

**JOSIANE BETIM DE ASSIS**

**IMUNOMODULAÇÃO DA HEPATITE EXPERIMENTAL AGUDA PELA  
SALIVA DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo

**2018**

**JOSIANE BETIM DE ASSIS**

**IMUNOMODULAÇÃO DE HEPATITE EXPERIMENTAL AGUDA PELA  
SALIVA DO MOSQUITO *Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes  
Co-orientadora: Profa. Dra. Denise Morais da Fonseca

Versão Original

São Paulo

**2018**

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Assis, Josiane Betim de  
Imunomodulação da hepatite experimental aguda  
pela saliva do mosquito *Aedes aegypti* / Josiane  
Betim de Assis; orientador Anderson de Sá Nunes ;  
coorientadora Denise Morais da Fonseca . -- São  
Paulo, 2018.  
72 p.

Dissertação (Mestrado) ) -- Universidade de São  
Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Hepatite. 2. Insuficiência Hepática Aguda. 3.  
*Aedes aegypti*. 4. Saliva. 5. Imunomodulação. I. ,  
Anderson de Sá Nunes, orientador. II. , Denise  
Morais da Fonseca, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: Josiane Betim de Assis

Título da Dissertação: Imunomodulação da hepatite experimental aguda pela saliva do mosquito *Aedes aegypti*

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou a candidata

**Aprovada**

**Reprovada**

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:            Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.061/2015

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 016/12/CEUA, datado de 05/03/2012, e por solicitação do Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Josiane Betim de Assis** ao Projeto de Pesquisa "*Efeitos do extrato de glândula salivar do mosquito Aedes aegypti em modelos animais de doenças autoimunes*", uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao Projeto.

São Paulo, 12 de agosto de 2015.

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
Vice-Coordenadora da CEUA-ICB/USP

## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação do perfil imunológico de animais expostos à picada e extrato de glândula salivar do mosquito Aedes aegypti*", registrado sob o protocolo nº **131/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/11/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Anderson de Sá Nunes**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Josiane Betim de Assis (Pós-graduando), Sandra Alexandre Alves (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [www2.icb.usp.br/icb/ceua](http://www2.icb.usp.br/icb/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

## CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of the immunological profile of animals exposed to bites and salivary gland extract of Aedes aegypti mosquitoes*", protocol nº **131/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Anderson de Sá Nunes**

- Team members: *Josiane Betim de Assis (Pós-graduando), Sandra Alexandre Alves (Técnico de laboratório)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>20 g</i>	<i>960</i>
	<i>C57BL/6</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>20 g</i>	<i>960</i>

São Paulo, 08 de novembro de 2017.



Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**  
Coordenadora CEUA-ICB/USP

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Adriane e Jose Edson, que tanto me incentivaram durante toda minha jornada; ao meu irmão, Henrique e ao meu noivo, Fábio pela compreensão e apoio incondicionais.

## AGRADECIMENTOS

De todo meu coração, acredito que existe algo maior que a nossa existência, algo que ainda não somos capazes de dimensionar e que dá sentido à vida... Acredito que haja um **Deus** que nos permite a evolução e **espíritos amigos** que são capazes de nos auxiliar em nossa jornada. Assim, agradeço à Eles pela força e o equilíbrio, por me permitirem seguir nessa aventura que hoje toma forma através desse trabalho.

Aos amores da minha vida: meus pais, **Adriane** e **Jose Edson**, meus avós **Roseli** e **Nilson**, meu irmão, **Henrique** e meu noivo, **Fábio**. Cada um, à sua maneira, me dedicou seu amor, cuidado, carinho, compreensão, incentivo e apoio nessa fase que se encerra, e isso tudo foi muito importante para que eu pudesse concluí-la feliz! À vocês meu mais sincero muito obrigada e meu amor eterno.

Ao meu orientador, Dr. **Anderson de Sá Nunes**, tenho muito que agradecer! Agradeço pelo seu companheirismo durante o desenvolvimento do projeto, por estar comigo na bancada, nos experimento e pela sua paciência comigo. Sobretudo, agradeço pelas oportunidades que me proporcionou, por abrir as portas do seu laboratório e me permitir trabalhar e aprender com pessoas tão maravilhosas durante estes anos.

Time do laboratório: **Eliane Esteves**, **Bruna Bizarro**, **Priscila Lara**, **Michele Barros**, **Leila Neto**, **Maressa Henrique**, **Mariana Garcia**, que prazer poder trabalhar com vocês! Cada uma, com sua generosidade, me doou um pouquinho do seu conhecimento para que eu pudesse tornar mais sólida minha bagagem de aprendizados. Reforçando esse time, **Sandra Alexandre**, nossa técnica fiel, que esteve lá em todos os momentos, apoiando e contribuindo para que tudo desse certo. Agradeço a todas vocês pela paciência, parceria e pela amizade!

À todos que passaram pelo **Laboratório de Imunologia Experimental**, mesmo àqueles a quem não tive a oportunidade de conhecer pessoalmente. Acredito que cada um traz um tijolinho de descoberta com seu trabalho e o meu, certamente, é pautado nas verdades que vocês ajudaram a conhecer; agradeço, em



especial, ao **Anderson Daniel**, cujo trabalho serviu de base para o desenvolvimento do meu.

Agradeço à **Isabella Cunha** e ao **Caio Silveira**, que compartilharam comigo as aventuras (e desventuras) da vida na Pós.

À **Dra. Denise Morais da Fonseca**, que assumiu minha co-orientação, agradeço pela paciência com que me ensinou e me auxiliou diversas vezes e pela fundamental contribuição em que isso resultou.

Agradeço também à **Mirian Siqueira, Marcela Davoli e Jaqueline Marques**, “meio-irmãs” que a Dra. Denise me permitiu ter. Obrigada pelo companheirismo e pelo apoio no trabalho.

À **Dra. Margareth de Lara Capurro** e suas técnicas **Isabel Marques** e **Ediane Fernandes**, agradeço por nos proporcionar os mosquitos utilizados no desenvolvimento deste projeto.

Ao **Dr. Bruno Cogliati** que nos apresentou o modelo de hepatite tóxica induzida por paracetamol e nos auxiliou na análise das lâminas de histologia – muito obrigada!

Agradeço à **Dra. Lorena Bavia**, pelo carinhoso auxílio com a técnica de separação celular que nos foi tão útil durante os experimentos.

Às **Dras. Lourdes Isaac, Nancy Starobinas e Maisa Della Casa**, agradeço por aceitarem compor a minha banca de qualificação e pelas sugestões que tanto contribuíram.

Às **Dras. Ana Paula Lepique e Sonia Jancar**, bem como à técnica **Marlise Montes**, agradeço pela contribuição com equipamentos e reagentes para realização de alguns dos nossos experimentos.

À **Maria Eni**, secretária da Pós-Graduação, agradeço pela ajuda desde a inscrição e matrícula no mestrado até o auxílio com os trâmites da defesa.

Por fim, agradeço à **CAPES** e à **FAPESP**, que proporcionaram o auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”

*- Arthur Schopenhauer*

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia Experimental,  
Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas – Universidade de  
São Paulo, com o apoio financeiro referente ao Processo nº 2016/11523-2,  
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).

## RESUMO

ASSIS, J. B. **Imunomodulação da hepatite experimental aguda pela saliva do mosquito *Aedes aegypti***. 2018. 72 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Hepatite é uma condição inflamatória do fígado que pode ser autolimitada ou pode progredir para um quadro de fibrose, cirrose ou câncer. Uma das consequências mais graves associada ao dano hepático é a insuficiência hepática aguda (também conhecida como insuficiência hepática fulminante), cujas etiologias mais comuns são as infecções virais, a autoimunidade e o uso de medicamentos. Conhecendo as atividades biológicas das moléculas presentes na saliva dos insetos hematófagos, e com base em resultados anteriores do nosso grupo de pesquisa, acreditamos que os componentes salivares do mosquito *Aedes aegypti* possam ser empregados na prevenção e/ou tratamento de doenças inflamatórias. Assim, para avaliar o potencial terapêutico da saliva de *A. aegypti* em quadros de insuficiência hepática aguda, empregamos um modelo experimental amplamente utilizado para o estudo da hepatite autoimune, a hepatite experimental aguda induzida por concanavalina A (Con A) e um modelo de hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno (APAP), comumente empregado para o estudo da lesão hepática induzida por fármaco. Nossos resultados demonstram que a exposição de animais às picadas de mosquitos *A. aegypti* reduz os níveis das enzimas alanino aminotransferase (ALT) em ambos os modelos e de aspartato aminotransferase (AST) no modelo de hepatite induzida por Con A. Além disso, o tratamento com a saliva foi capaz de reduzir os níveis de citocinas séricas IFN- $\gamma$ , IL-6 e IL-2, bem como a expressão de IFN- $\gamma$  no fígado no modelo de hepatite experimental aguda induzida por Con A e as citocinas séricas TNF- $\alpha$ , IL-6, IL1 $\beta$  e IL-10 no modelo de hepatite tóxica induzida por APAP. Os animais injetados com Con A apresentaram um aumento das frequências de populações de células NK e macrófagos e a exposição às picadas reduziu essas alterações para níveis próximos aos do grupo controle. Da mesma maneira, a exposição aos mosquitos também reduziu as populações de células dendríticas, macrófagos e células NKT, que se apresentaram aumentadas no grupo de animais injetados com APAP. Tais dados demonstram que a saliva de *A. aegypti* é capaz de proteger os animais dos efeitos deletérios das hepatites avaliadas, devido à sua capacidade de modular a resposta inflamatória nos animais experimentais. Estudos futuros poderão caracterizar as moléculas responsáveis por essa atividade biológica, destacando seu potencial uso como opção para prevenção e/ou tratamento destas condições.

**Palavras-chave:** Hepatite. Insuficiência Hepática Aguda. *Aedes aegypti*. Saliva. Imunomodulação

## ABSTRACT

ASSIS, J. B. **Immunomodulation of acute experimental hepatitis by the *Aedes aegypti* mosquito saliva**. 2018. 72 p. Master tesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Hepatitis is an inflammatory condition of the liver that can be self-limiting or progress to fibrosis, cirrhosis or cancer. One of the most severe consequences associated with the hepatic damage is the acute liver failure (also known as fulminant hepatic failure). being viral infections, autoimmunity and use of medications the most common etiologies. Knowing the biological activities of the compounds present in the saliva of hematophagous insects, and based on previous results from our group, we believe that the salivary components of *Aedes aegypti* mosquitoes can be employed in the prevention and/or treatment of inflammatory diseases. Thus, to evaluate the therapeutic potential of *A. aegypti* mosquito saliva in acute liver failure, we employed a well-established model for the study of autoimmune hepatitis, acute experimental hepatitis induced by concanavalin A (Con A), and a model of hepatotoxicity induced by acetaminophen (APAP) commonly employed to study drug-induced liver injury. Our results demonstrate that the exposure of animals to *A. aegypti* mosquito bites reduces alanine aminotransferase (ALT) enzyme levels in both models and aspartate aminotransferase (AST) in the acute experimental hepatitis induced by Con A. In addition, the treatment with saliva was able to reduce the levels of the serum cytokines IFN- $\gamma$ , IL-6 and IL-2, as well as the expression of hepatic IFN- $\gamma$  in the model of acute experimental hepatitis induced by ConA as well as the serum cytokines TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , and IL-10 in the APAP-induced toxic hepatitis model. Animals injected with Con A presented an increase in the frequencies of NK cells and macrophages populations, and the exposure to the bites reduced this changes to levels close to that found in the control group. Likewise, mosquito exposure also reduced the populations of dendritic cells, macrophages and NKT cells that were increased in the group of animals injected with APAP. These data demonstrate that *A. aegypti* saliva is able to protect animals from the deleterious effects of the evaluated hepatitis, due to its ability to modulate the inflammatory response of the experimental animals. Future studies might characterize the molecules responsible for this biological activity, highlighting their potential use as an option for prevention and/or treatment of these conditions.

**Palavras-chave:** Hepatitis. Acute Liver Failure. *Aedes aegypti*. Saliva. Immunomodulation.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hepatites

As hepatites são caracterizadas por processos inflamatórios que ocorrem no fígado. Suas etiologias são variadas, sendo que as manifestações clínicas e o prognóstico estão geralmente relacionados ao agente causal e podem levar à fibrose do órgão, cirrose ou mesmo câncer hepático. Uma das condições mais graves associada ao dano hepático é a insuficiência hepática aguda (também conhecida como insuficiência hepática fulminante), na qual ocorre a rápida deterioração do fígado previamente saudável, causando encefalopatia e icterícia (JAYAKUMAR et al., 2013). O tratamento, quando disponível, é específico para cada uma das etiologias. Apesar disso, o transplante hepático é a única terapia comprovadamente capaz de promover a sobrevivência do paciente. Antes do transplante de fígado tornar-se uma opção, a taxa de sobrevivência de pacientes com insuficiência hepática aguda era de cerca de 15%, mas atualmente esta taxa varia entre 60 e 80% (GOTTHARDT et al., 2007). Dentre as etiologias mais comuns da insuficiência hepática aguda estão as infecções virais, a autoimunidade e o uso de medicamentos (VOLAREVIC et al., 2012), que serão comentadas em mais detalhes a seguir.

### 1.1.1 Hepatites virais

No Brasil, as hepatites mais comuns são as virais, especialmente as causadas pelos vírus da hepatite A, B, C e D. Por serem muitas vezes assintomáticas, estas hepatites podem não ser diagnosticadas rapidamente, o que pode favorecer o agravamento da doença. A hepatite A tem transmissão fecal-oral; sua disseminação está relacionada sobretudo à infraestrutura de saneamento básico e a aspectos ligados às condições de higiene praticadas, ocorrendo também pelo consumo de água e/ou alimentos contaminados. Já as hepatites B, C e D são transmitidas através do contato com sangue ou secreções contaminados, durante o sexo desprotegido, por compartilhamento de seringas e agulhas contaminadas, procedimentos médico-odontológicos ou estéticos invasivos com materiais não esterilizados, por exemplo. Além disso, também existe a possibilidade de transmissão vertical (BRASIL, 2009; FERREIRA; SILVEIRA, 2004).

Existem vacinas para a prevenção das hepatites A e B. A vacina contra a hepatite A não faz parte do calendário de vacinação do Programa Nacional de Imunização; no entanto está disponível nos Centros de Referência de Imunobiológicos Especiais. A vacina contra a hepatite B faz parte do calendário de vacinação e está disponível na rotina das salas de vacina do Sistema Único de Saúde (SUS). O esquema vacinal contra a hepatite B é realizado em três doses, com intervalo de um mês entre a primeira e a segunda dose e de seis meses entre a primeira e a terceira dose (BRASIL, 2009).

Não existe tratamento específico para as formas agudas das hepatites virais. Na maioria dos casos de hepatite A, a doença é autolimitada e de caráter benigno, sendo que a insuficiência hepática aguda grave ocorre em menos de 1% dos casos (WASLEY; FIORE; BELL, 2006). Na infecção por hepatite B em adultos, cerca de 5% tornam-se casos crônicos e dos pacientes com hepatite aguda, apenas 1% desenvolve insuficiência hepática fulminante (LAVANCHY, 2004; TORBENSON; THOMAS, 2002). Por outro lado, as informações sobre a hepatite C são controversas; apesar de certos quadros de hepatites identificados como não A e não B (devido à ausência de marcadores positivos para estas) serem muitas vezes relacionados à hepatite C, atualmente não há evidências de que apenas a infecção pelo vírus da hepatite C possa causar insuficiência hepática aguda (MAHESHWARI; RAY; THULUVATH, 2008; MANKA et al., 2016).

### *1.1.2 Hepatite autoimune*

Em 1950, Jan Gösta Waldenström fez o primeiro relato do que mais tarde, viria a ser conhecido como hepatite autoimune (MACKAY, 2008; WALDENSTRÖM, 1950), uma doença sem etiologia bem definida, caracterizada pela destruição imunomediada de hepatócitos associada a uma inflamação progressiva e algumas vezes a outras alterações hepáticas, como causa ou em decorrência da mesma (BOGDANO; CHRISTEN, 2008; JU et al., 2012; ZAVAREH et al., 2014).

A incidência deste distúrbio de distribuição global varia de acordo com a idade, sexo e a região geográfica, podendo afetar adultos e crianças, havendo uma maior prevalência em mulheres (MCFARLANE, 2002; GOSSARD; LINDOR, 2012; ZAVAREH et al., 2014). Embora a incidência reportada seja de 1 caso para cada 100.000 pessoas na população dos Estados Unidos (EUA) (MANNIS; LUTTING;



OBERMAYER-STRAUB, 1998), outros estudos sugerem que a prevalência seja de 1 caso a cada 10.000 na Noruega e no Japão (TODA et al., 1997). No Brasil, apesar dos poucos dados disponíveis, considera-se que a hepatite autoimune seja responsável por cerca de 5-10% das doenças hepáticas tratadas nos principais centros médicos do país (CANÇADO; PORTA, 2000). De qualquer maneira, é provável que esses números estejam subestimados.

Transaminases elevadas, hipergamaglobulinemia, autoanticorpos circulantes e alterações histológicas com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário podem ser sugestivos da hepatite autoimune. Porém, para que se estabeleça o diagnóstico, é indispensável a cautelosa exclusão de outras causas de doença hepática (FERREIRA et al., 2002; GOSSARD; KRAWITT, 2006; LINDOR, 2012; PORTA, 2000). Por essa razão, em 1993 o “Grupo Internacional de Hepatite Autoimune” estabeleceu uma escala diagnóstica, onde os parâmetros supracitados são avaliados quantitativamente para padronizar a definição do quadro da doença (JOHNSON; MCFARLANE, 1993). Em 1998 esses critérios foram revisados e atualizados, mas em 2008 o Grupo sugeriu uma simplificação desse sistema (Tabela 1) para facilitar o diagnóstico na prática clínica, no qual a pontuação maior que 7 define hepatite autoimune (HENNES et al., 2008).

**Tabela 1 – Critério diagnóstico simplificado para hepatite autoimune (2008).**

Parâmetros	Cut off	Pontos
ANA ou SMA	≥1:40	1
ANA ou SMA ou LKM ou SLA	≥1:80 ≥1:40 Positivo	2*
IgG	>limite superior normal	1
	>1,1 vezes do limite superior normal	2
Histologia do fígado (evidência de hepatite é uma condição necessária)	Compatível com hepatite autoimune	1
	Hepatite autoimune típica	2
Ausência de hepatite viral	Sim	2

\* Adição de pontos na presença de todos autoanticorpos (máximo: 2 pontos).

**≥6: provável hepatite autoimune; ≥7: hepatite autoimune definida.**

ANA: anticorpos antinucleares; SMA: anticorpos anti- $\alpha$ -actina de músculo liso; LKM: anticorpo anti-microsomal de fígado e rim; SLA: anticorpo anti-antígeno hepático solúvel; IgG: imunoglobulina G.

FONTE: traduzido de HENNES et al., 2008.

Apesar da terapia preconizada com corticosteróides, muitas vezes o tratamento é insuficiente para a total remissão da doença. Quando tratada, observa-se que a resposta terapêutica aos corticosteroides ocorre em aproximadamente 80% dos casos em crianças e adolescentes. Entretanto, existem complicações decorrentes do tratamento em cerca de 31% desses casos e as taxas de recidiva ficam entre 54% e 89%. Em adultos, o tratamento imunossupressor também tem se mostrado insuficiente para impedir recaídas, que ocorrem em cerca de 57 a 88% desses pacientes. Além disso, a suspensão precoce da medicação pode resultar no aumento do risco de progressão da doença. Em alguns casos onde não há resposta ao tratamento, é necessário realizar transplante de fígado. Sem o devido tratamento, a doença pode progredir, levando a complicações como cirrose e insuficiência hepática, assim como alterações extra-hepáticas (CZAJA; MENON; CARPENTER, 2002; FERREIRA et al., 2005; PORTA, 2000). No Brasil, há poucos estudos realizados sobre a hepatite autoimune, sendo que os dados mais recentes são de 2000, mostrando que a doença era responsável por menos de 5% dos pacientes em lista de transplante de fígado e por cerca de 6% dos transplantes realizados no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CANÇADO; PORTA, 2000).

### *1.1.3 Hepatite medicamentosa induzida por acetaminofeno*

A lesão hepática induzida por drogas pode ser associada a xenobióticos, ervas e mais de 1000 medicamentos, dentre os quais, destaca-se o acetaminofeno (GIORDANO; RIVAS; ZERVOS, 2014). Amplamente utilizado por sua ação analgésica e antipirética, o acetaminofeno (*N*-acetil-*p*-aminofenol - APAP), também conhecido como paracetamol, foi sintetizado na Universidade Johns Hopkins em 1877 e foi usado em medicina clínica pela primeira vez em 1893 (RAFFA; CODD, 1996). Apesar de ser considerado seguro em doses terapêuticas (até 4 g num período de 24 h), o APAP pode causar lesão hepática severa quando administrado em altas doses. Nos EUA, por exemplo, a overdose de APAP é responsável por quase 50% dos casos de insuficiência hepática aguda e por cerca de 450 óbitos anuais (HINSON; ROBERTS; JAMES, 2010; LEE, 2004). No Brasil, dados sobre os casos de hepatite fulminante decorrente da utilização deste medicamento são escassos. Bittencourt (2011), em um levantamento sobre hepatite fulminante

induzida por drogas em cinco centros especializados em transplante de fígado do Brasil, revelou que 16% dos transplantes realizados nessas circunstâncias têm o paracetamol como agente hepatotóxico.

APAP é uma hepatotoxina dose-dependente. Quando administrado em doses terapêuticas, mais de 90% do APAP é metabolizado por gluconilação e sulfatação e seus metabólitos são rapidamente excretados na urina. Do APAP restante, aproximadamente 2% é excretado intacto na urina, e 5-9% é metabolizado pelo sistema do citocromo P450 em *N*-acetil-*p*-benzoquinonaimina (NAPQI), um metabólito altamente reativo (CONNOLLY et al., 2011). Nestas situações, a glutathiona hepática (GSH), um importante antioxidante intracelular hidrossolúvel, permite a excreção segura deste composto.

No entanto, em doses tóxicas de APAP (superiores a 10 g a cada 24 h), a GSH fica sobrecarregada e significativamente diminuída tanto no citoplasma quanto nas mitocôndrias; e, uma vez que a GSH é depletada, o NAPQI é capaz de exercer seus efeitos prejudiciais (LARSON, 2007; LOPES; MATHEUS, 2012). Este distúrbio leva a uma diminuição na síntese de ATP, ruptura da membrana celular e, eventualmente, morte celular necrótica (DEUTSCH et al., 2015). Embora os metabólitos tóxicos derivados do APAP sejam responsáveis pela lesão hepática primária, o sistema imunológico também apresenta um papel importante na lesão hepática induzida pelo fármaco. Inclusive há evidências de que a gravidade dessa lesão pode depender da participação subsequente de mediadores inflamatórios e de células imunes (LIU; GOVINDARAJAN; KAPLOWITZ, 2004). Apesar dessa sequência de eventos ter sido identificadas principalmente na análise da lesão em camundongos, estudos em hepatócitos humanos e análise de biomarcadores circulantes de pacientes após a superdosagem de APAP, indicam que vários eventos são idênticos em camundongos e humanos (DAVERN, 2006; MCGILL, 2011; XIE, 2014).

Quanto ao tratamento, nos casos de overdose do medicamento, é possível a administração de acetilcisteína (ou *N*-acetilcisteína), porém, a eficácia deste diminui conforme o tempo entre o uso de APAP e a intervenção terapêutica. Nos casos mais graves onde a insuficiência hepática ocorre, a única opção curativa é o transplante de fígado (LARSEN; WENDON, 2014).

## 1.2 Modelos de insuficiência hepática aguda em camundongos

Mesmo com o crescente progresso das ciências médicas, muito ainda é necessário desvendar neste vasto universo. A exemplo disso, o conhecimento da base fisiopatológica da hepatotoxicidade farmacológica e da insuficiência hepática aguda precisam ser melhor elucidados. Nas últimas décadas, muitas tentativas foram feitas para desenvolver modelos *in vivo* adequados para o entendimento dessas condições. Apesar de até hoje nenhum modelo experimental ter sido capaz de reproduzir completamente as condições de um processo de insuficiência hepática aguda em humanos, os conhecimentos fornecidos por esses modelos têm nos permitido entender a patogênese da doença e a progressão das lesões, bem como dos mecanismos envolvidos na regeneração hepática.

Dentre os modelos murinos de insuficiência hepática aguda descritos na literatura, podemos destacar os processos mediados pela sensibilização à galactosamina/lipossacarídeo, por resposta à concanavalina A (Con A) e por administração de acetaminofeno (APAP).

### 1.2.1 Modelo de hepatite induzida por D-galactosamina/ lipopolissacarídeo

Lipopolissacarídeos bacterianos (LPS) apresentam suma importância na patogênese de infecções gram-negativas. Em animais experimentais, LPS purificados desencadeiam um grande número de atividades fisiopatológicas que podem induzir choque ou mesmo a morte, mas camundongos e ratos são relativamente resistentes a essas reações. Para sensibilizar esses animais aos efeitos do LPS, desenvolveu-se uma metodologia baseada na co-administração de LPS e D-galactosamina (D-GalN) (GALANOS; FREUDENBERG; REUTTER, 1979). A galactosamina é um agente hepatotóxico específico, conhecida por induzir a necrose dos hepatócitos. Neste modelo, porém, a sensibilização ao LPS está relacionada apenas com os efeitos metabólicos iniciais desta hexosamina (DECKER; KEPLER, 1974; GALANOS; FREUDENBERG; REUTTER, 1979).

O mecanismo de hepatopatia inicia-se com a ligação da endotoxina ao receptor do tipo Toll 4 (TLR4) nas células de Kupffer, desencadeando a ativação transcricional de genes de certas citocinas, em particular do TNF- $\alpha$ , que exerce papel central na hepatotoxicidade deste modelo (SCHLAYER et al., 1988; TIEGS; WOLTER; WENDEL, 1989). Além do efeito tóxico de neutrófilos recrutados após a

ligação de TLR4, a morte celular é causada também por apoptose induzida por TNF- $\alpha$  envolvendo o receptor 1 de TNF- $\alpha$  (LEIST et al., 1995) e ativação de caspases (JAESCHKE et al., 1998; KÜNSTLE et al., 1997). O desenvolvimento de hepatite fulminante ocorre geralmente dentro de 8 horas, e é caracterizado por uma linfopenia grave e neutrofilia (TIEGS; NIEHÖRSTER, WENDEL, 1990).

O modelo D-GalN/LPS é especialmente utilizado no estudo dos mecanismos de sinalização apoptóticos mediados por TNF- $\alpha$  e de morte celular mediada por neutrófilos (MAES; VINKEN; JAESCHKE, 2016).

### 1.2.2 Modelo de hepatite experimental aguda induzida por Con A

Concanavalina A (Con A) é uma lectina mitogênica derivada das sementes do feijão-de-porco (*Canavalia ensiformis*), com capacidade de promover ligação cruzada a receptores celulares, levando à ativação e adesão celular (ASHERSON; FERLUGA; JANOSSY, 1973) e de ligação a glicoproteínas de superfície e glicolípídeos de membrana (PINK et al. 1983; PESCHKE et al. 1986; PESCHKE et al. 1990). Essas características foram importantes para o desenvolvimento de um modelo de lesão hepática imunomediada induzido por Con A (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992).

Apesar de a fisiopatologia da lesão não estar completamente elucidada, sabe-se que esta tem início com a ligação de Con A às glicoproteínas ricas em manose de células endoteliais sinusoidais (KNOLLE et al. 1996). Em seguida há uma ligação cruzada ao TCR de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, que uma vez ativados, dão início ao processo inflamatório através da produção de citocinas, em especial, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (HEYMANN et al., 2015). Apesar da Con A ter se mostrado tóxica para hepatócitos *in vitro* (LEIST; WENDEL, 1996), a injeção intravenosa da lectina *in vivo* promove dano principalmente pelo recrutamento e ativação de células T, macrófagos e células NKT (TIEGS; HENTSCHEL; WENDEL, 1992; GANTNER et al., 1995; NICOLETTI et al., 2000; MARGALIT et al., 2005; KAWASUJI et al., 2006).

Por ser um modelo representativo de hepatite mediada por células T e portanto considerado um modelo relevante para o estudo da insuficiência hepática aguda e da hepatite autoimune, a lesão hepática induzida por Con A foi um dos modelos escolhidos para o desenvolvimento do presente estudo e será discutida com mais detalhes no decorrer deste trabalho.

### 1.2.3 Modelo de hepatite tóxica induzida por APAP

A indução de dano hepático agudo pelo APAP é um dos modelos experimentais mais comuns de lesão hepática aguda em camundongos, e representa um modelo chave no estudo da hepatotoxicidade decorrente da overdose de APAP em humanos, já que é o único modelo murino em que a lesão hepática é promovida pelo mesmo agente causal da doença em humanos (MOSSANEN; TACKE, 2015).

Este modelo compreende a administração de uma alta dose de APAP, que promove a lesão hepática em duas etapas: inicialmente uma resposta tóxica com formação de NAPQI em grande concentração, o que reduz a GSH e promove a formação de adutos nas proteínas mitocondriais, levando ao estresse oxidativo mitocondrial. Isso induz uma disfunção mitocondrial culminando na liberação de proteínas como o fator indutor de apoptose e endonuclease G que chegam ao núcleo, causando fragmentação do DNA e necrose regulada (HU et al., 2016; MCGILL et al., 2012; RAMACHANDRAN; JAESCHKE, 2017). Em um segundo momento, o reconhecimento de padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) liberados em decorrência da necrose de hepatócitos, promove o início da resposta inflamatória, com recrutamento de monócitos e neutrófilos (WOOLBRIGHT; JAESCHKE, 2017). O papel desta inflamação no contexto da lesão hepática neste modelo ainda precisa ser melhor esclarecido.

Este modelo proporciona a investigação da patogênese da toxicidade induzida por APAP bem como as respostas imunes decorrentes deste processo e também foi selecionado para nosso estudo, já que nos possibilita testar possíveis intervenções terapêuticas, o que será mais discutido adiante.

## 1.3 Efeito modulador da saliva de *Aedes aegypti* sobre células do sistema imune

Mesmo enfrentando as barreiras naturais impostas pelo organismo do homem e demais hospedeiros vertebrados, a fêmea do mosquito *Aedes aegypti* é capaz de realizar com sucesso seu repasto sanguíneo, adquirindo o sangue necessário para maturação de seus ovários e reprodução. Sabe-se que os compostos presentes na saliva de *A. aegypti* e de outros insetos hematófagos são essenciais para sua

alimentação uma vez que possuem atividades anti-hemostáticas e imunomoduladoras (ANDRADE et al., 2005; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010; RIBEIRO, 2000). Enquanto as atividades da saliva de *A. aegypti* na hemostasia já estão bem caracterizadas, inclusive com a identidade das moléculas responsáveis por promover vasodilatação, inibição da agregação plaquetária e da cascata de coagulação, no caso das atividades imunomoduladoras, há relativamente poucos estudos a respeito. Já foi mostrado, por exemplo que o extrato da glândula salivar (EGS) de *A. aegypti* é capaz de inibir a secreção do fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) em mastócitos de ratos, porém a liberação de histamina por estas células não é afetada (BISSONNETTE; ROSSIGNOL; BEFUS, 1993). O EGS também é capaz de suprimir a expressão dos transcritos de interleucina-12 (IL-12), interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) e da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) em células dendríticas e macrófagos de camundongos, inibindo assim o desenvolvimento de uma resposta do padrão Th1 (SCHNEIDER et al., 2010). Wanasen e colaboradores (2004) demonstraram que a resposta proliferativa de linfócitos *in vitro*, tanto antígeno-dependente quanto antígeno-independente, foi suprimida na presença do EGS de *A. aegypti*. Resultados semelhantes foram apresentados por Wasserman e colaboradores (2004), que também mostraram uma diminuição significativa na produção de IL-2, IFN- $\gamma$ , IL-12, fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF), TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-5 e IL-10 em linfócitos de camundongos DO11.10 estimulados com ovalbumina (OVA). Essa redução maciça da produção de citocinas correlacionou-se com um aumento na morte de populações linfocitárias, induzida por uma fração de alto peso molecular, presente na saliva de *A. aegypti*. Além disso, os linfócitos sobreviventes apresentaram menor capacidade proliferativa. Nosso grupo confirmou que os componentes salivares desse mosquito possuem um efeito direto sobre linfócitos, induzindo a morte dessas células. O mecanismo de ação do EGS sobre essas células parece envolver a apoptose de linfócitos *naïve*, dependente de caspase-3 e caspase-8, enquanto células de memória foram resistentes a essa atividade (BIZZARRO et al., 2013). Também fomos capazes de determinar seletividade na indução de morte celular pelo EGS, sendo linfócitos T mais sensíveis (70-90%), linfócitos B menos sensíveis (~30%) e células mieloides como neutrófilos e células dendríticas totalmente resistentes a essa atividade (BIZZARRO, 2016).

Avaliando os efeitos dos componentes salivares de *A. aegypti* na biologia de células dendríticas, vimos que o EGS não interfere na diferenciação, maturação e função destas células nas condições estudadas. Por outro lado, há um trabalho na literatura mostrando que macrófagos peritoneais murinos infectados com o vírus do Nilo Ocidental ou com o vírus Sindbis apresentam níveis diminuídos de RNAm para IFN- $\beta$  e iNOS na presença do EGS de *A. aegypti*. Na ausência de infecção, o EGS foi capaz de reduzir os níveis basais de expressão de IL-12 ao mesmo tempo que a expressão de IL-10 foi aumentada (SCHNEIDER et al., 2010). Nosso laboratório avaliou em mais detalhes a modulação de macrófagos pelos componentes salivares do mosquito e demonstrou recentemente que o EGS de *A. aegypti* afeta a ativação clássica dessas células por LPS e IFN- $\gamma$  *in vitro* (macrófagos M1), diminuindo a expressão de iNOS e NF- $\kappa$ B e a produção de óxido nítrico e das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-12 e aumentando a produção de IL-10. Por outro lado, os parâmetros associados com a ativação alternativa pela citocina IL-4 (M2), como a produção de uréia e a expressão de arginase-1 e do receptor de manose não foram afetados pelo EGS (BARROS, 2017). Resumindo, todos os achados descritos acima comprovam que a saliva de *A. aegypti* possui componentes que são capazes de exercer um efeito direto sobre células do sistema imune, sobretudo macrófagos e linfócitos, modulando sua ativação ou induzindo apoptose.

#### **1.4 Potencial terapêutico de moléculas salivares do *A. aegypti* e de outros artrópodes hematófagos**

Devido às atividades imunomoduladoras observadas na saliva de *A. aegypti* e de outras espécies de artrópodes hematófagos, alguns grupos vêm explorando seu potencial em alterar o curso clínico de doenças inflamatórias e autoimunes. Nesse sentido, alguns trabalhos já indicaram que esta possibilidade é plausível, evidenciando inclusive seus potenciais mecanismos de ação.

A administração diária do EGS de *Phlebotomus papatasi*, um dos flebótomos do Velho Mundo vetores da leishmaniose, apresentou efeito terapêutico na artrite murina induzida por colágeno. O tratamento de animais com artrite (equivalente a 1 glândula por camundongo) iniciado no dia dos primeiros sintomas da doença, atenuou a gravidade da doença, reduzindo a lesão na articulação, o infiltrado inflamatório e a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Ensaios de fracionamento e de enzimáticos revelaram que nucleosídeos (adenosina e adenosina monofosfato)



presentes na saliva dessa espécie eram as moléculas responsáveis pelo efeito terapêutico do EGS (CARREGARO et al., 2011). Outra molécula proveniente da saliva de flebótomos do Novo Mundo, a proteína LJM 111 de *Lutzomyia longipalpis*, apresentou um efeito inibidor em parâmetros inflamatórios no modelo de artrite induzida por antígeno, onde foi observada uma redução na migração de neutrófilos, da nocicepção e da liberação de citocinas IL-17, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Essa proteína foi capaz de reduzir a expressão de MHC de classe II e CD86, além da produção da citocina TNF- $\alpha$  em células dendríticas ativadas, sugerindo uma diminuição da maturação e função dessas células, o que pode estar relacionado com a melhora no curso clínico da doença (GRESPLAN et al., 2012).

Também foi demonstrado o efeito modulador de algumas moléculas salivares na encefalomielite autoimune experimental (EAE), um modelo animal utilizado para o estudo da esclerose múltipla. Por exemplo, a sialostatina L1 (SialoL1), um inibidor de cisteíno-proteases identificado na saliva do carrapato *Ixodes scapularis*, vetor da doença de Lyme, preveniu os sinais clínicos da doença, que foram associados à redução dos níveis de IFN- $\gamma$  e IL-17, além de uma menor proliferação de células T antígeno-específicas. O mecanismo de ação dessa molécula é a inibição de catepsina S, enzima lisossomal que tem um papel essencial na degradação da cadeia invariante até a formação do CLIP. Um defeito nessa degradação impede as células dendríticas de apresentarem o antígeno indutor da EAE, melhorando os sinais clínicos da doença (SÁ-NUNES et al., 2009). Outra molécula proveniente de *I. scapularis* capaz de modular o curso da EAE é a Salp15. Porém, ao contrário da SialoL1, a Salp15 induziu EAE mais grave nos animais tratados. Isto ocorreu devido ao fato desta proteína induzir um aumento na diferenciação de células Th17 *in vivo* (JUNCADELLA et al., 2010). Nosso grupo também mostrou que o EGS de *A. aegypti* foi capaz de alterar positivamente o curso da EAE, induzindo melhora dos sinais clínicos da doença por atuação em uma série de vias: 1) diminuição da produção de citocinas responsáveis pela indução das respostas Th1 e Th17 pelas células dendríticas; 2) indução de células produtoras de IL-10 *ex vivo*; 3) diminuição da frequência de linfócitos T *naïve* responsivos, diminuindo assim a resposta proliferativa durante a fase da apresentação antigênica e; 4) indução sistêmica de células com perfil Th2 com produção de IL-4 e IL-5, sugerindo um desvio do perfil Th1/Th17 de resposta imune (RAMOS, 2014).

Um outro trabalho, realizado em colaboração com nosso grupo, demonstrou que animais tratados com EGS de *A. aegypti* apresentam sintomas clínicos mais brandos da colite experimental induzida por dextran sulfato de sódio, assim como melhora na escala clínica de avaliação da doença (SALES-CAMPOS et al., 2015). Posteriormente, por meio de ferramentas de bioinformática, identificamos um peptídeo salivar de *A. aegypti*, nomeado AeMOPE-1, que apresentou atividade anti-inflamatórias em macrófagos *in vitro*. Este peptídeo foi então utilizado como tratamento da colite experimental e, como resultado, vimos que foi capaz de produzir resultados semelhantes àqueles encontrados com o EGS total, com melhora nos sintomas clínicos da colite experimental, redução das escalas clínicas e pós-morte associada à diminuição do número de leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) circulantes no sangue periférico e da expressão das citocinas IL-6 e IFN- $\gamma$  no intestino (LARA, 2017).

## 7. REFERÊNCIAS

- AKAGI, E.M. et al. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma "in vitro". **Biomed Pharmacother**, 2012.
- ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: A tale of tear and blood. **An Acad Bras Ciênc**, 2005; 77(4):665–693.
- ARAGON, G.; YOUNOSSI, Z.M. When and how to evaluate mildly elevated liver enzymes in apparently healthy patients. **Cleve Clin J Med**, 2010;77:195–204
- ASHERSON, G.L.; FERLUGA, J.; JANOSSY, G. Non-specific cytotoxicity by T cells activated with plant mitogens in vitro and the requirement for plant agents during the killing reaction. **Clin Exp Immunol**, 1973; 15: 573–589.
- BARROS, M. S. Efeito dos componentes salivares do mosquito *Aedes aegypti* na biologia de macrófagos e potenciais alvos terapêuticos. 2017. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BLAZKA, M.E. et al. Role of proinflammatory cytokines in acetaminophen hepatotoxicity. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1995; 133:43-52.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. A B C D E das hepatites virais para agentes comunitários de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de DST, Aids e Hepatites Virais. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
- BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite Immunol**, 1993;15(1):27–33.
- BITTENCOURT, P. L. Epidemiologia da hepatotoxicidade por drogas. **Gastroenterol Endosc Dig**, 2011: 30(Supl.1):06-47
- BIZZARRO, B. et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasit Vectors**, 2013; 6: 329
- BIZZARRO, B. Caracterização imunofuncional de um inibidor de linfócitos presente na saliva de *Aedes aegypti*. 2016. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- BOGDANO, D.P.B.; CHRISTEN, U. Autoimmune Hepatitis: An Update on Current Animal Models. **The Open Pathology Journal**, 2008;2:39-45.
- CANÇADO, E.L.R.; PORTA, G. Autoimmune hepatitis in South America. In: MANN MP, PAUMGARTNER G, LEUSCHNER U. Immunology and Liver. Falk Symposium 114. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2000;82-92.

CARREGARO, V. et al. Nucleosides from *Phlebotomus papatasi* salivary gland ameliorate murine collagen-induced arthritis by impairing dendritic cell functions. **J Immunol**, 2011;187(8):4347–4359.

CHEN, D. et al. CD44- Deficient Mice Exhibit Enhanced Hepatitis After Concanavalin A Injection: Evidence for Involvement of CD44 in Activation-Induced Cell Death. **J Immunol**, 2001;166: 5889-5897.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A.M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon**, 2010; 56(7):1145-54.

CONNOLLY, M.K. et al. Dendritic Cell Depletion Exacerbates Acetaminophen Hepatotoxicity. **Hepatology**, 2011; 54:959-968.

CZAJA, A.J.; MENON, K.V.; CARPENTER, H.A. Sustained remission after corticosteroid therapy for type 1 autoimmune hepatitis: a retrospective analysis. **Hepatology**, 2002;35:890-897.

DAVERN, T.J. 2nd. et al. Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. **Gastroenterol**, 2006; 130:687–94.

DECKER, K.; KEPPLER, D. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, 1974; 71:77-106.

DEUTSCH, M. et al. Divergent effects of RIP1 or RIP3 blockade in murine models of acute liver injury. **Cell Death Dis**, 2015;6:e1759.

FERREIRA, A. R. et al. Autoimmune hepatitis in children and adolescents:clinical study, diagnosis and therapeutic response. **J Pediatr**, 2002; 78 (4): 309-314.

FERREIRA, T. C.; SILVEIRA, T. R. Viral Hepatitis: epidemiological and preventive aspects. **Rev Bras Epidemiol**, 2004; 7(4):473-87

FERREIRA, A. R. et al. Type 1 autoimmune hepatitis in children and adolescents: assessment of immunosuppressive treatment withdrawal. **J Pediatr**, 2005; 81(4):343-348.

FISHER, J. E. et al. Role of Kupffer cells and toll-like receptor 4 in acetaminophen-induced acute liver failure. **J Surg Res**, 2013; 180:147-55.

FOUREAU, D.M. et al. Comparative analysis of portal hepatic infiltrating leucocytes in acute drug-induced liver injury, idiopathic autoimmune and viral hepatitis. **Am J Clin Exp Immunol**, 2014; 180:40-51.

GALANOS, C.; FREUDENBERG, M. A.; REUTTER, W. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. **Proc Natl Acad Sci USA**, 1979; 76(11):5939-43.

GANTNER, F. et al. Concanavalin A-induced Tcell-mediated hepatic injury in mice: the role of tumor necrosis factor. **Hepatology**, 1995; 21:190–198.

GIORDANO, C.; RIVAS, J.; ZERVOS, X. An Update on Treatment of Drug-Induced Liver Injury. **J Clin Transl Hepatol**, 2014; 2:74-79.

GOSSARD, A.A, LINDOR, K.D. Autoimmune hepatitis: a review. **J Gastroenterol**, 2012; 47(5): 498–503.

GOTTHARDT, D. et al. Fulminant hepatic failure: etiology and indications for liver transplantation. **Nephrol Dial Transplant**, 2007; 22 [Suppl 8]: viii5–viii8

GRESPLAN, R. et al. The protein LJM 111 from *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extract (SGE) accounts for the SGE-inhibitory effects upon inflammatory parameters in experimental arthritis model. **Int Immunopharmacol**, 2012;12(4):603–610.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Vet Parasit**, 2001; 99(1):53-61.

HAMLIN, A.N.; DOUGLAS, A.P.; JAMES, O. The spectrum of paracetamol (acetaminophen) overdose: clinical and epidemiological studies. **Postgrad Med J**, 1978; 54(632):400-4.

HENNES, E. M. et al. Simplified Criteria for the Diagnosis of Autoimmune Hepatitis. **Hepatology**, 2008; 48(1):169-76

HEYMANN, F. et al. The concanavalin A model of acute hepatitis in mice. **Lab Anim**, 2015; 49(S1):12-20.

HINSON, J.A.; ROBERT, D.W. JAMES, L. P. Mechanisms of Acetaminophen-Induced Liver Necrosis. **Handb Exp Pharmacol**, 2010; 196: 369–405.

HU, J. et al. Low Dose Acetaminophen Induces Reversible Mitochondrial Dysfunction Associated with Transient c-Jun N-Terminal Kinase Activation in Mouse Liver. *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. 2016; 150:204–15

JAESCHKE H. et al. Activation of caspase 3 (CPP32)-like proteases is essential for TNF-alpha-induced hepatic parenchymal cell apoptosis and neutrophil-mediated necrosis in a murine endotoxin shock model. **J Immunol**, 1998; 160:3480–3486.

JAESCHKE, H. et al. Acetaminophen hepatotoxicity and repair: the role of sterile inflammation and innate immunity. **Liver Int**, 2012; 32:8-20.

JAESCHKE, H; XIE, Y; MCGILL, M. R, Acetaminophen-induced liver injury: from animal models to humans. **J Clin Transl Hepatol**, 2014, 2(3):153-161

JAYAKUMAR, S. et al. Fulminant Viral Hepatitis. **Crit Care Clin**, 2013, 29:677–697

JOHNSON, P.J., MCFARLANE, I.G. Meeting report: International Autoimmune Hepatitis Group. **Hepatology**, 1993;18(4):998-1005.

JU, H.Y. et al. The clinical features of drug-induced liver injury observed through liver biopsy: focus on relevancy to autoimmune hepatitis. **Clin Mol Hepatol**, 2012; 18(2):213-218.

JUNCADELLA, I. J. et al. The tick saliva immunosuppressor, Salp15, contributes to Th17-induced pathology during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **Biochem Biophys Res Commun**, 2010;402(1):105–109.

KAWASUJI, A. et al. L-Selectin and intercellular adhesion molecule-1 regulate the development of Concanavalin A-induced liver injury. **J Leukoc Biol**, 2006; 79:696–705.

KNOLLE, P.A. et al. Role of sinusoidal endothelial cells of the liver in concanavalin A-induced hepatic injury in mice. **Hepatology**, 1996; 24:824–829

KOPECKÝ, J.; KUTHEJLOVÁ, M. Suppressive effect of Ixodes ricinus salivary gland extract on mechanisms of natural immunity in vitro. **Parasite Immunol**, 1998; 20(4):169-74.

KRAWITT, E.L. Autoimmune hepatitis. **N Engl J Med**, 2006, 354(1):54–66.

KRENKEL, O.; MOSSANEN, J. C.; TACKE, F. Immune mechanisms in acetaminophen-induced acute liver failure. **Hepatobiliary Surg Nutr**, 2014; 3(6):331-343.

KUBBES, M. et al. Heterogeneity in the effect of different ixodid tick species on human natural killer cell activity. **Parasite Immunol**, 2002; 24(1):23-8.

KÜNSTLE, G. et al. ICE-protease inhibitors block murine liver injury and apoptosis caused by CD95 or by TNF-alpha. **Immunol Lett**, 1997; 55:5–10.

LAVANCHY, D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. **J Viral Hepat**, 2004; 11: 97–107.

LARA, P. G. AeMOPE-1: um novo peptídeo imunomodulador salivar de *Aedes aegypti* com potencial terapêutico na colite experimental. 2017. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

LARSEN, F.S.; WENDON, J. Understanding paracetamol induced liver failure. **Intensive Care Med**, 2014; 40:888-90.

LARSON, A. M. Acetaminophen hepatotoxicity. **Clin Liver Dis**, 2007;11: 525-548.

LEBOULLE, G. et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. **J Biol Chem**, 2002; 277(12):10083–10089.

LEE, W.M. Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study Group: Lowering the Risks of Hepatic Failure. **Hepatology**, 2004;40:6–9

LEIST, M. et al. Activation of the 55 kDa TNF receptor is necessary and sufficient for TNF-induced liver failure, hepatocyte apoptosis, and nitrite release. **J Immunol**, 1995; 154:1307–1316.

LEIST, M.; WENDEL, A. A novel mechanism of murine hepatocyte death inducible by concanavalin A. **J Hepatol**, 1996; 25: 948–959.

- LI, Y. et al. Endogenous n-3 polyunsaturated fatty acids attenuate T-cell-mediated hepatitis via autophagy activation. **Front Immunol**, 2016; 7: 1-12.
- LIU, Z.X.; GOVINDARAJAN, S.; KAPLOWITZ, N. Innate immune system plays a critical role in determining the progression and severity of acetaminophen hepatotoxicity. **Gastroenterol**, 2004; 127:1760-1774.
- LIAO, C.C et al. Baicalin Attenuates IL-17-Mediated Acetaminophen-Induced Liver Injury in a Mouse Model. **PLoS One**, 2016, 11(11): 1-19
- LIVAK, K. J.; SCMITTGEN, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. **Methods**, 2001; 25:402-408.
- LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do Paracetamol (Acetaminofem). **Rev Bras Farm**, 2012; 93(4): 411-414.
- LOHSE, A. W. et al. Experimental autoimmune hepatitis: disease induction, time course and T-cell reactivity. **Hepatology**, 1990; 11(1): 24-30.
- MACKAY, I. R. Historical reflections on autoimmune hepatitis. **World J Gastroenterol**, 2008; 14(21): 3292-3300
- MAES, M. et al. Connexin 32: a mediator of acetaminophen-induced liver injury? **Toxicol Mech Methods**, 2016, 26(2): 88-96
- MAES, M.; VINKEN, M.; JAESCHKE, H. Experimental models of hepatotoxicity related to acute liver failure. **Toxicol Appl Pharmacol**, 2016; 290: 86–97
- MARGALIT, M. et al. Glucocerebroside treatment ameliorates ConA hepatitis by inhibition of NKT lymphocytes. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 2005; 289: G917–G925.
- MCFARLANE, I.G. Definition and classification of autoimmune hepatitis. **Semin Liver Dis**, 2002; 22(4):317-324.
- MCGILL, M. R. et al. HepaRG cells: a human model to study mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. **Hepatology**, 2011; 53:974– 82.
- MCGILL, M.R. et al. Acetaminophen-induced liver injury in rats and mice: comparison of protein adducts, mitochondrial dysfunction, and oxidative stress in the mechanism of toxicity. *Toxicology and applied pharmacology*. 2012; 264:387–94
- MAHESHWARI, A.; RAY, S.; THULUVATH, P.J. Acute hepatitis C. **Lancet**, 2008; 372: 321–332.
- MALCHOW, S. et al. Essential role of neutrophil mobilization in concanavalin A-induced hepatitis is based on classic IL-6 signaling but not on IL-6 trans-signaling. **Biochim Biophys Acta**, 2011; 1812: 290-301.
- MANKA, P. et al. Liver Failure due to Acute Viral Hepatitis (A–E). **Visc Med**, 2016; 32:80–85
- MANNING, M. P., LUTTIG, B., OBERMAYER-STRAUB, P. Autoimmune Hepatitis. In: ROSE, N.R., MACKAY, I.R. eds. *The autoimmune diseases*, 3rd edn. Academic Press, New York, 1998, pp 511–25.

- MARTIN-MURPHY, B. V. et al. Increased Susceptibility of Natural Killer T-Cell-Deficient Mice to Acetaminophen-Induced Liver Injury. **Hepatology**, 2013; 57(4): 1575-1584.
- MORAIS, K.L. et al. Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. **Mol Cell Biochem**, 2016;415(1-2):119-31.
- MOSSANEN, J. C.; TACKE, F. Acetaminophen-induced acute liver injury in mice. **Lab Anim**, 2015; 49(1 Suppl):30-6
- NICOLETTI, F. et al. Murine concanavalin A-induced hepatitis is prevented by interleukin 12 (IL-12) antibody and exacerbated by exogenous IL-12 through an interferon-gamma-dependent mechanism. **Hepatology**, 2000; 32(4 Pt 1):728-33.
- PESCHKE T. et al. Effect of different fixatives on Con A surface receptors of mouse peritoneal macrophages. **Histochem**, 1990; 93:443– 446.
- PESCHKE T. et al. Effect of several fixatives on the density of concanavalin A binding sites of murine peritoneal macrophages determined by fluorescence microscopy and X-ray microanalysis. **Acta Histochem**, 1996; 33 (Suppl.): 201–206.
- PINK J.R. et al. Characterisation of Concanavalin A-binding glycoproteins from mouse splenic leukocytes by two-dimensional electrophoresis: preferential binding of incompletely glycosylated forms of H-2 antigen to the lectin. **Mol Immunol**, 1983; 20:491– 497
- PORTA, G. Hepatite auto-imune. **J pediatr**, 2000; 76 (Supl.2): S181-S186.
- PREVOT, P. P. et al. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS J**, 2009; 276(12):3235–3246.
- PRICE, L.M.; POKLIS,A.; JOHNSON,D.E. Fatal acetaminophen poisoning with evidence of subendocardial necrosis of the heart. **J Forensic Sci**, 1991; 36(3):930-5.
- RAFFA, R. B.; CODD, E. E. Lack of binding of acetaminophen to 5ht receptor or uptake sites (or eleven other binding/uptake assays). **Life Sci**, 1996; 59(2):37-40.
- RAMACHANDRAN, A. JAESCHKE, H. Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity and their translation to the human pathophysiology. **Clin Transl Res**, 2017; 3(Suppl 1): 157–169.
- RAMOS, A. D. Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato da glândula salivar de *Aedes aegypti*. 2014. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding in mosquitoes: Probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med Vet Entomol**, 2000; 14(2):142–148.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC gen**, 2007 8: 1-27.



- SANG, X. et al. Sophocarpine protects mice from Con A- induced hepatitis via inhibition of the IFN-gamma/ STAT1 pathway. **Front Pharmacol**, 2017,8: 1-9.
- SALES-CAMPOS, H. et al. *Aedes aegypti* salivary gland extract ameliorates experimental inflammatory bowel disease. **Int Immunopharmacol**, 2015; 26(1):13–22.
- SÁ-NUNES, A. et al. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. **J Immunol**, 2009;182(12):7422–7429.
- SÁ-NUNES, A., OLIVEIRA, C. J. F. Sialogenins and other immunomodulators derived from blood feeding parasites. In: KINI, R. M., MCLANE, M. A., CLEMETSON, K. J., MARKLAND, F. S. JR., MORITA, T., eds. *Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside*. Springer, 2010.
- SCHLAYER, H.J. et al. Involvement of tumor necrosis factor in endotoxin-triggered neutrophil adherence to sinusoidal endothelial cells of mouse liver and its modulation in acute phase. **J Hepatol**, 1988; 7:239–249
- SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **Plos One**, 2010; 5(7):e11704.
- SEINO, K, et al. Contribution of Fas Ligand to T Cell- mediated hepatic injury in mice. **Gastroenterology**, 1997; 113(4): 1315-1322
- SOARES, M. B. P. et al. The vasoactive peptide Maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- $\alpha$  and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating. **J Immunol**, 1998; 160: 1811-1816.
- TAKEDA, K. et al. Critical contribution of liver natural killer T cells to a murine model of hepatitis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 2000;97(10):5498–5503
- TIEGS, G.; HENTSCHEL, J.; WENDEL, A. A T cell-dependent experimental liver injury in mice inducible by concanavalin A. **J Clin Invest**, 1992; 90(1): 196–203.
- TIEGS, G.; NIEHÖRSTER, M.; WENDEL, A. Leukocyte alterations do not account for hepatitis induced by endotoxin or TNF alpha in galactosamine-sensitized mice. **Biochem Pharmacol**, 1990; 40: 1317–1322.
- TIEGS, G.; WOLTER, M.; WENDEL, A. Tumor necrosis factor is a terminal mediator in galactosamine/endotoxin-induced hepatitis in mice. **Biochem Pharmacol**, 1989; 38:627–631.
- TODA G. et al. and the Japanese National Study Group of Autoimmune Hepatitis. Present status of autoimmune hepatitis in Japan - correlating the characteristics with international criteria in an area with a high rate of HCV infection. **J Hepatol**, 1997; 26: 1207-12.
- TORBENSON, M.; THOMAS, D.L. Occult hepatitis B. **Lancet Infect Dis**, 2002; 2: 479–486.

- VOLAREVIC, V. et al. Protective role of IL-33/ST2 axis in Con A-induced hepatitis. **J Hepatol**, 2012; 56: 26–33.
- WALDENSTRÖM, J. L. Blutproteine und Nahrungseiweiss. **Deutsch Z Verdau Stoffwechselkr**, 1950; 15:113–119.
- WANASEN, N. et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Med Vet Entomol**, 2004 Jun;18(2):191–199.
- WASLEY, A.; FIORE, A.; BELL, B.P. Hepatitis A in the Era of Vaccination. **Epidemiol Rev**, 2006; 28:101–111
- WASSERMAN, H. A.; SINGH, S.; CHAMPAGNE, D.E. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. **Parasite Immunol**, 2004; 26(6-7):295–306.
- WASSERMAN, H.A. **Modulation of mammalian immune effector cell functions by saliva of yellow fever mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. 2005. (Dissertation). University of Georgia, Athens, Georgia.
- WOOLBRIGHT, B. L., JAESCHKE, H. Role of the Inflammasome in Acetaminophen-induced Liver Injury and Acute Liver Failure. **J Hepatol**. 2017; 66:836–48.
- WU, Y.; TIAN, Z.; WEI, H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. **Front Immunol**, 2017; 8:1-18.
- XIE, Y. et al. Mechanisms of acetaminophen-induced cell death in primary human hepatocytes. **Toxicol Appl Pharmacol**, 2014; 279:266–74.
- ZAVAREH M.S.R. et al. Occult Hepatitis C Virus Infection in Patients With Autoimmune Hepatitis. **Hepat Mon**, 2014;14(8):e16089.