

Ativação sistêmica do sistema caliceína-cinina na dengue e na COVID-19: possíveis implicações fisiopatológicas da sinalização de receptores endoteliais de bradicinina.

Disfunções microcirculatórias e alterações na coagulação fazem parte do complexo quadro de doença sistêmica causada pelas infecções pelos vírus da dengue (DENV) e pelo SARS-CoV-2, causador da COVID-19. Na dengue, essas alterações estão associadas a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, e hipotensão, enquanto na COVID-19 os distúrbios vasculares, associados a hiperinflamação, culminam em manifestações tromboinflamatórias e disfunção respiratória. A via de contato da coagulação ou sistema caliceína-cinina (KKS) é um sistema endógeno composto por um conjunto de serino proteases envolvidas na regulação da coagulação e da pressão sanguínea, além de processos inflamatórios, o que nos motivou a investigar o papel do KKS na patogênese de ambas as infecções. Demonstramos nesse trabalho que plasmas de pacientes infectados com DENV (n=70) apresentavam o KKS ativado, independentemente da gravidade dos sintomas clínicos ou da fase clínica da infecção. Empregando um modelo de infecção endotelial *in vitro* demonstramos que a bradicinina -BK (produto da via ativada), ativando seu receptor B2R em HBMECs previamente infectadas reduziu os níveis intracelulares de óxido nítrico (NO) e retardou a apoptose, sugerindo que a inibição da indução de NO por DENV após adição de BK resgatava as células do processo apoptótico, contribuindo para maior replicação viral. Em busca de prova de conceito em modelo animal de dengue, desafiamos camundongos BALB/c adultos inoculando DENV pela via intracerebral. Nesse modelo, observamos que a inoculação do antagonista do B2R icatibant no momento da infecção diminuiu a carga viral nos tecidos cerebrais dos animais. Iniciando uma avaliação mecanística das vias envolvidas na ativação do KKS pelo DENV, demonstramos que HBMECs infectadas com DENV ou incubadas com meio condicionado de uma linhagem de mastócitos humanos (HMC-1) pré-ativados pelo vírus induziram clivagem de cininogênio (HK) *in vitro*. Em resumo, nosso primeiro conjunto de dados sugere que a infecção de células endoteliais e mastócitos com DENV pode contribuir para ativação do KKS seguido do aumento de BK, que por sua vez modula produção de NO, apoptose do endotélio e replicação viral, eventos possivelmente implicados na patologia microvascular na dengue. Enfrentando o desafio de contribuir para o entendimento da patogênese da COVID-19, avaliamos o status do KKS em amostras de soro de pacientes infectados com SARS-CoV-2. Tal como observado nos pacientes com dengue demonstramos que pacientes com COVID-19 apresentaram intenso consumo de fatores do KKS. Visando estudar futuramente o papel do KKS nas disfunções microvasculares na COVID-19, avaliamos a susceptibilidade, permissividade e ativação de HBMECs pelo SARS-CoV-2. Demonstramos nesses ensaios *in vitro* que HBMECs não são produtivamente infectadas. Não obstante isso, observamos robusta ativação celular, revelado pelo aumento da expressão dos transcritos de citocinas (IL-6, IFN- β , ISG15, IL-8) e quimiocinas pró-inflamatórias (CCL5 e CCL2), ACE-2 e dos receptores B1R e B2R. Em suma, nosso conjunto de dados sugerem que a ativação sistêmica do sistema de caliceína-cinina durante a infecção pelo DENV e SARS-CoV-2 pode contribuir para a fisiopatologia das manifestações observadas na dengue e COVID-19 através da sinalização dos receptores de bradicinina em células endoteliais.

Palavras-chave: DENV, SARS-CoV-2, Caliceína-cinina, Bradicininina, HBMECs, Mastócitos.

Ativação sistêmica do sistema caliceína-cinina na dengue e na COVID-19: possíveis implicações fisiopatológicas da sinalização de receptores endoteliais de bradicinina.

Microcirculatory dysfunctions and changes in coagulation are part of the complex picture of systemic disease caused by infections by dengue virus (DENV) and SARS-CoV-2, which causes COVID-19. In dengue, these changes are associated with vasodilation, increased vascular permeability, and hypotension, while in COVID-19, vascular disorders associated with hyperinflammation culminate in thromboinflammatory manifestations and respiratory dysfunction. The contact pathway of coagulation or kallikrein-kinin system (KKS) is an endogenous system composed of a set of serine proteases involved in the regulation of coagulation and blood pressure, besides to inflammatory processes, which motivated us to investigate the role of KKS in the pathogenesis of both infections. We demonstrated in this work that plasmas from patients infected with DENV (n=70) had activated KKS, regardless of the severity of clinical symptoms or the clinical stage of infection. Employing an *in vitro* model of endothelial infection, we demonstrated that bradykinin -BK (product of the activated pathway), activating its B2R receptor in previously infected HBMECs, reduced intracellular levels of nitric oxide (NO) and delayed apoptosis, suggesting that inhibition of induction of NO by DENV after the addition of BK rescued the cells from the apoptotic process, contributing to greater viral replication. In search of proof of concept in an animal model of dengue, we challenged adult BALB/c mice inoculating DENV via the intracerebral route. In this model, we observed that inoculation of the B2R antagonist icatibant at the time of infection decreased the viral load in the animals' brain tissues. Initiating a mechanistic evaluation of the pathways involved in the activation of KKS by DENV, we demonstrated that HBMECs infected with DENV or incubated with conditioned medium from a human mast cell line (HMC-1) preactivated by the virus induced kininogen (HK) cleavage *in vitro*. In summary, our first dataset suggests that infection of endothelial cells and mast cells with DENV may contribute to KKS activation followed by an increase in BK, which in turn modulates NO production, endothelial apoptosis and viral replication, events possibly implicated in microvascular pathology in dengue. Facing the challenge of contributing to the understanding of the pathogenesis of COVID-19, we evaluated the status of KKS in serum samples from patients infected with SARS-CoV-2. As observed in patients with dengue, we demonstrate that patients with COVID-19 showed high consumption of KKS factors. In order to study in the future the role of KKS in microvascular dysfunctions in COVID-19, we evaluated the susceptibility, permissiveness and activation of HBMECs by SARS-CoV-2. We demonstrate in these *in vitro* assays that HBMECs are not productively infected. Nevertheless, we observed robust cellular activation, revealed by increased expression of cytokine transcripts (IL-6, IFN- β , ISG15, IL-8) and pro-inflammatory chemokines (CCL5 and CCL2), ACE-2 and receptors B1R and B2R. In summary, our dataset suggests that systemic activation of the kallikrein-kinin system during DENV and SARS-CoV-2 infection may contribute to the pathophysiology of the manifestations seen in dengue and COVID-19 through bradykinin receptor signaling in endothelial cells.

Keywords: DENV, SARS-CoV-2, Kallikrein-kinin, Bradykinin, HBMECs, Mast cells.