. doi: 10.1128/JVI.73.5.3623-3629.1999.
- Ge P, Zhou ZH. Chaperone fusion proteins aid entropy-driven maturation of class II viral fusion proteins. *Trends Microbiol*. 2014 Feb;22(2):100-6. doi: 10.1016/j.tim.2013.11.006.
- Gutsche I, Coulibaly F, Voss JE, Salmon J, d'Alayer J, Ermonval M, Larquet E, Charneau P, Krey T, Mégrét F, Guittet E, Rey FA, Flamand M. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011 May 10;108(19):8003-8. doi: 10.1073/pnas.1017338108.
- Guzman, M., Gubler, D., Izquierdo, A. et al. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* 2, 16055 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.55>
- Halsey ES, Marks MA, Gotuzzo E, Fiestas V, Suarez L, Vargas J, Aguayo N, Madrid C, Vimos C, Kochel TJ, Laguna-Torres VA. Correlation of serotype-specific dengue virus infection with clinical manifestations. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(5):e1638. doi: 10.1371/journal.pntd.0001638.
- Halstead, S., O'Rourke, E. Antibody-enhanced dengue virus infection in primate leukocytes. *Nature* 265, 739-741 (1977). <https://doi.org/10.1038/265739a0>
- Han ED, MacFarlane RC, Mulligan AN, Scafidi J, Davis AE 3rd. Increased vascular permeability in C1 inhibitor-deficient mice mediated by the bradykinin type 2 receptor. *J Clin Invest*. 2002 Apr;109(8):1057-63. doi: 10.1172/JCI14211.
- HASAN, Ahmed A. K.; ZISMAN, Timothy; SCHMAIER, Alvin H.. Identification of cytokeratin 1 as a binding protein and presentation receptor for kininogens on endothelial cells. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, v. 95, n. 7, p. 3615-3620, 31 mar. 1998. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.95.7.3615>.
- Hober D, Poli L, Roblin B, et al. Serum Levels of Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α), Interleukin-6 (IL-6), and Interleukin-1 β (IL-1 β) in Dengue-Infected Patients. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;48(3):324-331. doi:10.4269/ajtmh.1993.48.324

Huang YH, Liu CC, Wang ST, Lei HY, Liu HL, Lin YS, Wu HL, Yeh TM. Activation of coagulation and fibrinolysis during dengue virus infection. *J Med Virol*. 2001 Mar;63(3):247-51. doi: 10.1002/1096-9071(200103)63:3<247::aid-jmv1008>3.0.co;2-f.

Ivanov I, Matafonov A, Sun MF, Cheng Q, Dickeson SK, Verhamme IM, Emsley J, Gailani D. Proteolytic properties of single-chain factor XII: a mechanism for triggering contact activation. *Blood*. 2017 Mar 16;129(11):1527-1537. doi: 10.1182/blood-2016-10-744110.

J. Gamble, d. Bethell, N. P. J. Day, P. P. Loc, N. H. Phu, I. B. Gartside, J. F. Farrar, N. J. White; Age-related changes in microvascular permeability: a significant factor in the susceptibility of children to shock?. *Clin Sci (Lond)* 1 February 2000; 98 (2): 211–216. doi: <https://doi.org/10.1042/cs0980211>

J. R. Weinberg, D. J. M. Wright, A. Guz; Interleukin-1 and tumour necrosis factor cause hypotension in the conscious rabbit. *Clin Sci (Lond)* 1 September 1988; 75 (3): 251–255. doi: <https://doi.org/10.1042/cs0750251>

Jennifer L. Kyle, P. Robert Beatty, Eva Harris, Dengue Virus Infects Macrophages and Dendritic Cells in a Mouse Model of Infection, *The Journal of Infectious Diseases*, Volume 195, Issue 12, 15 June 2007, Pages 1808–1817, <https://doi.org/10.1086/518007>

Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *J Infect Dis*. 2004 Apr 15;189(8):1411-8. doi: 10.1086/383043.

Joseph K, Kaplan AP. Formation of bradykinin: a major contributor to the innate inflammatory response. *Adv Immunol*. 2005;86:159-208. doi: 10.1016/S0065-2776(04)86005-X.

Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J Infect Dis*. 1997 Aug;176(2):313-21. doi: 10.1086/514047.

Kanlaya R, Pattanakitsakul SN, Sinchaikul S, Chen ST, Thongboonkerd V. Alterations in actin cytoskeletal assembly and junctional protein complexes in human endothelial cells induced by dengue virus infection and mimicry of leukocyte transendothelial migration. *J Proteome Res*. 2009 May;8(5):2551-62. doi: 10.1021/pr900060g.

Kou Z, Quinn M, Chen H, Rodrigo WW, Rose RC, Schlesinger JJ, Jin X. Monocytes, but not T or B cells, are the principal target cells for dengue virus (DV) infection among human peripheral blood mononuclear cells. *J Med Virol*. 2008 Jan;80(1):134-46. doi: 10.1002/jmv.21051.

Kouri GP, Guzmán MG, Bravo JR, Triana C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull World Health Organ*. 1989;67(4):375-80.

Kuhr F, Lowry J, Zhang Y, Brovkovich V, SkicEel RA. Differential regulation of inducible and endothelial nitric oxide synthase by kinin B1 and B2 receptors. *Neuropeptides*. 2010 Apr;44(2):145-54. doi: 10.1016/j.npep.2009.12.004.

Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*. 2008 Mar 28;319(5871):1830-4. doi: 10.1126/science.1153263.

Limonta D, Capó V, Torres G, Pérez AB, Guzmán MG. Apoptosis in tissues from fatal dengue shock syndrome. *J Clin Virol*. 2007 Sep;40(1):50-4. doi: 10.1016/j.jcv.2007.04.024. Epub 2007 Aug 10.

Limonta D, Torres G, Capó V, Guzmán MG. Apoptosis, vascular leakage and increased risk of severe dengue in a type 2 diabetes mellitus patient. *Diab Vasc Dis Res*. 2008 Sep;5(3):213-4. doi: 10.3132/dvdr.2008.034.

Lindenbach BD, Rice CM. Genetic interaction of flavivirus nonstructural proteins NS1 and NS4A as a determinant of replicase function. *J Virol*. 1999 Jun;73(6):4611-21. doi: 10.1128/JVI.73.6.4611-4621.1999.

Long AT, Kenne E, Jung R, Fuchs TA, Renné T. Contact system revisited: an interface between inflammation, coagulation, and innate immunity. *J Thromb Haemost*. 2016 Mar;14(3):427-37. doi: 10.1111/jth.13235.

Maas C, Renné T. Coagulation factor XII in thrombosis and inflammation. *Blood*. 2018 Apr 26;131(17):1903-1909. doi: 10.1182/blood-2017-04-569111.

Martens CP, Van Mol P, Wauters J, Wauters E, Gangnus T, Noppen B, Callewaert H, Feyen JHM, Liesenborghs L, Heylen E, Jansen S, Pereira LCV, Kraisin S, Guler I, Engelen MM, Ockerman A, Van Herck A, Vos R, Vandembriele C, Meersseman P, Hermans G, Wilmer A, Martinod K, Burckhardt BB, Vanhove M, Jacquemin M, Verhamme P, Neyts J, Vanassche T. Dysregulation of the kallikrein-kinin system in bronchoalveolar lavage fluid of patients with severe COVID-19. *EBioMedicine*. 2022 Sep;83:104195. doi: 10.1016/j.ebiom.2022.104195.

Martin S, Maruta K, Burkart V, Gillis S, Kolb H. IL-1 and IFN-gamma increase vascular permeability. *Immunology*. 1988 Jun;64(2):301-5.

Miller JL, de Wet BJ, Martinez-Pomares L, Radcliffe CM, Dwek RA, Rudd PM, Gordon S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLoS Pathog*. 2008 Feb 8;4(2):e17. doi: 10.1371/journal.ppat.0040017. Erratum in: *PLoS Pathog*. 2008 Mar;4(3). doi: 10.1371/annotation/98b92fca-fa6e-4bf3-9b39-13b66b640476.

Ministério da Saúde. Brasil. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano de contingência para resposta às emergências em Saúde Pública por dengue, chikungunya e Zika. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. - Brasília: Ministério da Saúde, 2022.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde e Ambiente. Boletim epidemiológico, Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 52 de 2022. <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023/boletim-epidemiologico-volume-54-no-01/view>. Janeiro, 2023.

Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. et al. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature* 427, 313–319 (2004). <https://doi.org/10.1038/nature02165>

Nurnaningsih, Samlek Elisawyn Sunbanu, Desy Rusmawatiningsih, Eggi Arguni, Firdian Makrufardi, Intan Fatah Kumara, Disseminated intravascular coagulation initial score as a predictor of mortality in children with dengue shock syndrome: A retrospective cohort study, *Annals of Medicine and Surgery*, Volume 79, 2022, 103890, ISSN 2049-0801, <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103890>.

Osterud B, Bjorklid E. Tissue factor in blood cells and endothelial cells. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2012 Jan 1;4(1):289-99. doi: 10.2741/e376.

Palmer, R., Ferrige, A. & Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524–526 (1987). <https://doi.org/10.1038/327524a0>

Pan P, Li G, Shen M, Yu Z, Ge W, Lao Z, Fan Y, Chen K, Ding Z, Wang W, Wan P, Shereen MA, Luo Z, Chen X, Zhang Q, Lin L, Wu J. DENV NS1 and MMP-9 cooperate to induce vascular leakage by altering endothelial cell adhesion and tight junction. *PLoS Pathog*. 2021 Jul 26;17(7):e1008603. doi: 10.1371/journal.ppat.1008603.

Patel G, Pongracic JA. Hereditary and acquired angioedema. *Allergy Asthma Proc*. 2019 Nov 1;40(6):441-445. doi: 10.2500/aap.2019.40.4267.

Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*. 2008 Aug;11(4):369-77. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.004.

Prado GN, Taylor L, Zhou X, Ricupero D, Mierke DF, Polgar P. Mechanisms regulating the expression, self-maintenance, and signaling-function of the bradykinin B2 and B1 receptors. *J Cell Physiol*. 2002 Dec;193(3):275-86. doi: 10.1002/jcp.10175.

- Pryzdial ELG, Lee FMH, Lin BH, Carter RLR, Tegegn TZ, Belletrutti MJ. Blood coagulation dissected. *Transfus Apher Sci.* 2018 Aug;57(4):449-457. doi: 10.1016/j.transci.2018.07.003
- Ramos C, Sánchez G, Pando RH, Baquera J, Hernández D, Mota J, Ramos J, Flores A, Llausás E. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. *J Neurovirol.* 1998 Aug.
- Reddigari S, Kaplan AP. Cleavage of human high-molecular weight kininogen by purified kallikreins and upon contact activation of plasma. *Blood.* 1988 May;71(5):1334-40.
- Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol.* 1998 May 1;348(1):1-10. doi: 10.1016/s0014-2999(98)00165-4.
- Regoli D, Rhaleb NE, Drapeau G, Dion S, Tousignant C, D'Orléans-Juste P, Devillier P. Basic pharmacology of kinins: pharmacologic receptors and other mechanisms. *Adv Exp Med Biol.* 1989;247A:399-407. doi: 10.1007/978-1-4615-9543-4_61.
- Renné T, Pozgajová M, Grüner S, Schuh K, Pauer HU, Burfeind P, Gailani D, Nieswandt B. Defective thrombus formation in mice lacking coagulation factor XII. *J Exp Med.* 2005 Jul 18;202(2):271-81. doi: 10.1084/jem.20050664.
- Reyes-Del Valle J, Chávez-Salinas S, Medina F, Del Angel RM. Heat shock protein 90 and heat shock protein 70 are components of dengue virus receptor complex in human cells. *J Virol.* 2005 Apr;79(8):4557-67. doi: 10.1128/JVI.79.8.4557-4567.2005.
- Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, Boshell J, de Mesa MT, Nogueira RM, da Rosa AT. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology.* 1997 Apr 14;230(2):244-51. doi: 10.1006/viro.1997.8504.
- Rust NM, Papa MP, Scovino AM, da Silva MM, Calzavara-Silva CE, Marques ET Jr, Peçanha LM, Scharfstein J, Arruda LB. Bradykinin enhances Sindbis virus infection in human brain microvascular endothelial cells. *Virology.* 2012 Jan 5;422(1):81-91. doi: 10.1016/j.virol.2011.10.003.
- Salgado DM, Eltit JM, Mansfield K, Panqueba C, Castro D, Vega MR, Xhaja K, Schmidt D, Martin KJ, Allen PD, Rodriguez JA, Dinsmore JH, López JR, Bosch I. Heart and skeletal muscle are targets of dengue virus infection. *Pediatr Infect Dis J.* 2010 Mar;29(3):238-42. doi: 10.1097/INF.0b013e3181bc3c5b.
- Sang Y, Roest M, de Laat B, de Groot PG, Huskens D. Interplay between platelets and coagulation. *Blood Rev.* 2021 Mar;46:100733. doi: 10.1016/j.blre.2020.100733.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol.* 1984 Nov;120(5):653-69. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a113932.
- Schiffman S, Mannhalter C, Tyner KD. Human high molecular weight kininogen. Effects of cleavage by kallikrein on protein structure and procoagulant activity. *J Biol Chem.* 1980 Jul 10;255(13):6433-8.
- Schreiber AD, Kaplan AP, Austen KF. Inhibition by C1INH of Hagemann factor fragment activation of coagulation, fibrinolysis, and kinin generation. *J Clin Invest.* 1973 Jun;52(6):1402-9. doi: 10.1172/JCI107313.
- Shrivastava A, Soni M, Shrivastava S, Sharma S, Dash PK, Gopalan N, Behera PK, Parida MM. Lineage shift of dengue virus in Eastern India: an increased implication for DHF/DSS. *Epidemiol Infect.* 2015 Jun;143(8):1599-605. doi: 10.1017/S0950268814002751.
- Silva LK, Blanton RE, Parrado AR, Melo PS, Morato VG, Reis EA, Dias JP, Castro JM, Vasconcelos PF, Goddard KA, Barreto ML, Reis MG, Teixeira MG. Dengue hemorrhagic fever is associated with polymorphisms in JAK1. *Eur J Hum Genet.* 2010 Nov;18(11):1221-7. doi: 10.1038/ejhg.2010.98.
- Sosothikul D, Seksarn P, Pongsewalak S, Thisyakorn U, Lusher J. Activation of endothelial cells, coagulation and fibrinolysis in children with Dengue virus infection. *Thromb Haemost.* 2007 Apr;97(4):627-34.

- Srichaikul T, Nimmanitaya S, Artchararit N, Siriasawakul T, Sungpeuk P. Fibrinogen Metabolism and Disseminated Intravascular Coagulation in Dengue Hemorrhagic Fever. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1977;26(3):525-532. doi:10.4269/ajtmh.1977.26.525
- Srinivasan B, Kolli AR, Esch MB, Abaci HE, Shuler ML, Hickman JJ. TEER measurement techniques for in vitro barrier model systems. *J Lab Autom*. 2015 Apr;20(2):107-26. doi: 10.1177/2211068214561025.
- Sudipta Kumar Roy and Soumen Bhattacharjee. 2021. Dengue virus: epidemiology, biology, and disease aetiology. *Canadian Journal of Microbiology*. 67(10): 687-702. <https://doi.org/10.1139/cjm-2020-0572>
- Suttitheptumrong A, Mahutchariyakul T, Rawarak N, Reamtong O, Boonnak K, Pattanakitsakul SN. Altered Moesin and Actin Cytoskeleton Protein Rearrangements Affect Transendothelial Permeability in Human Endothelial Cells upon Dengue Virus Infection and TNF- α Treatment. *Viruses*. 2021 Oct 11;13(10):2042. doi: 10.3390/v13102042.
- Takahashi, H., Suzuki Y. Cellular Control of Dengue Virus Replication: Role of Interferon-Inducible Genes. *Dengue - Immunopathology and Control Strategies*. InTech; 2017. <http://dx.doi.org/10.5772/67984>
- Tassaneetrithep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*. 2003 Apr 7;197(7):823-9. doi: 10.1084/jem.20021840.
- Taylor SL, Wahl-Jensen V, Copeland AM, Jahrling PB, Schmaljohn CS. Endothelial cell permeability during hantavirus infection involves factor XII-dependent increased activation of the kallikrein-kinin system. *PLoS Pathog*. 2013;9(7):e1003470. doi: 10.1371/journal.ppat.1003470.
- Tsai JJ, Chen PC, Liu LT, Chang K, Yao JH, et al. (2013) Pathogenic Parameters Derived from Activated Platelets in Dengue Patients. *Trop Med Surg* 1: 142. doi: 10.4172/2329-9088.1000142
- Ty Hang VT, Holmes EC, Veasna D, Quy NT, Tinh Hien T, Quail M, et al. (2010) Emergence of the Asian 1 Genotype of Dengue Virus Serotype 2 in Viet Nam: In Vivo Fitness Advantage and Lineage Replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis* 4(7): e757.
- Van der Graaf F, Keus FJ, Vlooswijk RA, Bouma BN. The contact activation mechanism in human plasma: activation induced by dextran sulfate. *Blood*. 1982 Jun;59(6):1225-33.
- Van der Meijden PE, Munnix IC, Auger JM, Govers-Riemslog JW, Cosemans JM, Kuijpers MJ, Spronk HM, Watson SP, Renné T, Heemskerk JW. Dual role of collagen in factor XII-dependent thrombus formation. *Blood*. 2009 Jul 23;114(4):881-90. doi: 10.1182/blood-2008-07-171066.
- Verhoef JJ, Barendrecht AD, Nickel KF, Dijkxhoorn K, Kenne E, Labberton L, McCarty OJ, Schifferers R, Heijnen HF, Hendrickx AP, Schellekens H, Fens MH, de Maat S, Renné T, Maas C. Polyphosphate nanoparticles on the platelet surface trigger contact system activation. *Blood*. 2017 Mar 23;129(12):1707-1717. doi: 10.1182/blood-2016-08-734988.
- Vu TT, Fredenburgh JC, Weitz JI. Zinc: an important cofactor in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost*. 2013 Mar;109(3):421-30. doi: 10.1160/TH12-07-0465.
- White-Adams TC, Berny MA, Patel IA, Tucker EI, Gailani D, Gruber A, McCarty OJ. Laminin promotes coagulation and thrombus formation in a factor XII-dependent manner. *J Thromb Haemost*. 2010 Jun;8(6):1295-301. doi: 10.1111/j.1538-7836.2010.03850.x.
- Whitehorn J, Chau TN, Nguyet NM, Kien DT, Quyen NT, Trung DT, Pang J, Wills B, Van Vinh Chau N, Farrar J, Hibberd ML, Khor CC, Simmons CP. Genetic variants of MICB and PLCE1 and associations with non-severe dengue. *PLoS One*. 2013;8(3):e59067. doi: 10.1371/journal.pone.0059067.
- Wichmann D, Sperhake JP, Lütgehetmann M, Steurer S, Edler C, Heinemann A, Heinrich F, Mushumba H, Kniep I, Schröder AS, Burdelski C, de Heer G, Nierhaus A, Frings D, Pfefferle S, Becker H, Bredereke-Wiedling H, de Weerth A, Paschen HR, Sheikhzadeh-Eggers S, Stang A, Schmiedel S, Bokemeyer C, Addo MM, Aepfelbacher M, Püschel K, Kluge S. Autopsy Findings and Venous Thromboembolism in Patients With

COVID-19: A Prospective Cohort Study. *Ann Intern Med.* 2020 Aug 18;173(4):268-277. doi: 10.7326/M20-2003.

Williams M, Mayer SV, Johnson WL, Chen R, Volkova E, Vilcarrromero S, Widen SG, Wood TG, Suarez-Ognio L, Long KC, Hanley KA, Morrison AC, Vasilakis N, Halsey ES. Lineage II of Southeast Asian/American DENV-2 is associated with a severe dengue outbreak in the Peruvian Amazon. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Sep;91(3):611-20. doi: 10.4269/ajtmh.13-0600.

World Health Organization. Dengue and severe dengue. Março, 2023. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>

World Health Organization. Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. New edition. Geneva, Switzerland: WHO, 2009.

Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi PY. Membrane topology and function of dengue virus NS2A protein. *J Virol.* 2013 Apr;87(8):4609-22. doi: 10.1128/JVI.02424-12.

Xie X, Zou J, Zhang X, Zhou Y, Routh AL, Kang C, Popov VL, Chen X, Wang QY, Dong H, Shi PY. Dengue NS2A Protein Orchestrates Virus Assembly. *Cell Host Microbe.* 2019 Nov 13;26(5):606-622.e8. doi: 10.1016/j.chom.2019.09.015.

Yang A, Dai J, Xie Z, Colman RW, Wu Q, Birge RB, Wu Y. High molecular weight kininogen binds phosphatidylserine and opsonizes urokinase plasminogen activator receptor-mediated efferocytosis. *J Immunol.* 2014 May 1;192(9):4398-408. doi: 10.4049/jimmunol.1302590.

Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J. Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.* 2008 Mar 28;319(5871):1834-7. doi: 10.1126/science.1153264.

Zhao Y, Qiu Q, Mahdi F, Shariat-Madar Z, Røjkjaer R, Schmaier AH. Assembly and activation of HK-PK complex on endothelial cells results in bradykinin liberation and NO formation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001 Apr;280(4):H1821-9. doi: 10.1152/ajpheart.2001.280.4.H1821.