



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIOXIDANTE DA SALIVA DO *Aedes aegypti* EM MODELO DE SEPSE.

Rafaelli de Souza Gomes

Belém – PA
2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIOXIDANTE DA SALIVA DO *Aedes aegypti* EM MODELO DE SEPSE.

Autora: Rafaelli de Souza Gomes

Orientadora: Prof^a Dr^a Marta Chagas Monteiro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Belém – PA

2017

Dados internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde /UFPA

Gomes, Rafaelli de Souza.

Atividade imunomoduladora e antioxidante da saliva do *Aedes Aegypti* em modelo de sepse murina / Rafaelli de Souza Gomes ; orientadora, Marta Chagas Monteiro. — 2017.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Belém, 2017.

1. Sepse. 2. Saliva. 3. Aedes. 4. Antioxidantes. I. Título.

CDD: 22. ed.: 616.94

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rafaelli de Souza Gomes

Avaliação da atividade imunomoduladora e antioxidante da saliva do *Aedes aegypti* em modelo de sepse.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro (Orientadora)
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Prof. Dr. José Luiz Fernandes Vieira
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Prof. Dra. Cristiane do Socorro Ferraz Maia
Instituição: Instituto de Ciências da Saúde/UFPA

Belém- PA

2017

DEDICATÓRIA

A meus pais Hélio e Sílvia e a meu irmão Rafael que sempre acreditaram em mim e me ajudaram a transformar as pedras no caminho em degraus que me trouxeram até aqui. E ao time de Imunologia os quais junto comigo fizeram esse trabalho nascer.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da existência, pela constante presença em meu viver e por conceder-me a graça de concluir mais uma etapa nesta jornada chamada vida. Tenho certeza que a fé que tenho foi a principal responsável por eu não cair me dando forças durante as adversidades que a vida me trouxe durante o mestrado.

A meus pais Hélio e Sílvia. Acredito que o que motiva a acreditar em mim a voar o meu voo é a certeza de que tenho de que mesmo tudo de errado vocês sempre estarão aqui por mim. Obrigada por apoiarem as minhas escolhas, a me orientar, a compreender as minhas ausências, por me orientar sempre e sobretudo pelo amor que sempre nos uniu e me fortalece. Amo muito vocês.

A irmão Rafael, que sempre foi meu grande companheiro e que em toda sua calma e mansidão sempre mostrou sua sabedoria pra orientações, puxões de orelha, para a parceria que temos. Saiba que sou muito grata pela grande amizade, carinho e cuidado, que você tem comigo. Obrigada por ter sido minha fonte de desabafo e conselhos nos caminhos tortuosos que a vida me trouxe. Amo você.

A piku, pois amor entre homem e animal é inexplicável. Você sabe quando estou feliz ou triste. Não tem nada melhor que seu rabinho abanando de alegria. Te amo.

Ao time de imunologia: Kely, Ana Lígia, Valter, Jordano, Dávila e Walkyria (que seguiu, no meio do processo, em busca de seus sonhos). Vocês, também, são autores e responsáveis por cada resultado desse trabalho. Essa parceria que estabelecemos é o que mais me trará saudades. Formamos o melhor time que já vi. Foram 4 projetos simultâneos, força, parceria, estudo, trabalho duro, sábado, domingo, horas de trabalho, troca de ideias, sugestões e uma amizade bonita que surgiu.

A minha dinda Nilda, minha tia Mida, minha Tia Alzira, meu dindo e minha prima Luana. As memórias que tenho é de vocês sempre presentes mesmo que durante os meus 26 anos de vida nunca tenhamos morado na mesma cidade. Obrigada por terem orgulho de mim, por serem a melhor família que eu poderia ter.

A família Tufão, minha família paraense. Vocês são a prova que para ser família não precisa existir laço de sangue. Tio Toninho, dona Odete, tia Filó, tia Kandice, tia Larissa, tio Giovanni, tio Amaury, Givago, Juju, Juliana, Hanna, Bia, Clara e Mari, obrigado pelos almoços de

domingo, natal, ano novo, pelas histórias e principalmente pelo amor que é o que nos faz ser família.

A Wanessa, Daniellen, Sandro, Caê, Vitória e Fabrícia pelos 11 anos de amizade. Vocês estão comigo durante todo o processo de minha vida acadêmica. Amizade tem dessas coisas.

As minhas xuxus, Mari, Ari, Raiane e Suh. Vocês são o melhor presente do Ciências sem Fronteiras. Que os encontros anuais permaneçam que a vida continue a nos proporcionar nos mantermos uma na vida da outra.

As derrotadas, Mirian, Maisa, Fernanda, Stefania, Natasha, Hellen, Erica, Diandra e Milena. Quem diria que um Workshop traria vocês para mim? Vocês são fonte de boas risadas, de sintonia, de festa, de resenha, de confissões e de tudo de bom que vocês trouxeram juntas para a minha vida. Já disse, no momento oportuno o quão importante foi o momento que vocês entraram em minha vida.

A meus amigos de graduação que permanecem até hoje Wana, Milena e Klaylton. Continuamos trilhando o mesmo caminho e quem bom ainda compartilhar com vocês.

A Camile Bernardino que sempre tão prestativa e carinhosa se tornou uma grande e importante pessoa em minha vida.

A minha orientadora Marta, por ter sido minha fonte de conhecimento científico desde a graduação. Hoje quando me vejo corrigindo resumos para congresso, texto de relatório do PIBIC, percebo o quanto aprendi com a senhora. Obrigada por sempre partilhar seu conhecimento e nunca me tolir de crescer juntamente com o time de imunologia. A senhora nos permitiu ir longe, mesmo com todas as dificuldades que a pesquisa brasileira tem.

Ao seu Rui por ter demonstrado tanto afeto por mim, escutar do senhor que o carinho que foi construído entre nós era de pai e filha me emociona até hoje. O senhor é um grande exemplo de superar dificuldades e de que a educação é sempre o melhor caminho. Saiba da reciprocidade por todo esse afeto. Por consequência a Thays e a Malu que se tornaram pessoas muito importantes. Entre nós cresceu uma grande amizade e qualquer dia bato na porta de vocês.

À equipe do LABEIM, pelo companheirismo de cada um.

A professora Naná por tirar minhas dúvidas, por acreditar na minha capacidade e por todas as ajudas durante o mestrado.

A Cláudia e a Alessandra por sempre terem me ajudado no trabalho, por tornarem o ambiente de trabalho um bom lugar.

Ao Octávio Kishi, por ter me incentivado a sempre me aperfeiçoar. Sua força para buscar seu sonho era inspiradora a me querer fazer ser melhor. Obrigada pelos ensinamentos de técnica cirúrgica, me fizeram a cirurgiã oficial nos experimentos. Obrigada por cuidar da Apple, ela é o meu significado de saudade.

Ao PPGCF/UFGA, representadas pela Cléciane e Brasília, por todo o suporte com a parte burocrática, fazendo sempre o possível para resolver quaisquer problemas. Ao professor Zé Luis por ser o melhor coordenador que o programa poderia ter.

Ao Laboratório de Farmacologia da Professora Fani, era a minha segunda casa na UFGA. Todos os alunos contem sempre comigo.

Ao grupo de trabalho Wagner Barbosa pelas ajudas proporcionadas durante os dois anos de mestrado.

Aos meus amigos da turma PPGCF 2015/01 e demais colegas da pós-graduação, cujo convívio me permitiu conhecer pessoas muito boas.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos demais amigos, que conquistei ao longo desta caminhada.

EPÍGRAFE

Por trás das nuvens escuras sempre tem um céu azul.

RESUMO

GOMES, R.S. ATIVIDADE IMUNOMODULADORA E ANTIOXIDANTE DA SALIVA DE *Aedes aegypti* EM MODELO DE SEPSE. f.90. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2017.

A sepse é uma disfunção orgânica causada por uma resposta imune desregulada a uma infecção. A mesma tem em sua abordagem terapêutica inicial a utilização de antimicrobianos de amplo espectro, os quais não são suficientes para o controle da infecção, sendo necessário a busca por novas terapias focadas na interrupção da resposta inflamatória em cascata produzida pela invasão e disseminação de agentes patogênicos. Dessa forma, a saliva do *Aedes aegypti* apresenta características imunomoduladoras, com potencial de inibição de citocinas pró-inflamatórias, bem como a presença de peptídeos ativadores de óxido nítrico. Com isso, seria de grande interesse investigar o efeito imunomodulador da saliva em modelo animal de sepse. Neste sentido, camundongos foram pré-tratados com a saliva do *Aedes aegypti* sendo a sepse induzida pelo modelo de transfixação do coto-cecal. Após 12 e 24 horas as amostras foram coletadas, e avaliado a sobrevida, carga bacteriana, migração leucocitária e parâmetros oxidativo (NO, EROs, MDA, TEAC, DPPH e GSH). A saliva melhorou o prognóstico dos animais, aumentando a sobrevida e o peso. Além disso, reduziu a carga bacteriana e aumentou o influxo de monócitos no sangue. A saliva, também, mostrou efeito antioxidante por reduzir a produção de espécies reativas e aumentar a capacidade antioxidante, além de diminuir a peroxidação lipídica. Assim, a saliva foi capaz de inibir os danos causados pela sepse em animais *in vivo* melhorando seu prognóstico.

Palavra-chave: Sepse, *Aedes aegypti*, saliva, antioxidante.

ABSTRACT

GOMES, R.S. EVALUATION OF IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF *Aedes aegypti*'s SALIVA IN A SEPSIS MODEL f.90.Masters Dissertation, Post Graduation Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2016.

Sepsis is an organ dysfunction caused by a dysregulated immune response to an infection, the initial therapeutic approach to sepsis are broad spectrum antimicrobials, which is not sufficient for control of infection, requiring association with other therapies focused in the interruption of the inflammatory response chain, provided by the pathogens. In this way, the *Aedes Aegypti*'s saliva presents immunomodulatory features, with a potential pro inflammatory cytokine inhibition, as well as the presence of nitric oxide peptides activators. Therefore, it would be a great interest to search the saliva's immunomodulator effect in animal model sepsis. In this regards, mice were pre treated with *Aedes aegypti* saliva, and sepsis was induced by the cecal ligation and puncture. After 12 and 24 hours, the samples were collected, and evaluated the survival rate, bacteria level, leukocyte migration, and oxidative parameters (NO, EROs, MDA e TEAC). The saliva improved the animal prognostic, increasing the survival rate and weight. Furthermore, decreased the bacterial levels and increased the influx of monocytes. The saliva, in addition, presented antioxidant effects by reducing production of the reatives species, and increasing the antioxidant capacity, other than decrease the lipid peroxidation. Thus, the saliva was capable to inhibit damages caused by sepsis in animals *in vivo*, improving its prognostic.

Keyword: Sepsis, *Aedes aegypti*, saliva, antioxidant

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura da parede celular de bactérias	23
Figura 2. A Resposta Imune Inata e Adaptativa	24
Figura 3. Efeito prolongado da sepse na resposta imune inata	26
Figura 4. Efeito da sepse na resposta imune adaptativa. A sepse causa uma perda, significativa, de linfócitos T e B	28
Figura 5. A produção de espécies reativas por fagócitos.....	29
Figura 6. Cascata de coagulação na sepse	31
Figura 7. Ciclo de vida do mosquito <i>Aedes aegypti</i>	34
Figura 8. Mapa global da distribuição do <i>Ae. aegypti</i>	35
Figura 9. Localização e estrutura da glândula salivar de <i>Aedes aegypti</i>	35
Figura 10. Delineamento experimental in vivo e ex vivo.	40
Figura 11. Esquema da transfixação do coto-cecal com ligadura do colón.	41
Figura 12. Procedimento da CLP	42
Figura 13. Esquema dos procedimentos para a avaliação da carga bacteriana.....	44
Figura 14. Diferentes morfologias de leucócitos de camundongos.....	44
Figura 17. Taxa de sobrevivência dos animais Sham e com sepse por 16 dias	48
Figura 18. Peso corporal dos animais Sham e com sepse a partir do primeiro tratamento	49
Figura 19. Migração leucocitária no lavado peritoneal nos animais com sepse	51
Figura 20. Migração leucocitária no lavado peritoneal em animais com sepse	52
Figura 21. Produção de óxido nítrico no soro e lavado de animais com sepse	53
Figura 22. Produção de óxido nítrico nos órgãos de animais com sepse	54
Figura 23. Produção de malondialdeído no soro e peritônio de animais com sepse	55
Figura 24. Produção de malondialdeído nos órgãos dos animais com sepse	56
Figura 25. Liberação de espécies reativas de oxigênio de leucócitos peritoneais de animais com sepse	57
Figura 26. Capacidade antioxidante total no sangue e peritônio de animais com sepse.....	58
Figura 27. Capacidade antioxidante total nos órgãos de animais com sepse	59
Quadro 1. Critérios para sepse baseado na Conferência de Consenso de 2001....	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Score do Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) Relacionado a Sepsis	21
Tabela 2. Potenciais Estratégias Terapêuticas na sepsis	32
Tabela 3. Carga Bacteriana nos animais Sham e pré-tratados com salina, ceftriaxona e saliva após 12 horas de indução de sepsis.	49
Tabela 4. Carga Bacteriana nos animais Sham e pré-tratados com salina, ceftriaxona e saliva após 24 horas de indução de sepsis.	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Adenosina difosfato
<i>Ae.aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
AMP	Adenosina monofosfato
ATP	Adenosina trifosfato
CD	Células Dendríticas
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
CLP	Modelo de transfixação do coto-cecal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CTLA-4	Antígeno-4 Associado Ao Linfócito T Citotóxico
DAMPS	Padrões Moleculares Associados Aos Danos
DCF	Diclorodidrofluoreceína
DTNB	Ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FC	Frequência cardíaca
FR	Frequência respiratória
FT	Fator tecidual
FT	Fator Tecidual
G-CSF	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GSH	Glutationa reduzida
H2DCFH-DA	2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
IL	Interleucina
INF - γ	Interferon- γ
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IRA B	Ativador celular da resposta imune inata
K ₂ S ₂ O ₈	persulfato de potássio
KH ₂ PO ₄	Fostato de Potássio dihidrogenado
L-NAME	Inibidor competitivo da sintetase do óxido nítrico

LA	Lípido A
LAG-3	Gene Ativador De Linfócito 3
LPS	Lipopolissacarideo
MDA	Malondialdeido
MPO	Mieloperoxidase
Na ₂ HPO ₄	Fostato de sódio dibásico
NFkB	Factor nuclear kB
NK	Células exterminadoras naturais
NO	Óxido nítrico
NO ₂	Nitrito
NOX	NADPH oxidase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
O ₂	Oxigênio Molecular
OH [•]	Radical hidróxil
ONOO-	Peroxinitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de ativação plaquetária
PAI-1	Plasminogênio 1
PAM	Pressão arterial média
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão Fosfato-salino
PMN	Polimorfonuclear
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
qSOFA	<i>Quick Sequential Organ Failure Assessment</i>
RPMI	Instituto Memorial Park Roswell
SOFA	<i>Sequential Organ Failure Assessment</i>
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TIM-3	Proteína De Membrana 3 De Linfócito T
TBHP	Terc-butil-hidroperóxido
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNB	Ácido nitrobenzóico

T _{reg}	Linfócitos T regulador
TRL	Toll-Like
UA	Intensidade de fluorescência
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFPa	Universidade Federal do Pará
UTI	Unidade de Terapia Intensiva

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 Sepse	21
2.2 Fisiopatologia da sepse	22
2.2.1 A SEPSE E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA	24
2.2.2 O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA SEPSE.....	28
2.2.3 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS NA SEPSE.....	29
2.3 Terapia.....	31
2.4 Terapia com saliva de artrópodes hematófagos em outras doenças.....	33
2.5 Saliva do <i>Aedes aegypti</i>	33
2.5.1. O MOSQUITO.....	34
2.5.2 ATIVIDADE ANTI-HEMOSTÁTICA	36
3 OBJETIVO.....	38
3.1 Objetivo geral.....	38
Avaliar a atividade imunomoduladora e antioxidante da saliva do mosquito <i>Aedes aegypti</i> em modelo de sepse murina.....	38
3.2 Objetivos específicos	38
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	39
4.1. Animais em experimentação.....	39
4.1.1. COMITÊ DE ÉTICA	39
4.1.2. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EUTANÁSIA	39
4.2 Obtenção da saliva do <i>Aedes aegypti</i>	39
4.3 Experimento <i>in vivo</i> e <i>ex vivo</i>	40
4.3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS	40
4.3.2 MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR TRANSFIXAÇÃO DO COTO-CECAL	41
4.3.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA.....	42
4.3.4 OBTENÇÃO DE LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ORGÃOS	42
4.3.5 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA	43
4.3.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA	44
4.3.7 DOSAGEM DE ÓXIDO (NO) NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS.....	45
4.3.8 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	45
4.3.9 QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE EROS INTRACELULAR <i>ex vivo</i>	45
4.3.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL.....	46

4.3.11 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH).....	46
4.4 Análise estatística.....	47
5 RESULTADOS	48
5.1 Sobrevida e Avaliação do peso corporal	48
.....	49
5.2 Quantificação da carga bacteriana em vários tecidos.....	49
5.3 Migração leucocitária	50
5.3.1 SANGUE	50
5.3.2 LAVADO PERITONEAL	51
5.4 Produção de óxido nítrico	53
5.4.1 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO NO SORO E LAVADO PERITONEAL	53
5.4.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO NOS ÓRGÃOS	54
5.5 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA).....	55
5.5.1 PRODUÇÃO DE MDA NO SORO E LAVADO PERITONEAL	55
5.5.2 PRODUÇÃO DE MDA NOS TECIDOS	56
5.6 Liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	57
.....	57
5.7 Capacidade antioxidante total pelo método do TEAC.....	58
5.7.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NO SORO E LAVADO PERITONEAL	58
5.7.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NOS ÓRGÃOS	59
6 DISCUSSÃO	60
7 CONCLUSÃO PRELIMINAR	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	67
ANEXO	80
ANEXO 1	80

1 INTRODUÇÃO

A sepse é caracterizada como uma disfunção de órgãos potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada e exagerada do hospedeiro perante uma infecção (SINGER et al., 2016). Esta síndrome é um grave problema de saúde pública em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), sendo um desafio considerável e crescente aos cuidados de saúde. Durante a resposta imune normal contra agentes infecciosos é desencadeada um processo inflamatório, entretanto durante a sepse ocorre uma produção excessiva de mediadores e influxo celular para o foco infeccioso, levando a um desequilíbrio metabólico no organismo (ABEID; SOUZA; BASILE-FILHO, 1998).

Nesse sentido, após a infecção, a primeira linha de defesa no hospedeiro é realizada pela imunidade natural, tais como células fagocíticas e pela via alternativa do sistema complemento. Em seguida, é desencadeado uma resposta imune específica dependente de imunoglobulinas e células linfocíticas (BONE, 1994; CAWCUTT; PETERS, 2016). A resposta imune inata é mediada pelos receptores de reconhecimento padrão, como os receptores Toll-like (TLR) e o CD14, que reconhecem os patógenos ou seus produtos, identificados como padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) (DRIFTE et al., 2013; MEDZHITOV; JANEWAY, 1998). Na sepse, a resposta imune aguda e a excessiva produção de citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina - 1 (IL-1), que ativam e induzem a produção de mediadores pró-inflamatório, tais como Interferon- γ (INF - γ), IL-6, IL-8, IL-12, IL-17, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS), eicosanóides e enzimas proteolíticas (DOYLE; O'NEILL, 2006).

Depois de desencadeado o processo inflamatório, células fagocíticas são recrutadas para o sítio da infecção, a fim de destruírem os agentes invasores. Com isso, há aumento do consumo de oxigênio por essas células com a consequente produção de radicais livres juntamente com proteases e hidrolases que são capazes de provocar danos ao patógeno (ABEID; SOUZA; BASILE-FILHO, 1998). Essa reação é essencial para a defesa do hospedeiro, mas quando a ativação dessas células se torna descontrolada e acentuada pode ocorrer uma reação inflamatória generalizada na sepse (BOOMER et al., 2011a; SHUBIN; MONAGHAN; AYALA, 2011).

As estratégias de tratamento para a sepse são direcionadas a origem infecciosa e aos eventos fisiológicos que podem indicar mal prognóstico do paciente. Com isso,

a primeira linha de tratamento se refere a antibioticoterapia adequada, seguida pelo controle do comprometimento cardiovascular e respiratório (LOLIS; BUCALA, 2003). Todavia, uma terapia antimicrobiana, se inadequada ou tardia, é motivo de maior incidência de morte de pacientes. No entanto, até o momento, há a aprovação de poucos fármacos com ação antimicrobiana, por isso, há uma ampla investigação sobre novos tratamentos com ação anti-inflamatória e imunomoduladora os quais podem auxiliar e de maneira indireta podem garantir uma atividade antimicrobiana (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013a; LOLIS; BUCALA, 2003).

Nesse sentido, componentes salivares de artrópodes hematófagos têm despertado interesse por apresentarem componentes com ação anti-hemostática, imunomoduladora, anti-inflamatória, antimicrobiana entre outras. Dentre os insetos hematófagos, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), os mosquitos são os principais vetores de doenças emergentes e re-emergentes, sendo responsáveis por mais de 1 milhão de mortes/ano (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Recebe destaque a família Culicidae a qual inclui os gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, os mais importantes em termos de saúde pública.

Dentre as espécies, o *Aedes aegypti* é um dos principais vetores da Febre Amarela, febre Chikungunya, Dengue e Zika entre outras (CHHABRA et al., 2008; FITZSIMMONS; SHAH, 2016; SAN MARTIN et al., 2010; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). As infecções ocorrem durante o repasto sanguíneo dos mosquitos fêmeas do *Ae. aegypti*, que se alimentam de sangue do hospedeiro vertebrado para garantir o desenvolvimento de seus ovos. A obtenção do sangue pelo mosquito fêmea somente é possível após a inoculação da saliva no local da picada, que mantém a hemostasia e inibe resposta imune do hospedeiro (BIZZARRO et al., 2013a; FRANCISCHETTI et al., 2009; RIBEIRO, 1995). A hemostasia é mantida pelos componentes salivares com ação anti-agregante plaquetária, vasodilatadora e anticoagulante (FRANCISCHETTI et al., 2009).

Quanto a resposta imune, os componentes salivares podem levar a sensibilização no local da picada com a indução de reações imediatas e tardias pelo hospedeiro (BARROS et al., 2016; MACHAIN-WILLIAMS et al., 2012). Desta forma, seria de grande interesse, avaliar estes efeitos da saliva do *Ae. aegypti* em um processo patogênico com desequilíbrio imune e hemostático acentuado, como a sepse.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Sepses

A sepsis é uma disfunção de órgãos potencialmente fatal causada por uma resposta desregulada e exagerada do hospedeiro perante uma infecção (SINGER et al., 2016). No entanto, o terceiro consenso de definições para a sepsis e choque séptico (Sepsis 3) definido pela “*European Society of Intensive Care Medicine*” e a “*Society of Critical Care Medicine*”, reformulou com o antigo conceito de Síndrome da Resposta Inflamatória Sistêmica e Sepsis Grave, por se tratarem de definições inespecíficas e redundantes (SINGER et al., 2016). Do antigo conceito de 2001 foram mantidos apenas a nomenclatura de sepsis e choque séptico, nas quais as demais alterações ofereceram uma maior especificidade na descrição, diagnóstico, relato e tratamento (SINGER et al., 2016). Com isso, o diagnóstico da sepsis estabeleceu como critério clínico uma infecção suspeitada ou documentada com um aumento ≥ 2 pontos no “*Sequential Organ Failure Assessment*” (SOFA) (Tabela 1) e para pacientes internados em UTI o mínimo de 2 pontos no *quick SOFA* (qSOFA, SINGER et al., 2016).

Tabela 1. Score do *Sequential Organ Failure Assessment* (SOFA) Relacionado a Sepsis

Sistema	Score				
	0	1	2	3	4
Respiratório					
PaO ₂ /FiO ₂	>400 (53,3)	<400 (53,3)	<300(40)	<200 (26,7) com suporte respiratório	<100 (13,3) com suporte respiratório
Coagulação					
Plaquetas, x10 ³ /uL	≥ 150	<150	<100	<50	<20
Hepático					
Bilirrubina:mg/dL (umol/L)	<1,2	1,2 - 1,9 (20-30)	2 - 5,9 (33-101)	6 - 11,9 (102-204)	>12 (204)
Cardiovascular					
Pressão Arterial Média	≥ 70 mmHg	< 70mmHg	Dopamina <5; Dobutamina	Dopamina5-15; Epinefrina<0,1; Norepinefrina<0,1	Dopamina5-15; Epinefrina $\geq 0,1$; Norepinefrina>0,1
Nervoso Central					
Escala de Glasgow (coma)	15	13 - 14	10 - 12	6 - 9	<6
Renal					
Creatinina:mg/dL (umol/L)	< 1.2	1,2 - 1,9	2 - 3,4	3,5 - 4,9	>5
Débito Urinário (mL/d)	(110)	(110-170)	(171-299)	(300-440)<500	(440)<200

FiO₂: Fração de Oxigênio Inspirado; PaO₂: Pressão de Oxigênio Parcial.

Fonte: (SINGER et al., 2016)

Além disso, o conceito de choque séptico foi atualizado, na qual corresponde a sepse associada às alterações celulares e metabólicas que levam a um aumento expressivo na mortalidade do paciente (SINGER et al., 2016; SHANKAR-HARI et al. 2016). O diagnóstico clínico é similar da sepse acrescido do uso de droga vasopressora na manutenção da pressão arterial média (65 mmHg ou mais) e com lactato elevado >2 mmol/L (18 mg/dL) mesmo após reposição de fluidos (SINGER et al., 2016). Contudo, as novas definições ainda não foram completamente aceitas por importantes sociedades internacionais como o Instituto Latino Americano de Sepse, o Colégio Americano de Médicos Emergencistas e a Sociedade Canadense de Medicina Intensiva, por não acatarem aos critérios utilizados na definição (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2016).

Apesar dos avanços nos cuidados de saúde e no processo de definição, a sepse é responsável pela segunda maior causa de morte em UTI e a 10^a causa de mortalidade geral (AJROUCHE et al., 2013), sendo que em UTI's um quarto dos pacientes que desenvolvem sepse vão a óbito (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014; SILVA et al., 2004). No Brasil, a mortalidade de pacientes com choque séptico é de 64,2% enquanto no mundo é de 37,4% (INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE, 2015). Outros estudos estimam a ocorrência de 19 milhões de novos casos anualmente ao redor do mundo (ADHIKARI et al., 2010). Portanto, mesmo com uma melhor operacionalização clínica para o diagnóstico da sepse, o seu prognóstico é ruim com aumento significativo na sua incidência. Nesse sentido, uma maior compreensão do papel das interações hospedeiro-patógeno, a resposta das citocinas, a cascata de coagulação e suas interações multidirecionais são o caminho para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas na sepse.

2.2 Fisiopatologia da sepse

A sepse envolve uma resposta desregulada e exagerada do hospedeiro perante uma infecção. Um estudo com dados de 37 países avaliou 11.000 pacientes e identificou que na sepse as causas da infecção são, simples ou múltiplas, dos quais 57% dos casos foram por bactérias gram-negativas, seguido por bactérias gram-positiva (44%) e em 11% por fungos (STEARNS-KUROSAWA et al., 2011). Além disso, outro estudo realizado na Europa mostrou a incidência das infecções

bacterianas nos casos de sepse, nas quais as gram-negativas corresponderam a 62,2% e as gram-positivas 46,8% (MAYR; YENDE; ANGUS, 2014).

A classificação das bactérias em gram-positivas e gram-negativas, baseia-se nas características morfológicas da parede celular (Figura 02). As bactérias gram-positivas possuem uma membrana citoplasmática, seguida de uma camada espessa de peptidoglicano, juntamente com ácidos teicoico e lipoteicoico ancorados na parede celular (BROWN et al., 2015; LOLIS; BUCALA, 2003). Além disso, estas bactérias gram-positivas produzem potentes exotoxinas, como a a-toxina e (hemolisina) e streptolisina-O, as quais são proteínas secretadas onde a porção A é responsável por modificar a célula alvo levando à morte celular ou a outros efeitos patológicos, enquanto que a porção B se liga aos receptores de superfície celular e transloca a porção A para o citosol. Normalmente a toxina AB é sintetizada e segregada a partir do agente como uma forma inativa, sendo ativada através de uma clivagem proteolítica (SUN, 2012).

Por outro lado, as gram-negativas possuem uma membrana externa contendo moléculas de lipopolissacarídeo (LPS), seguida de uma fina camada de peptidoglicano, um espaço periplasmático e a membrana citoplasmática (BROWN et al., 2015; COHEN, 2002; LOLIS; BUCALA, 2003). A estrutura do LPS é formada de um lipídeo A, um núcleo externo e interno e um antígeno O, único para cada sorotipo (KABANOV; PROKHORENKO, 2010; LOLIS; BUCALA, 2003). O LPS é liberado na corrente circulatória após a morte ou a lise destas, ativando monócitos, macrófagos e leucócitos polimorfonucleares (PMNs) além de estimular as células hospedeiras a produzir diversas citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6.

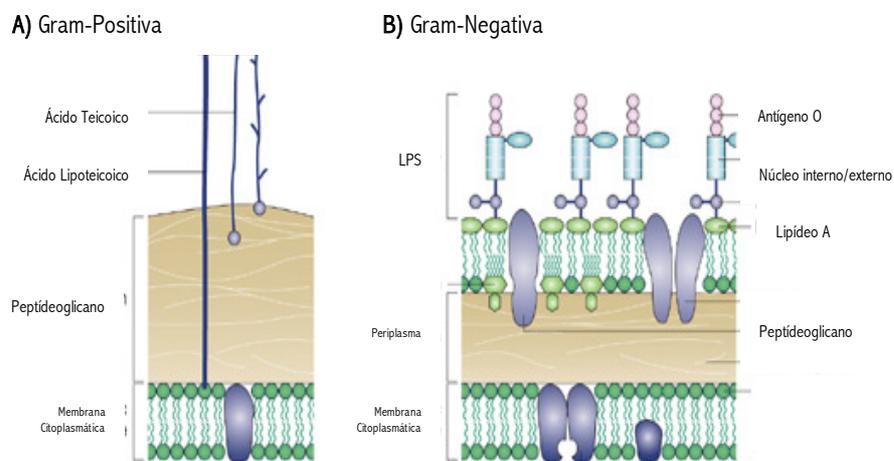


Figura 1. Estrutura da parede celular de bactérias. **A)** Gram-positivas composta de espessa camada de peptidoglicano com ácido teicoico e lipoteicoico; **B)** Gram-negativa composta de fina camada de peptidoglicano e lipopolissacarídeo. Fonte: Adaptado de (LOLIS; BUCALA, 2003)

2.2.1 A SEPSE E A RESPOSTA IMUNOLÓGICA

A resposta imune na sepse pode ser vista como uma desregulação mediada inicialmente por receptores imunológicos após uma infecção, levando a um desequilíbrio nas respostas imune inata e adquirida (Figura 3). A resposta imune inata corresponde a primeira linha de defesa contra os patógenos, que ocorre em intervalos de horas (DRANOFF, 2004; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013b). Por outro lado, a resposta imune adaptativa é ativada em intervalos de dias, com características de aumento da especificidade antigênica e memória imunológica, principalmente desencadeada por linfócitos (DRANOFF, 2004; HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013b). No entanto, para a ativação dos linfócitos há necessidade da interação entre os componentes do sistema imune inato que levam ao processamento e apresentação dos antígenos (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013b).

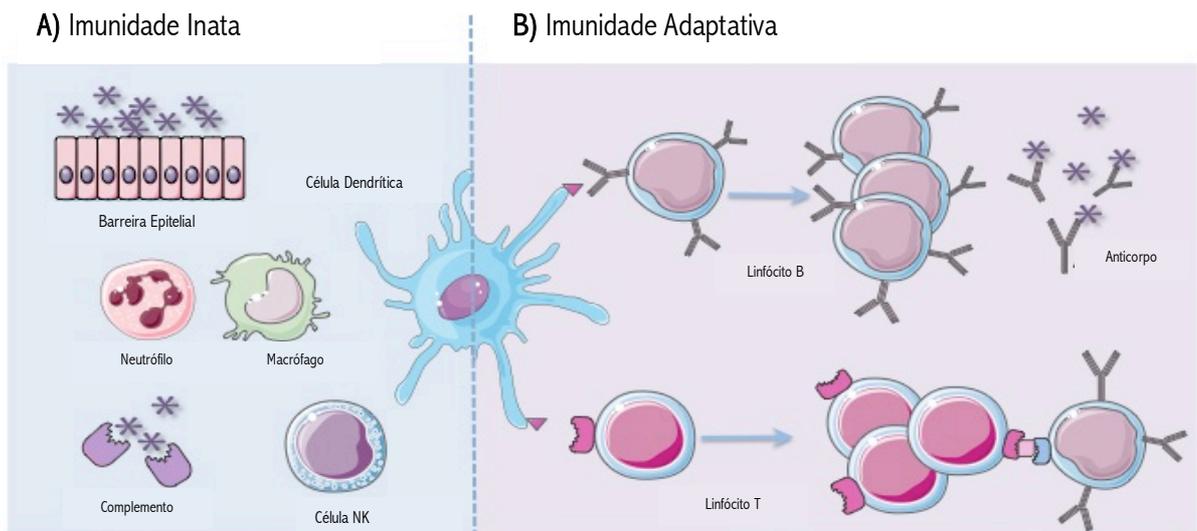


Figura 2. A Resposta Imune Inata e Adaptativa. **A)** A imunidade inata é constituída do sistema complemento, e diversos componentes celulares, incluindo granulócitos, macrófagos, células dendríticas e células Natura Killers; **B)** A resposta imune adaptativa consiste em linfócitos T e B, além de anticorpos.
Fonte: adaptado de laraslittlebcells.wordpress.com

2.2.1.1 Resposta imune inata

Células do sistema imune expressam receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que são responsáveis por iniciar rapidamente a resposta imune após a detecção de um dano tecidual ou infecção microbiana, como é o caso da sepse. Os danos teciduais são detectados através de moléculas expressas nos tecidos denominadas padrões moleculares associados aos danos (DAMPs), enquanto a

infecção é detectada através dos PAMPS (BIANCHI, 2007). Esses DAMPs e PAMPs irão ativar células do sistema imune inato, tais como os monócitos, macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células endoteliais, resultando na produção de mediadores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014; OPAL; ESMON, 2003).

Dentre as citocinas, o TNF- α e a IL-1 são as primeiras a serem liberadas por macrófagos residentes ativados, atuando em diferentes células (DINARELLO, 1997; SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013). Além disso, o TNF- α juntamente com a IL-1, induzem a secreção de outras citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8), mediadores lipídicos e EROS e ERNS. Em células endoteliais, o TNF- α aumenta a expressão das moléculas de adesão e de quimiocinas (NAKAE et al., 1999; SHIMAOKA; PARK, 2008), levando ao recrutamento de neutrófilos para o sítio inflamatório (LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005). Por outro lado, a ação de TNF- α e IL-1 em conjunto com IL-6, IL-8, IL-12, fator de ativação de plaquetas (PAF), quimiocinas, eicosanoides e anafilotoxinas C3a e C5a potencializam o influxo de neutrófilos nos tecidos (SCHULTE; BERNHAGEN; BUCALA, 2013).

Dentre as células do sistema imune inato, os neutrófilos são as primeiras a chegar no sítio da inflamação, tendo, sob condições normais uma vida útil de 24 horas. Todavia, na sepse, essas células sofrem um atraso na apoptose, permanecendo por mais tempo na circulação (REMICK, 2007). Além disso, há uma constante ativação destes neutrófilos nos pacientes com sepse, levando a presença dessas células em diferentes graus de maturação no local da infecção (DRIFTE et al., 2013). Outra disfunção celular ocorrida nesta patologia é a perda da atividade quimiotática e a produção de IL-10, uma citocina imunossupressora durante o processo da sepse (KOVACH; STANDIFORD, 2012).

Monócitos/macrófagos também são células importantes por sua atividade fagocítica com a eliminação de patógenos, assim como remodelamento tecidual após resolução da inflamação. Estas células liberarem citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 e IL-6, em resposta às endotoxinas e outros compostos bacterianos (CAVAILLON; ADIB-CONQUY, 2006). Com isso, o sistema imune desenvolveu um mecanismo de defesa chamado tolerância a endotoxina, nos quais monócitos/macrófagos levam a um aumento na produção de mediadores anti-inflamatórios, especialmente IL-10 e redução na apresentação de antígenos,

características que sugerem um prognóstico ruim na sepse (MONNERET et al., 2004; MUEHLSTEDT; LYTE; RODRIGUEZ, 2002).

Outras células importantes são as células dendríticas (CD) e as exterminadoras naturais (NK), que geralmente em casos de sepse estão em elevados níveis de apoptose, assim as poucas CD remanescentes tem sua atividade de apresentar antígenos prejudicada (PASTILLE et al., 2011; POEHLMANN et al., 2009). Além disso, as células NK circulantes tem sua atividade citotóxica e a secreção de citocinas diminuídas (FOREL et al., 2012; SOUZA-FONSECA-GUIMARAES et al., 2012). Desta forma, a sepse reflete uma complexa interação entre mecanismos pró e anti-inflamatórios na resposta imune inata, resumidas na figura abaixo:

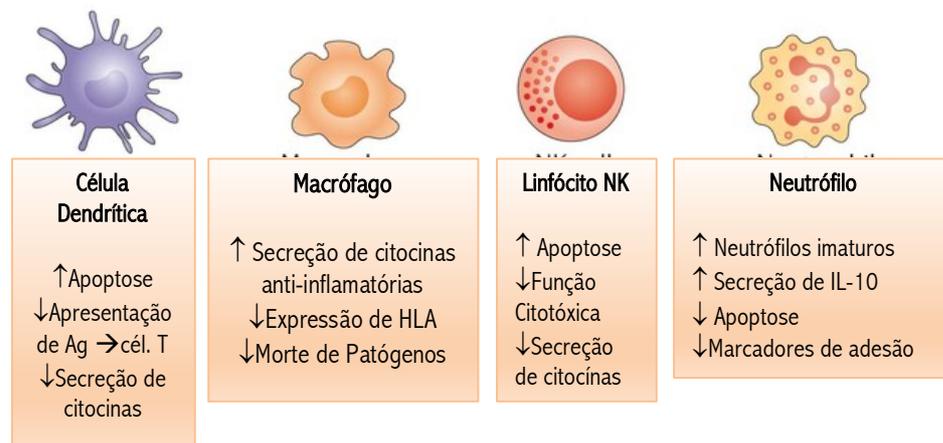


Figura 3. Efeito prolongado da sepse na resposta imune inata. A sepse possui um efeito diversificado e importante em todos os elementos celulares que compõe a resposta imune inata.

Fonte: Adaptado de (MUSZYNSKI; HALL, 2011)

2.2.1.2 Resposta imune adaptativa

O sistema imune adaptativo é composto por linfócitos T e B, que são células efetoras altamente específicas a patógenos. Esses linfócitos, em pacientes com sepse, muitas vezes se mostram diminuídos ocasionado pelo elevado índice fagocítico e processamento de antígeno mediado pela inflamação crônica nos tecidos (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014). Além disso, os linfócitos T adquirem a expressão de receptores inibitórios como o antígeno-4 associado ao linfócito T citotóxico (CTLA-4), proteína de membrana 3 de linfócito T (TIM-3), gene ativador de linfócito 3 (LAG-3) entre outras ao longo do tempo desta inflamação crônica. Com isso, este processo leva a exaustão da maioria das células T com perda da sua resposta

funcional, senescência replicativa, e morte destas células (BOOMER et al., 2011a, 2012).

Portanto, a exaustão de células T é um mecanismo fisiopatológico, recém-reconhecido, sendo um dos principais responsáveis pela imunossupressão na sepse. Este processo então resulta na incapacidade de ativar macrófagos e eliminar patógenos, aumentando assim a suscetibilidade as infecções secundárias (INOUE et al., 2014). Um estudo realizado por Boomer (2011) evidenciou que a exaustão celular no baço de pacientes que foram a óbito por sepse apresentavam a supressão profunda da produção de IFN - γ e TNF por células T estimuladas.

Desta forma, pacientes com sepse no início da infecção apresentam uma resposta inflamatória sistêmica, enquanto nos estágios tardios, desenvolvem uma imunossupressão (COHEN, 2002; HOTCHKISS et al., 2009). A constante liberação de TNF- α nos estágios iniciais da sepse, resultam na ativação adicional de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas que atuam em conjunto com o TNF- α na indução de apoptose de linfócitos T (HE; TING, 2002). Autópsias realizadas no baço e linfonodos de pacientes com sepse confirmou uma perda significativa tanto de linfócitos T CD4+ quanto CD8+ (BOOMER et al., 2011b).

Linfócitos T CD8+ parecem ser afetados em seu repertório de células virgens, afetando a capacidade do hospedeiro responder a uma nova infecção (CONDOTTA et al., 2013). Com isso, linfócitos T citotóxicos são os mais suscetíveis a apoptose, o que reduz a quantidade de células, diminuem a sua capacidade citotóxica e secreção de citocinas (KASTEN et al., 2010). Quanto aos linfócitos T CD4+, além da apoptose, também apresentam redução na sua capacidade proliferativa em resposta a um antígeno (MOHR et al., 2012). Além disso, pacientes com sepse também apresentam maior indução do perfil de resposta Th₂ (anti-inflamatória) com mudança na secreção de citocinas resultando em um estado geral de anergia (DE et al., 2000; MOHR et al., 2012; O'SULLIVAN et al., 1995).

Por outro lado, os linfócitos T regulador (T_{reg}) são mais resistentes a apoptose e estão em maior quantidade em pacientes com sepse (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013a). As células T_{regs} desempenham um papel importante na patogênese da sepse com uma considerável supressão da resposta imune adaptativa (CAO et al., 2015). A imunossupressão durante a sepse também pode ser desencadeada pelos linfócitos B, principalmente pela subpopulação chamada de ativador celular da

resposta imune inata (IRA B), que podem produzir fator de crescimento estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF) (MONSERRAT et al., 2013; RAUCH et al., 2012; ROBBINS; SWIRSKI, 2012). A figura 4 abaixo sumariza a resposta imune adaptativa durante a sepse.

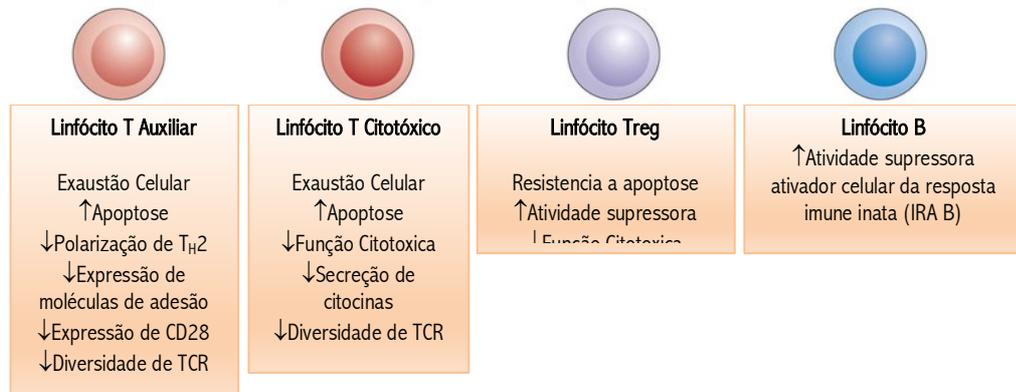


Figura 4. Efeito da sepse na resposta imune adaptativa. A sepse causa uma perda, significativa, de linfócitos T e B. Por outro lado, as células T_{reg} são mais resistentes a apoptose ocasionada pela sepse.
 Fonte: adaptada de (MUSZYNSKI; HALL, 2011)

2.2.2 O PAPEL DO ESTRESSE OXIDATIVO NA SEPSE

Durante a sepse, células estimuladoras da inflamação, como macrófagos e neutrófilos produzem grande quantidade de EROs e ERNs (HUET et al., 2011). Estas células durante a fagocitose produzem EROs por via do “burst” oxidativo, que consiste na metabolização do oxigênio molecular (O₂), mediado pelo complexo enzimático NADPH oxidase (NOX), a ânion superóxido (O₂^{•-}) seguido da desmutação em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (CROSS; SEGAL, 2004; YESILKAYA et al., 2013). Durante o processo, o H₂O₂ produzido durante a reação de Fenton pode sofrer redução para formar radical hidroxil (OH[•]), que é altamente reativo, ou pode ser metabolizado pela enzima mieloperoxidase (MPO) resultando na formação de ácidos, como pode ser observado na Figura 6 (KEHRER; KLOTZ, 2015; REPETTO; SEMPRINE; BOVERIS, 2012).

Paralelamente a liberação de MPO, também ocorre a produção das ERNS através da ativação das vias de transdução de sinal (FIALKOW; WANG; DOWNEY, 2007; GALLEY, 2011; KAYMAK; BASAR; SARDAS, 2012). Essas vias podem ativar os genes da enzima da óxido nítrico sintase induzida (iNOS), levando a síntese de NO (LEVER; MACKENZIE, 2007). O NO em baixas concentrações mantém a homeostase vascular, incluindo a modulação do tônus vascular, a regulação local de crescimento celular entre outras atividades. (KAMPOLI et al., 2012). Todavia, em altas

concentrações, o NO é capaz de se ligar ao $O_2^{\cdot-}$ formando peroxinitrito ($ONOO^-$, SHAO et al., 2010).

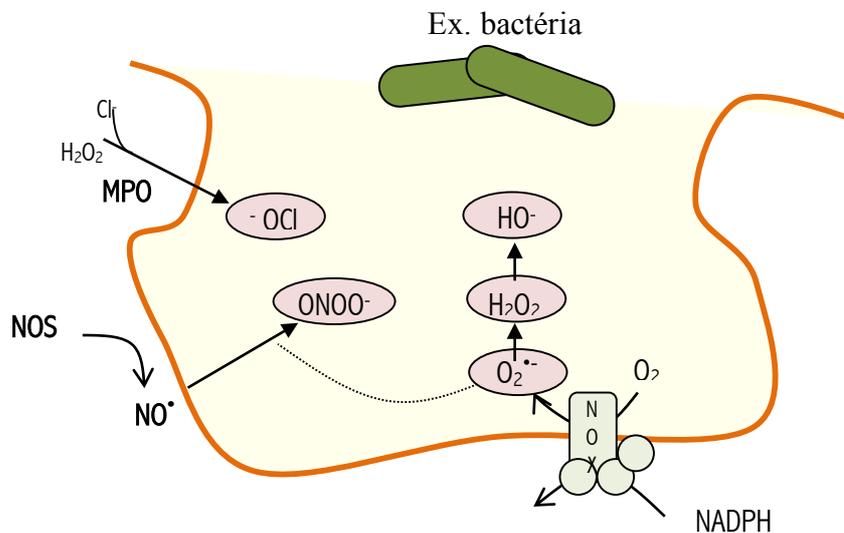


Figura 5. A produção de espécies reativas por fagócitos. Os fagócitos são capazes de gerar espécies reativas por meio do “oxidative burst”, mediado por NADPH oxidase (NOX). Peróxido de hidrogênio produzido durante a reação, pode sofrer redução para a forma do radical hidroxil, ou ser metabolizado pelo mieloperoxidase (MPO) com formação de ácidos. O óxido nítrico sintase (NOS) irá produzir óxido nítrico, outro radical que pode originar outras espécies reativas, como o peroxinitrito.
Fonte: Adaptado de (KEHRER; KLOTZ, 2015).

Nos pacientes com sepse, os níveis de EROs e ERNs estão elevados e os sistemas antioxidantes se apresentam diminuídos, principalmente das enzimas superóxido dismutase, glutatona peroxidase e também há depleção do tripeptídeo glutatona (MUHL et al., 2011; SULIMAN et al., 2004; ZANG et al., 2007). Como consequência desse desequilíbrio, as espécies reativas causam uma série de modificações reversíveis e irreversíveis tóxicas nas biomoléculas levando a danos em células próprias, inclusive no endotélio (CIMOLAI et al., 2015; PIZARRO; TROSTER, 2007).

2.2.3 ALTERAÇÕES HEMODINÂMICAS NA SEPSE

Durante a sepse, diversos componentes da microcirculação são afetados, tais como as células endoteliais que revestem o interior dos microvasos, células do músculo liso, glóbulos vermelhos, leucócitos e componentes de plasma sanguíneo (INCE, 2005). Desta forma, é ocasionado uma disfunção na regulação desses componentes, nas quais as células endoteliais são incapazes de desempenhar a sua função reguladora, desencadeada por falhas nas vias de transdução de sinal, levando a perda da comunicação eletrofisiológica e no controle do músculo liso (EDUL et al.,

2012). Em seguida, ocorre deformidade nas hemácias que ocasionam obstrução vascular e ativação sistêmica da resposta inflamatória, levando a um estado pró-coagulante com formação de microtrombos e diminuição do fluxo tissular (HARDAWAY; WILLIAMS; VASQUEZ, 2001; LEVI; TEN CATE, 1999; OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016).

A extensão da ativação da cascata de coagulação durante a sepse pode variar de proporções insignificantes para a ocorrência de coagulação intravascular disseminada (CIVD) (OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016; RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). Esta variação depende da expressão de PAMPS, tais como LPS, citocinas inflamatórias ou endotoxinas, que resulta no aumento da expressão de FT e continua ativação da coagulação (HARDAWAY; WILLIAMS; VASQUEZ, 2001; LEVI; TEN CATE, 1999; OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016). Com a estimulação da produção de FT, este componente se liga ao fator VIIa ativando-o, em seguida o complexo fator VIIa/FT ativa o Fator X em Xa. O fator Xa converte a protrombina em trombina, resultando na clivagem do fibrinogênio em fibrina (HENKIN et al., 2007).

Sob condições normais, o equilíbrio entre a coagulação e o sistema fibrinolítico impede a coagulação intravascular (RITTIRSCH; FLIERL; WARD, 2008). No entanto, a atividade das vias anticoagulantes naturais está diminuída em pacientes com sepse, levando a deposição de coágulos de fibrina na microvasculatura (LEVI; TEN CATE, 1999; OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016). Esta fibrinólise deficiente na sepse ocorre devido ao aumento na liberação do inibidor de PAI-1, que limita a capacidade de eliminação de fibrina (OKAMOTO; TAMURA; SAWATSUBASHI, 2016; RUSSELL, 2006). Além disso, há uma diminuição da síntese de trombosmodulina e o receptor endotelial da proteína C, impedindo a ativação da proteína C e a consequente inativação do fator Va e VIIa, como observado na figura 7 (HOFFMAN, 2003; INNERHOFER; KIENAST, 2010).

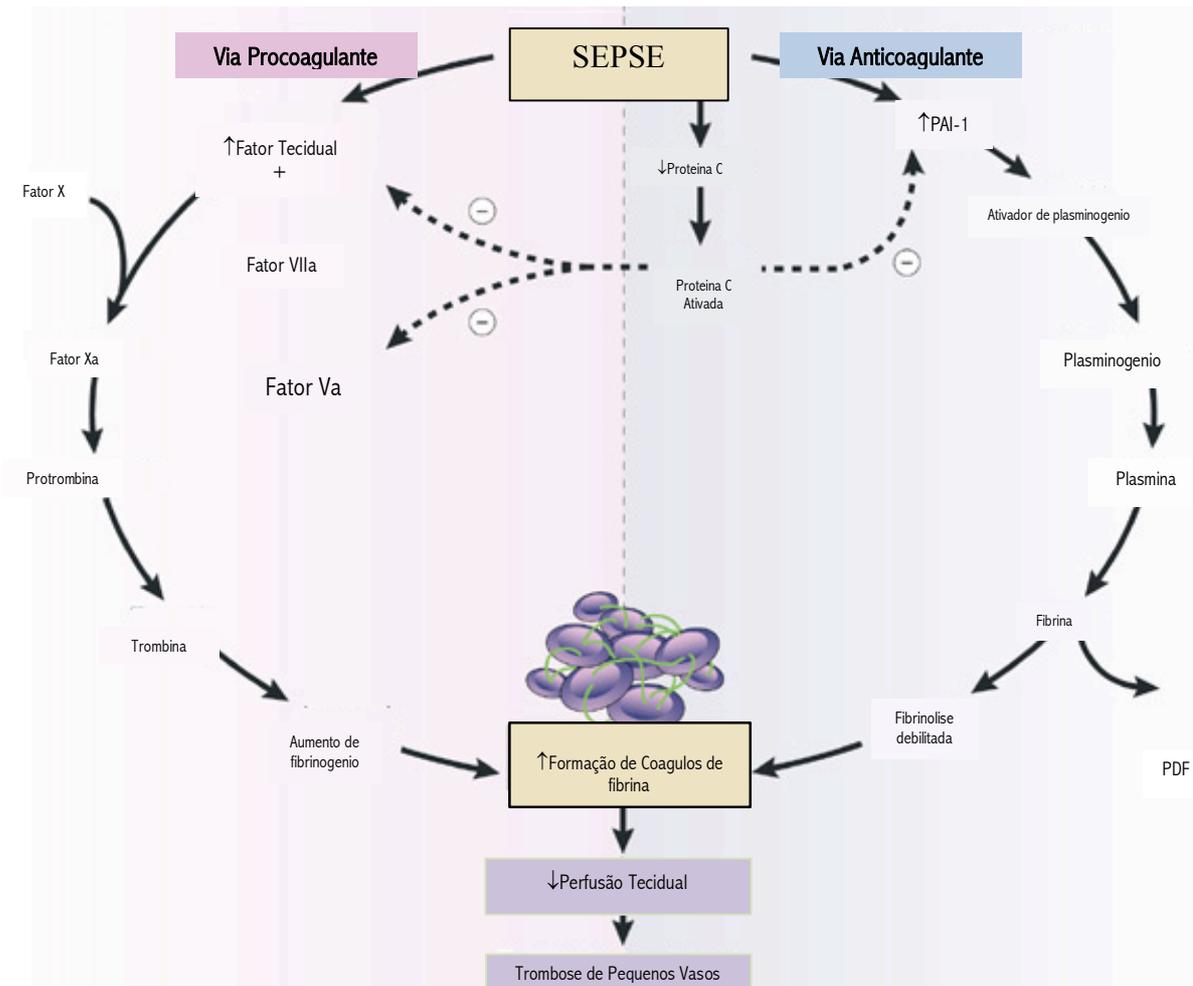


Figura 6. Cascata de coagulação na sepse. O fator tecidual é exposto, após indução, por padrões moleculares associados a agentes patogênicos. O FT se liga ao fator VIIa, ativando-o e o complexo fator VIIa/tromboplastina ativa o Fator X em Xa. O fator Xa converte a protrombina em trombina, o que por sua vez resulta na clivagem do fibrinogênio em fibrina. Durante a sepse há aumento da síntese do inibidor do ativador do plasminogênio 1 (PAI-1) e diminuição da Proteína C, com supressão da fibrinólise resultando no aumento de coágulo de fibrina.

Fonte: Adaptado de (LOLIS; BUCALA, 2003)

2.3 Terapia

Em pacientes com sepse, as primeiras horas são as mais importantes no processo evolução ou involução da doença. Terapias de suporte como corticosteroides, terapia nutricional, imunomoduladores e antioxidantes na Unidade de Terapia Intensiva são essenciais para um bom prognóstico (ABEID; SOUZA; BASILE-FILHO, 1998; FINK; WARREN, 2014). Assim, a terapia empírica com antimicrobianos é a abordagem inicial na sepse, sendo que os antibióticos de escolha são os de amplo espectro, como carbapenêmicos e cefalosporinas de 3° e 4° geração (ABEID; SOUZA; BASILE-FILHO, 1998; LOLIS; BUCALA, 2003).

Além disso, é necessária uma reposição volêmica como terapia de suporte,

devido uma grande perda de fluidos durante o processo da sepse (BONE et al., 1992; SILVA et al., 2004). Esta reposição deve ser rápida e agressiva, minimizando a hipóxia tecidual (CARVALHO; TROTTA, 2003; GAUER et al., 2013). Caso a reposição seja insuficiente, o uso de medicamentos vasoativos, como as catecolaminas, é iniciado (DELLINGER et al., 2008). Outros vasoconstritores também têm sido testados como a vasopressina e a angiotensina II, em pacientes com sepse refratária aos vasoconstritores tradicionais (CARVALHO; TROTTA, 2003; DELLINGER et al., 2008).

Com isso, novas terapias vêm sendo pesquisadas como mostrado na tabela 02, sendo que a proteína C ativada humana é a mais promissora para a diminuição da mortalidade da sepse. A proteína C ativada é uma proteína endógena que inibe a trombose e o processo inflamatório. Entretanto, embora o seu uso tenha sido aprovado pelo “*Food and Drug Administration*”, a sua administração deve ser feita com cautela visto que pode provocar hemorragias, havendo assim necessidade de uma seleção rigorosa dos pacientes para a realização dos testes (CARVALHO; TROTTA, 2003; PAPPALARDO et al., 2016).

Tabela 2. Potenciais Estratégias Terapêuticas na sepse

Alvo	Agente	Ação
Endotoxinas	Anticorpos monoclonais	Efeito neutralizante ou opsonizante
Complexo LPS-LBP	Anticorpos anti-LBP proteína BPI	↓ Ativação dos macrófagos induzidos pelo LPS Bloqueio da resposta inflamatória induzida pelo LPS.
TNF	Anticorpos monoclonais anti TNF Receptores solúveis TNF	Ligação e inativação de TNF-α Ligação do TNF-α livre.
Interleucina-1	Receptor antagonista da IL-1	Interferência no receptor de ligação IL-1.
Citoquinas/toxinas circulantes	Corticosteróides, pentoxifilina, amrinona, MSEC.	Bloqueio da síntese de TNF Depuração exógena citocinas/toxinas circulantes.
PAF	Antagonista receptor PAF Acetil-hidrolase do PAF Inibidor da fosfolipase A2	Interferência receptor de ligação do PAF ↓ níveis de PAF e leucotrienos.
Tromboxane	Dazoxiben, cetoconazol	Inibição da sintase-tromboxane.
Óxido Nítrico	Inibidor da sintase NO (L-NAME).	Redução na produção de NO.
Radicais livres O₂	N-acetilcisteína, selênio, vitaminas C e E	Inativação/redução na produção de radicais livres O ₂ .
Metabólitos ácido araquidônico	Indometacinas, ibuprofeno antagonistas receptores leucotrienos	Inibição das vias cicloxigenase e lipoxigenase Bloqueio de receptores de prostaglandinas.
Coagulação/ Imunidade	Antitrobina III, inibidor da via fator tissular, proteína C ativada Imunoglobulinas, interferon-γ, G-CSF	Anticoagulação Anticoagulação, ↓ mediadores pró-inflamatórios, inibição da ativação de neutrófilos, ↓ produção de citocinas, ↓ ativação de plaquetas.

LPS: lipopolissacarídeo, LBP: proteína de ligação de lipopolissacarídeo, BPI: proteína bactericida de aumento de permeabilidade, TNF: fator de necrose tumoral, IL-1, MSEC: métodos de substituição extracorpórea, PAF: fator de ativação plaquetária, NO: óxido nítrico, L-NAME (N-nitro-L-arginina metil-éster): inibidor competitivo da sintetase do óxido nítrico, G-CSF: fator estimulante de colônias de granulócitos.

Fonte: (CARVALHO; TROTTA, 2003)

Neste sentido, a investigação sobre novos tratamentos tem focado cada vez mais em interromper a resposta inflamatória induzida pela invasão e disseminação dos agentes patogênicos (HOTCHKISS; MONNERET; PAYEN, 2013a; LOLIS; BUCALA, 2003). Portanto, os artrópodes hematófagos são excelentes candidatos por sua enorme biodiversidade do planeta e ampla variedade de constituintes salivares com diferentes atividades farmacológicas.

2.4 Terapia com saliva de artrópodes hematófagos em outras doenças

O filo *Arthropoda* possui aproximadamente 1.096.660 espécies descritas, dentre elas, existem aproximadamente 14.000 espécies que se alimentam de sangue (BIZZARRO et al., 2013b; RIBEIRO, 1995). O repasto sanguíneo realizados pelos insetos fêmeas favorece a maturação dos ovos das fêmeas que é fundamental para seu ciclo de vida (BARROS et al., 2016; MACHAIN-WILLIAMS et al., 2012). Durante este repasto, os insetos fêmeas injetam a sua saliva que na manutenção da homeostasia e inibição da resposta imune do hospedeiro, podendo algumas vezes seus componentes salivares induzir reações alérgicas no organismo (BIZZARRO et al., 2013a; SALES-CAMPOS et al., 2015).

Desta forma, diversos estudos mostram a atividade imunomoduladora dos componentes salivares dos hematófagos em diversas doenças. Hotchkiss e colaboradores (2003) observaram a atenuação da severidade da artrite murina após a administração do extrato salivar de *Phlebotomus papatasi*. A saliva de *Lutzomyia longipalpis*, também apresentou redução na migração de neutrófilos, da nocicepção e da liberação de citocinas IL-17, TNF- α e IFN- γ em modelo experimental de artrite murina (ALMERAS et al., 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Além de modelos de artrite, vários estudos mostraram o efeito imunomodulador de moléculas salivares em encefalomielite autoimune experimental, na qual a saliva do carrapato *Ixodes scapularis* foi capaz de prevenir os sinais clínicos da doença, levando a uma redução nos níveis de IFN- γ e IL-17e na proliferação de células T (BARRETT; HIGGS, 2007; BIZZARRO et al., 2013a; WEAVER; LECUIT, 2015).

2.5 Saliva do *Aedes aegypti*

2.5.1. O MOSQUITO

Dentre os artrópodes hematófagos, os mosquitos são os principais responsáveis por mais de 1 milhão de mortes/ano por serem os vetores de diversas doenças emergentes e reemergentes (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2016). Esses insetos pertencem à ordem Diptera, família *Culicidae* e os gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles* são os mais importantes vetores de parasitas causadores de diversas doenças humanas (BARROS et al., 2016; BIZZARRO et al., 2013a).

Nesse contexto, o *Aedes aegypti* em áreas de clima tropical, é conhecido por ser vetor primário de doenças emergentes e re-emergentes como a febre amarela, Chikungunya, dengue e zika (CHHABRA et al., 2008; FITZSIMMONS; SHAH, 2016; MONATH; VASCONCELOS, 2016; SAN MARTIN et al., 2010). O *Ae. aegypti*, como pode ser observado na figura 8, apresenta coloração castanha, frequentemente ornamentado com manchas de escamas branco-prateadas sendo seu ciclo de vida dividido em quatro fases: ovos, larva, pupa e adultos (CDC,2016). Os ovos são depositados próximos à superfície da água eclodindo em 2-3 dias; a fase larva, essencialmente aquática, é um período de alimentação e crescimento (5 a 10 dias); a fase pupa é aquática, não requer alimentação e é o período de transição do hábito aquático pelo terrestre durando cerca de 2 a 3 dias; a última fase, a adulta, representa a fase reprodutiva do inseto ocorrendo a sua dispersão (CDC,2016).

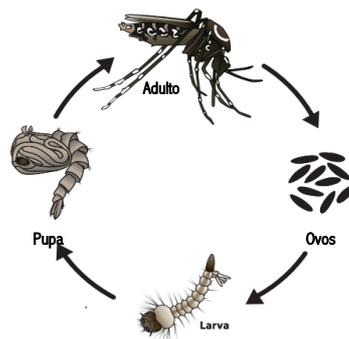


Figura 7. Ciclo de vida do mosquito *Aedes aegypti*.
Fonte: Adaptado de CDC,2016.

Seus hábitos são diurnos com predileção por temperaturas tropicais e seu habitat está intimamente ligado às condições domiciliares ou peridomiciliares, decorrentes da ação humana, as quais interfere na crescente proliferação nos centros urbanos (ALMERAS et al., 2010; CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Essas características biológicas e comportamentais do mosquito *Ae. aegypti* auxiliam no aumento da sua

distribuição geográfica, que cresceu drasticamente nos últimos 50 anos, contribuindo para a maior incidência das doenças transmitidas por este vetor, conforme mostrado na figura 9 (BARRETT; HIGGS, 2007; BIZZARRO et al., 2013a; WEAVER; LECUIT, 2015).

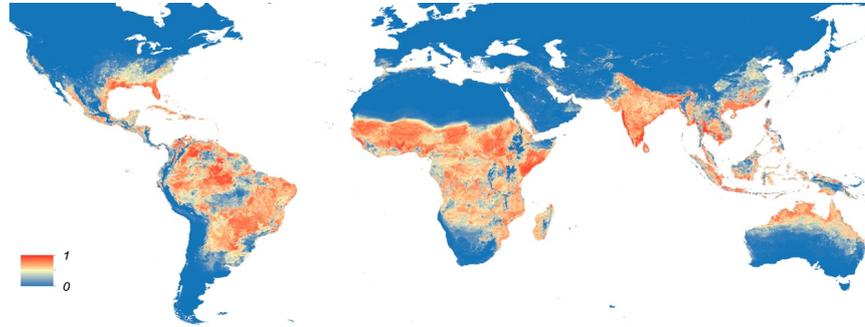


Figura 8. Mapa global da distribuição do *Ae. aegypti*. O mapa mostra uma menor probabilidade (0 azul) a uma maior probabilidade (1 vermelho) da presença do mosquito.
Fonte: (KRAEMER et al., 2015)

A transmissão de doenças pelo mosquito ocorre durante o repasto sanguíneo, que o inseto ao injetar a sua saliva libera juntamente patógenos na derme do hospedeiro (BARROS et al., 2016; MACHAIN-WILLIAMS et al., 2012). Com isso, as glândulas salivares são estruturas importantes em albergar vários agentes patogênicos no interior do inseto. As glândulas salivares de fêmeas adultas de *Aedes* tem uma estrutura tri-lobada, que consiste em um lobo medial e dois lobos laterais, conforme mostrado na Figura 10.

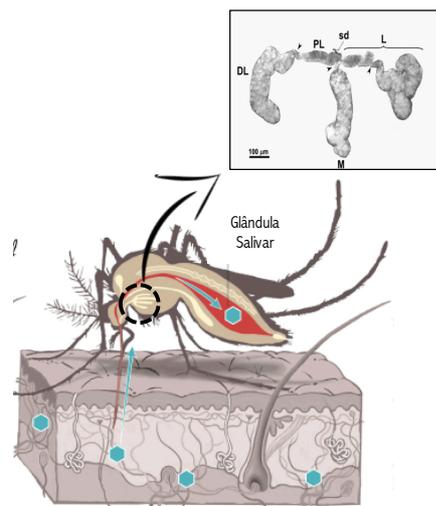


Figura 9. Localização e estrutura da glândula salivar de *Aedes aegypti*.

Fonte: Adaptado de (JUHN et al., 2011) e <https://www.washingtonpost.com/apps/g/page/national/how-a-bloodsucker-transmits-the-zika-virus/1964/>

Cada lobo da glândula compreende um epitélio secretor em torno de um duto salivar por onde a saliva é liberada (JUHN et al., 2011). Essa saliva é produzida por

células secretoras das regiões proximal e distal dos lobos laterais e da região distal do lobo medial (JUHN et al., 2011). As glândulas salivares do *Ae. aegypti* contêm aproximadamente 1-3µg de proteína, das quais metade são injetadas no hospedeiro vertebrado (MELO et al., 2015). Desta forma, a glândula salivar do mosquito produz e secreta moléculas como glutathion s-transferase, citocromo c oxidase, NADH ubiquinona, heme peroxidase animal, thioredoxina (ANEXO 1). Estas moléculas podem ajudar tanto na digestão de açúcares e néctares para sua alimentação, quanto no repasto podendo afetar a constrição vascular, a coagulação sanguínea, a agregação plaquetária e a imunidade do hospedeiro (RIBEIRO; ARCA, 2009; RIBEIRO; MANS; ARCA, 2010; SCHNEIDER; HIGGS, 2008).

2.5.2 ATIVIDADE ANTI-HEMOSTÁTICA

Em relação à hemostasia, as principais ações da saliva sobre o organismo são: antiagregante de plaquetas, vasodilatadora e anticoagulante (CONWAY et al., 2014). A atividade antiagregante plaquetária é desempenhada, principalmente, pela aegyptina que é uma proteína que se liga ao Fator de von Willebrand, no sítio de interação com o colágeno impedindo a ligação dos dois, dificultando o prosseguimento da cascata de coagulação (CHAGAS et al., 2014; MCCRACKEN et al., 2014). Outro componente, a apirase é uma enzima que catalisa a hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e adenosina difosfato (ADP) liberados por células lesadas ou plaquetas ativadas, e assim reduzem a ativação e o recrutamento de plaquetas (SMITH et al., 2002; WU et al., 2013). Por último, as proteínas D7 é adaptada a se ligar a aminas biogênicas as quais podem aumentar a agregação plaquetária (CALVO et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007).

Em relação à ação vasodilatação as sialocininas tipo I e II são peptídeos da família das taquicininas. Tais componentes causam constrição da musculatura lisa, porém, quando no endotélio promovem intenso relaxamento causado pela liberação de NO (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992). Por último, as serpinas (inibidores de serinoproteases) desempenham um papel importante no controle e regulação da coagulação inibindo tanto a via intrínseca quanto a extrínseca através da inibição específica do fator Xa (GETTINS, 2002; HUNTINGTON, 2014; STARK; JAMES, 1995).

2.5.3 ATIVIDADE IMUNOMODULADORA

Outro desafio enfrentado pelos mosquitos ao realizar a hematofagia é a inibição da resposta imune dos vertebrados atuando direta ou indiretamente em células imunes efetoras como células dendríticas, macrófagos e células T, sendo que até o momento, poucas moléculas que exercem estas atividades foram descritas (ANDRADE et al., 2005; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). No entanto, a saliva do *Ae. aegypti* é capaz de inibir a secreção de TNF- α em mastócitos de ratos (BISSONNETTE; ROSSIGNOL; BEFUS, 1993). Além disso, a saliva foi capaz de inibir a proliferação de linfócitos de camundongo *in vitro* induzindo apoptose nessas células (linfócitos T CD4 +, T CD8+ e B) por um mecanismo dependente de caspase 3 e 8 (BIZZARRO et al., 2013a; WANASEN et al., 2004).

Schneider et al. (2004) demonstraram, em murinos, que a saliva do *Ae. Aegypti* foi capaz de promover a troca de um padrão Th1, para um padrão Th2, diminuindo a produção de IFN- β , IFN- γ , e um aumento na expressão de IL-4 e IL-10. Wasserman, et al. (2004), também, mostraram que a saliva inibiu a produção de citocinas pró inflamatórias (GM-CSF e TNF- α) e reduziu as citocinas do perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ), contudo, um efeito moderado foi observado nas citocinas de perfil Th2 (IL-4 e IL-5). Esse aumento e diminuição na expressão de citocinas foi observado em uma proteína isolada da saliva do *Ae. Aegypti* (SAA-4), a qual aumentou significativamente a expressão de IL-4 e diminuiu a expressão de IFN- γ (BOPPANA et al., 2009).

Estudos em modelos animais injetados com a saliva mostraram que a saliva foi responsável pela sensibilização após as picadas dos mosquitos, visto que seus antígenos pode levar as reações imediatas e tardias na pele, aumentando o número de eosinófilos e a expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 (BARROS et al., 2016). Em outro estudo, Sales-Campos, et al. (2015), utilizou a saliva em um modelo de doença inflamatória intestinal, onde houve a redução da expressão de IFN- γ , TNF- α , IL-1 β e IL-5, além da diminuição da área inflamatória local.

Neste sentido, as propriedades farmacológicas da saliva do *Ae. aegypti* começam a ser melhor elucidadas. Com a necessidade de novas terapias para a sepse que não só tenham atividade antimicrobiana, como imunomoduladora tem-se a saliva como candidato terapêutico.

3 OBJETIVO

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade imunomoduladora e antioxidante da saliva do mosquito *Aedes aegypti* em modelo de sepse murina.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito da saliva do *Aedes aegypti* na sobrevivência de animais com sepse;
- Avaliar o efeito da saliva do *Aedes aegypti* na modulação da resposta imune de modelo animal de sepse, através da avaliação dos seguintes parâmetros: carga bacteriana e migração leucocitária;
- Avaliar o efeito da saliva do *Aedes aegypti* no estresse oxidativo em modelo animal de sepse através da dosagem de: óxido nítrico, produção de EROS, capacidade antioxidante total, malondialdeído, DPPH e GSH;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais em experimentação

4.1.1. COMITÊ DE ÉTICA

O projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), obedecendo-se aos critérios, de acordo com as normas estabelecidas por Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais. O mesmo foi aprovado sob o parecer nº: 5919210516 (ANEXO 2)

4.1.2. OBTENÇÃO DOS ANIMAIS E EUTANÁSIA

Foram utilizados Camundongos das linhagens Swiss machos, pesando em torno de 20 a 35 gramas, oriundos do Biotério Central do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFPA. Todos os animais foram mantidos sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12 horas, tendo livre acesso à alimentação e água. Além disso, foi dada a devida atenção aos aspectos éticos das pesquisas sendo o número de animais restritos ao mínimo necessário. Todos os animais foram mortos pelo método recomendado pela Resolução Normativa nº 6, de 10 de julho de 2012 do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

A preconização da eutanásia para a Ordem Rodentia é o da exsanguinação por punção cardíaca após anestesia geral. Os animais 12 e 24 horas após a realização do modelo experimental da sepse foram anestesiados para a eutanásia com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) intra-peritoneal por meio do aprofundamento da anestesia seguido de exsanguinação por punção cardíaca. Todos os animais experimentais mortos foram

4.2 Obtenção da saliva do *Aedes aegypti*

A saliva do *Aedes aegypti* foi fornecida pelo Dr. Pedro Roosevelt Torres Romão (Laboratório de Imunologia / Departamento de Ciências Básicas da Saúde / Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Brasil). A concentração protéica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington,

DE, EUA) e alíquotas foram armazenadas a -80°C até o momento de uso.

4.3 Experimento *in vivo* e *ex vivo*

Os animais foram submetidos a transfixação do coto-cecal, a fim de induzir sepse. Os mesmos foram tratados com a solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Após o tratamento os animais foram sacrificados e realizadas as devidas coletas. Um delineamento experimental é demonstrado na figura abaixo:

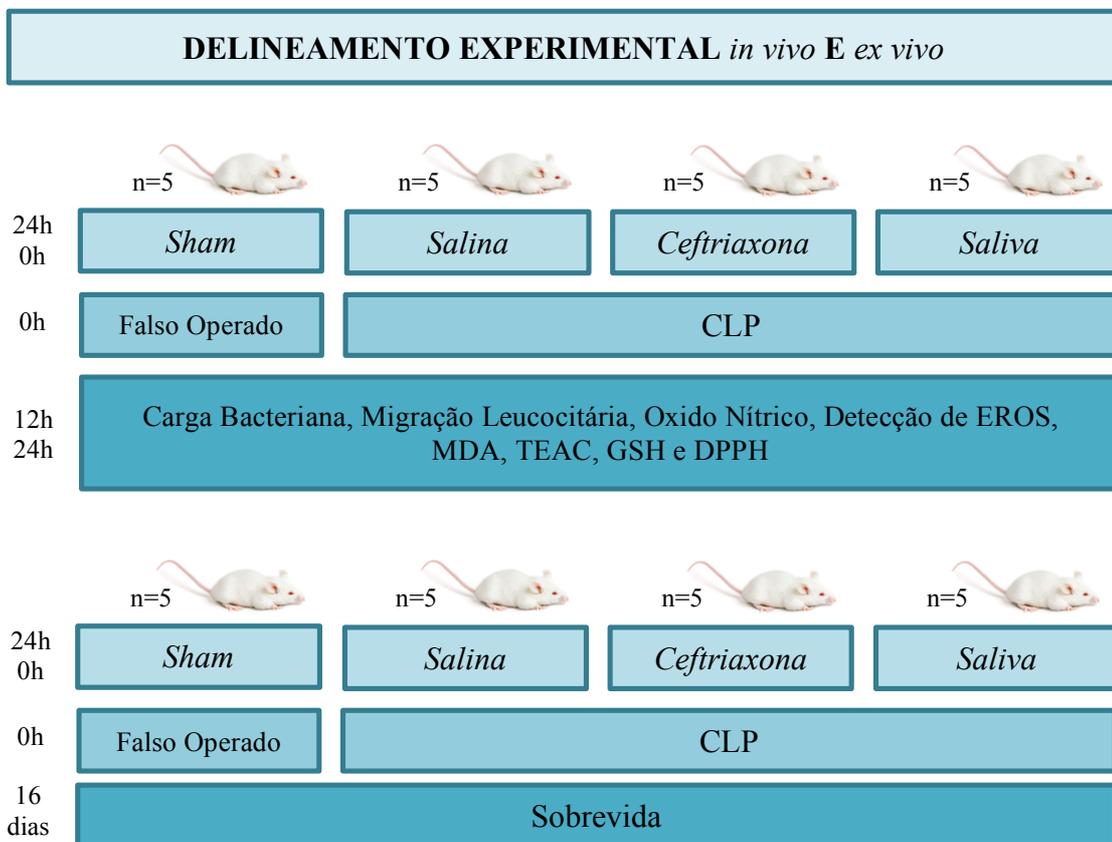


Figura 10. Delineamento experimental *in vivo* e *ex vivo*.
Fonte: Autor

4.3.1 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Baseado nos dados anteriores, 80 animais serão divididos nos seguintes grupos experimentais:

- GRUPO 1 (Sham): Animais receberam exatamente os mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da indução de sepse – 10 animais;

- GRUPO 2 (CLP+Salina): Animais receberam tratamento com solução salina estéril intraperitoneal (150uL) 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 10 animais;
- GRUPO 3 (CLP+Cef): Animais receberam tratamento com ceftriaxona por via intraperitoneal 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 10 animais
- GRUPO 4 (CLP+SV): Animais receberam tratamento com Saliva de *Ae. aegypti* por via Intraperitoneal 24 horas antes e no tempo anterior a indução de sepse – 10 animais

4.3.2 MODELO DE SEPSE INDUZIDA POR TRANSFIXAÇÃO DO COTO-CECAL

O modelo de transfixação do coto-cecal (CLP) é considerado um modelo de alto padrão, uma vez que mimetiza a sepse decorrente de uma peritonite causada por uma apendicite ou diverticulite. Inicialmente foi proposto em ratos, sendo adaptado para o uso em camundongo de acordo com a metodologia de Cuenca et al. (2010).

Para a realização da indução da sepse, os camundongos foram anestesiados com uma solução de cetamina (100mg/kg) e xilazina (10mg/kg), na proporção de 1:1. Posteriormente, foi realizada a depilação da parede abdominal e a assepsia do campo operatório com iodopovidona e álcool a 70°. Foi realizada uma pequena incisão e o ceco foi, então, exteriorizado com auxílio de uma pinça cirúrgica. Com um fio de algodão foi realizado a ligadura do ceco a um centímetro da válvula ileocecal. Após a ligadura, o coto isolado do ceco foi transfixado 2 vezes com uma agulha de 22 gauss a partir do ponto de ligadura até a porção mais distal do ceco como mostrado na figura 12 (D'ACAMPORA; LOCKS, 2014).

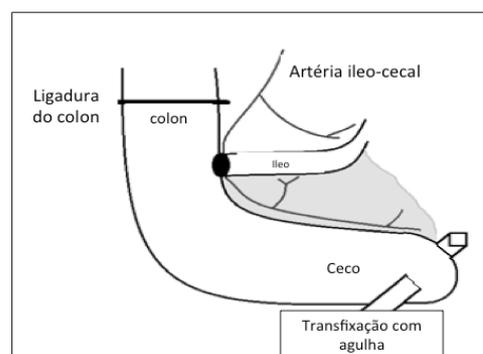


Figura 11. Esquema da transfixação do coto-cecal com ligadura do colón.
Fonte: Adaptado de d'Acampora e Locks, 2014.

Logo após, o ceco foi levemente comprimido para extravasamento do conteúdo fecal. Para os animais do grupo Sham, o ceco foi exteriorizado sem a realização da transfixação. Em seguida, o ceco foi recolocado na cavidade peritoneal e o animal foi suturado com fio de nylon 3-0. Todos os animais receberam hidratação com 1 ml de solução fisiológica a 0,9%, por via subcutânea, para reposição de fluidos (Figura 13). Durante o tratamento foi administrado bupremorfina (0,05 a 0,1mg/kg) para as dores provenientes do procedimento cirúrgico, sendo os animais colocados em gaiolas pós-operatória individuais, sob luz incandescente por 1 hora.

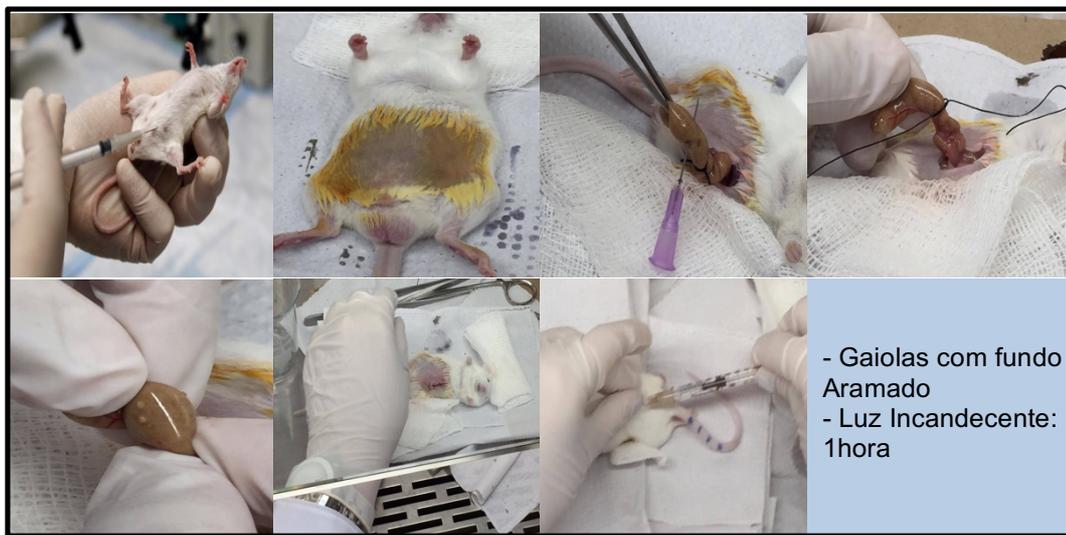


Figura 12. Procedimento da CLP. (A-B) Administração anestésico por via intraperitoneal e assepsial; (C, D e E) Ligadura, transfixação e exposição das fezes; (F) Sutura após a CLP com fio de nylon 3-0; (F) Camundongo após a sutura região abdominal; (G) Administração de 1mL de solução fisiológica 0,9%; (H) Cuidados após a CLP. Fonte: Autor.

4.3.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIDA

Após a realização da CLP, os animais foram observados por 16 dias a cada 12 ou 24 horas sendo anotados os pesos e os horários de óbito. Foi construída uma curva de sobrevivência dos animais em relação ao tempo decorrido após o procedimento.

4.3.4 OBTENÇÃO DE LAVADO PERITONEAL, SANGUE E ORGÃOS

4.3.4.1 Coleta do Lavado Peritoneal

Após 12 e 24 horas de indução de CLP, os animais foram submetidos à sedação, na proporção de 1:1, por via intraperitoneal. A coleta do lavado peritoneal

consistiu na lavagem do peritoneo com 3mL de solução salina tamponada fosfatada 1x (PBS) acrescida de EDTA 1mM (New Prov[®]). As amostras foram, então, armazenadas em tubos tipo falcon de 15 ml devidamente identificados. Para as análises no conteúdo do sobrenadante, o mesmo foi obtido através de centrifugação (5 minutos a 1500rpm) e congelado em freezer -80 °C até o momento das análises.

4.3.4.2 Coleta do sangue

Após a sedação foi realizada a coleta da amostra de sangue, por via intracardíaca após 12 e 24 horas de indução de CLP (Figura 14). A obtenção do soro deu-se por centrifugação (5min a 3000rpm) sendo todas as amostras devidamente identificadas. O soro foi mantido em freezer -80 °C até o momento das análises.

4.3.4.3 Coleta de órgãos: fígado, baço, pulmão e coração

Após a coleta do lavado peritoneal e do sangue dos animais foi realizado a coleta dos órgãos. Cada órgão foi coletado, lavado com PBS 1x e armazenados em tubos do tipo eppendorf de 1,5mL até o momento de preparação do homogeneizado. O mesmo foi realizado durante 5 minutos em (Ultra Turrax T25 Basic[®]) na presença de PBS 1X. Foi realizada centrifugação por 10 min a 3000rpm e o sobrenadante coletado e armazenado em freezer -80°C até o momento das análises com as amostras devidamente identificadas.

4.3.5 AVALIAÇÃO DA CARGA BACTERIANA

Para a realização deste ensaio foram utilizadas as amostras coletadas após 12 e 24h da CLP. Para a quantificação da carga bacteriana, o sangue, o lavado peritoneal e o homogeneizado de órgãos foram utilizados e foram realizadas diluições na proporção de 1:10 e 1:100. As amostras foram semeadas (10 uL) por esgotamento, sob condições estéreis, em placas de Petri contendo Ágar Müeller Hinton (KASVI[®]). As placas de cultura foram incubadas por 24 horas a 37 °C e o número de unidades formadoras de colônia (UFC) quantificadas manualmente (Figura 15).

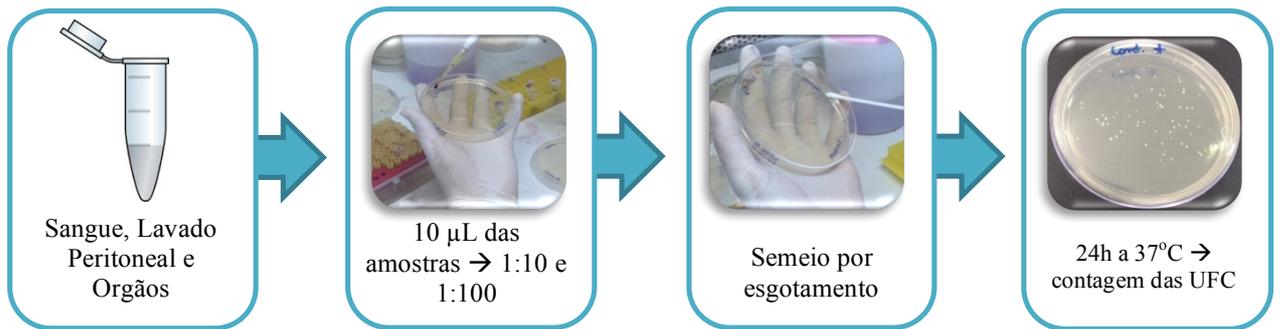


Figura 13. Esquema dos procedimentos para a avaliação da carga bacteriana.
Fonte: Autor

4.3.6 AVALIAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA

Foi realizada a avaliação da migração leucocitária no lavado peritoneal e no sangue após 12 e 24h de indução de sepse. Para a migração leucocitária do lavado peritoneal, a contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer e expressa como número de 10^6 células/mL. A contagem diferencial foi realizada com 100 células diferenciando os tipos celulares de acordo com Lindstrom et al. 2015, a partir do lavado preparado em citocentrífuga (Inbras[®]) e corado pelo método de May Grunwald Giemsa (Figura 16). Os resultados foram expressos como número de mononucleares e neutrófilos presentes no lavado peritoneal $\times 10^6$ /cavidade. Para a migração leucocitária no sangue, a quantificação foi feita baseada nos dados expressos no hemograma completo e os resultados expressos em mm^3 .

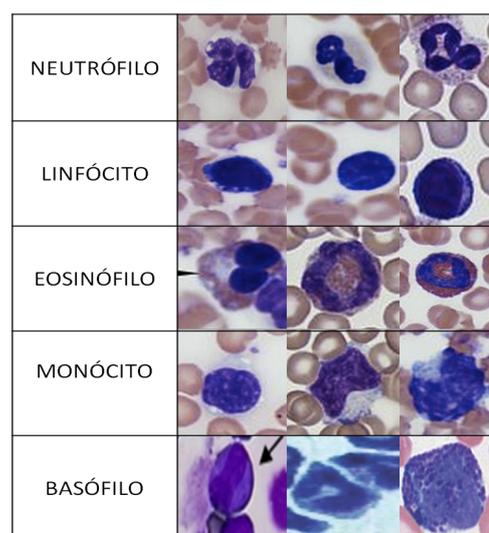


Figura 14. Diferentes morfologias de leucócitos de camundongos.
Fonte: Adaptado de Linstrom, et al.,2015 e Lee & McGarry, 2007.

4.3.7 DOSAGEM DE ÓXIDO (NO) NITRICO EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

O NO foi mensurado pela concentração de nitrito (NO_2) foi mensurada pela reação de Griess. Foram utilizadas amostras de soro, lavado peritoneal e órgãos de todos os grupos. Volumes iguais de sobrenadante e do reagente de Griess foram incubados por 10 min à temperatura ambiente a leitura foi realizada em leitor de microplaca a 550 nm. A concentração de NO_2 foi determinada a partir de uma curva-padrão feita com NaNO_2 (STUEHR; MARLETTA, 1985).

4.3.8 DETERMINAÇÃO DE MALONDIALDEIDO (MDA) EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Esta técnica baseia-se na reação do MDA e outras substâncias com o ácido tiobarbitúrico (TBA; Sigma-Aldrich[®]), em pH baixo e temperatura elevada, formando o complexo MDA-TBA de cor rósea, com absorvância em 535 nm.

O procedimento técnico foi realizado de acordo com fundamentos propostos por Kohn e Liversedge (1944), adaptados por Percário et al. (1994), método que consiste no preparo inicial do fosfato monobásico de potássio (KH_2PO_4 75 mM, Synth[®]) em água acidificada (pH 2,5). Esta solução é utilizada na preparação do TBA (10 nM). Adiciona-se 500 μl de amostra à 1000 μl da solução de ácido tiobarbitúrico 10 nM. Em seguida leva-se ao banho-maria (95°C x 60 min); após a incubação deixa-se esfriar a temperatura ambiente; adiciona-se 4,0 ml de álcool 1-butílico, homogeneiza-se bem em vórtex e posteriormente submete-se a centrifugação a 175 x g (15 min); coleta-se 3,0 ml do sobrenadante para leitura espectrofotométrica a 535 nm. Utilizou-se como padrão o 1,1,3,3, tetrahidroxipropano (Sigma-Aldrich[®]) para a realização da curva padrão.

4.3.9 QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE EROS INTRACELULAR *ex vivo*

A quantificação de EROS intracelular foi realizada de acordo com Ferreira-Cravo et al. (2007). O lavado peritoneal (2×10^5 cél/mL), coletado dos grupos experimentais, foram encubados com 40 μM de terc-butil-hidroperóxido (TBHP Sigma-Aldrich[®]) por 30 em estufa com 5% de CO_2 a 37 °C. A leitura foi realizada com 10 μM

de 2,7-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFH-DA; Sigma-Aldrich[®]), um composto não fluorescente que se difunde passivamente através das membranas biológicas. O H₂DCFH-DA é hidrolisado por esterases intracelulares a diclorodihidrofluoreceína (DCF), um composto que após interação com EROS presentes no meio intracelular gera subprodutos fluorescentes. Desta forma, o conteúdo de EROS foi medido pela oxidação do DCF em espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de emissão e de excitação de 520 nm e 485nm, respectivamente. Todos os dados foram corrigidos através da fluorescência de background. A quantidade de EROS intracelular foi expressa em intensidade de fluorescência (UA).

4.3.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL (TEAC)

Foi determinada de acordo com a capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromono-2-carboxílico; Sigma-Aldrich[®]) é um potente antioxidante análogo hidrossolúvel da vitamina E. Foi seguido o método proposto por Miller et al. (1993) modificado por Re et al. (1999). Trata-se de uma técnica colorimétrica baseada na reação entre o ABTS (Sigma-Aldrich[®]) com persulfato de potássio (K₂S₂O₈; Sigma Aldrich[®]), produzindo diretamente o radical cátion ABTS^{•+}, cromóforo de coloração verde/azul. A adição de antioxidantes a este radical cátion pré-formado o reduz novamente a ABTS, em escala dependente da capacidade antioxidante, concentração de antioxidantes e duração da reação. Isto pode ser mensurado por espectrofotometria pela observação da mudança na absorbância lida a 734nm durante cinco minutos (Fento[®]). Assim, foi determinada a atividade antioxidante total da amostra, sendo calculada a sua relação com a reatividade do Trolox como padrão, através da realização de curva padrão sob as mesmas condições. Os resultados foram expressos como TEAC no mmol de Trolox por quilograma.

4.3.11 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A determinação dos níveis intracelulares da forma reduzida da GSH baseia-se na capacidade da GSH em reduzir o ácido-5,5-ditiobis-2-nitrobenzóico (DTNB, Sigma-Aldrich[®]) para ácido nitrobenzóico (TNB), o qual foi quantificado por

espectrofotometria em comprimento de onda de 412 nm (VASCONCELOS et al., 2007). Para as determinações das concentrações de GSH será realizada a 1ª leitura da amostra (T0), em seguida será adicionado 100 µL de DTNB e após 3 minutos será 2ª leitura da amostra (T3) para que seja determinada a concentração de GSH expressa em µg/ml.

3.3.12. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL PELA CAPTURA DO RADICAL LIVRE (DPPH)

A técnica foi adaptada de Rufino et al. (2007). O método baseia-se na transferência de elétrons onde, por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar (DPPH). O DPPH que possui cor púrpura é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos foi determinado o percentual de seqüestro de radicais livres.

4.4 Análise estatística

Todos os dados serão avaliados pela Análise de Variância (ANOVA) de uma via, com correção pelo teste de Tukey. Os dados de cada grupo experimental serão expressos como a média \pm desvio padrão. A probabilidade aceita como indicativa da existência de diferenças significantes será de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

Para todos os experimentos os animais foram divididos em controle cirúrgico (sham) e com indução de CLP, os quais foram pré - tratados com salina 0,9%, ceftriaxona (20 mg/kg) e com saliva (3,5 µg/mL). Para a avaliação da taxa de sobrevivida, os animais foram avaliados por 16 dias e como indicativo de saúde dos animais foi avaliado o seu peso corporal. Em todos os outros experimentos foi avaliado o sangue e/ou lavado peritoneal e/ou órgãos (baço, coração, fígado e pulmão) nos tempos de 12 e 24 horas.

5.1 Sobrevida e Avaliação do peso corporal

A Figura 17 mostra que os animais com sepse pré-tratados com salina morreram em até 6 dias após a indução da CLP e os pré-tratados com ceftriaxona morreram após 7 dias. Por outro lado, todos os animais sham e pré tratados com a saliva sobreviveram por pelo menos 16 dias (100% sobrevida).

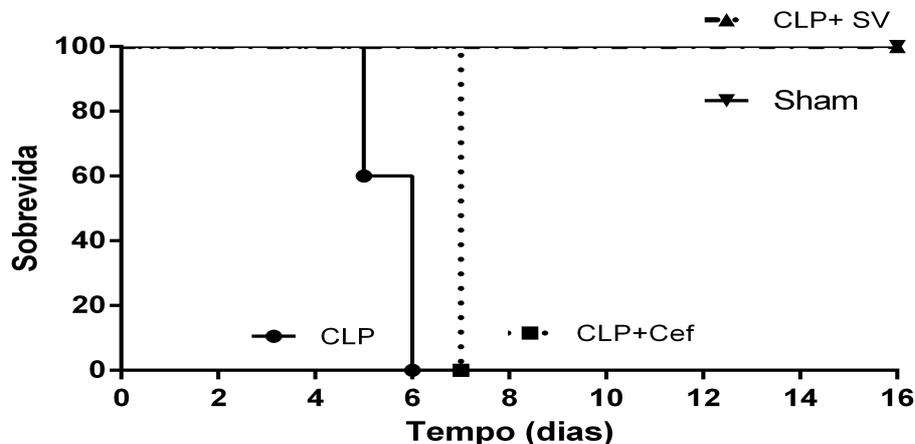


Figura 15. Taxa de sobrevivida dos animais Sham e com sepse por 16 dias. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=2/grupo): Sham e com sepse induzida: pré-tratados com solução salina 0,9% (CLP), Ceftriaxona (CLP+Cef) e saliva (CLP+SV).

Quanto ao peso corporal, o grupo sham apresentou aumento do peso corporal, progressivamente, durante os 16 dias. Os animais CLP pré-tratados com salina ou ceftriaxona tiveram uma perda de peso corporal até o seu óbito. Por outro lado, os animais CLP pré-tratados com a saliva somente tiveram perda de peso até o 5º dia, recuperando o seu peso inicial no 6 dia, obtendo valores similares ao controle Sham (Figura 18).

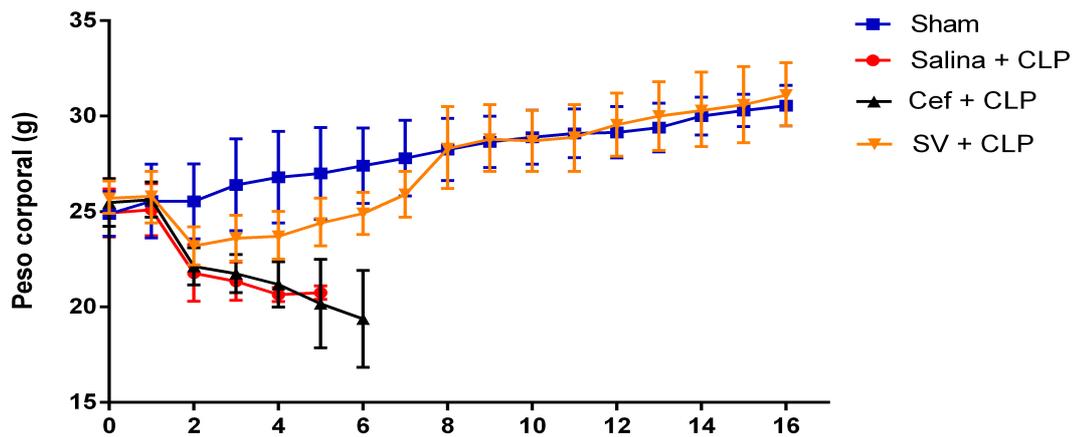


Figura 16. Peso corporal dos animais Sham e com sepse a partir do primeiro tratamento. Os animais foram divididos nos seguintes grupos (n=2/grupo): Sham e com sepse induzida: pré-tratados com solução salina 0,9% (CLP), Ceftriaxona (CLP+Cef) e saliva (CLP+SV).

5.2 Quantificação da carga bacteriana em vários tecidos

A carga bacteriana foi quantificada a partir do número de UFCs presentes no sangue, lavado peritoneal e nos órgãos. No tempo de 12 horas, o grupo sham não apresentou carga bacteriana em nenhuma dos tecidos avaliados. Por outro lado, os animais CLP pré-tratados com salina apresentaram elevada carga bacteriana em todos os órgãos coletados. O grupo CLP+ceftriaxona apresentou carga bacteriana apenas no baço e no sangue. Os animais CLP pré-tratados com a saliva tiveram redução significativa na carga bacteriana em todos os tecidos avaliados comparados ao grupo CLP+salina (Tabela 3).

Tabela 3. Carga Bacteriana nos animais Sham e pré-tratados com salina, ceftriaxona e saliva após 12 horas de indução de sepse.

Grupos	(x10 ³) UFC/mL					
	Orgãos					
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	L. Peritoneal	Sangue
Sham	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina	2,5 ± 0,70	0,5 ± 0,70	3 ± 1,41	19,5 ± 2,12	11,5 ± 0,70	4,5 ± 0,70
Cef	1,5 ± 0,70	ND	ND	ND	ND	1 ± 1,41
Saliva	0,21 ± 0,10	0,05 ± 0,01	0,31 ± 0,05	0,12 ± 0,05	0,54 ± 0,1	0,25 ± 0,05

ND: Não detectável; Cef: Ceftriaxona

Em 24 horas, os animais do grupo sham continuaram sem infecção bacteriana nos tecidos avaliados, enquanto o grupo CLP+salina apresentou elevada carga bacteriana em todas as amostras. Por outro lado, o grupo CLP+ceftriaxona manteve carga apenas no baço embora em menor número que comparado ao tempo de 12

horas. Com relação ao grupo CLP+ saliva, não se obteve carga bacteriana na maioria dos órgãos avaliados, mantendo somente no lavado peritoneal em menor número de UFC comparado ao tempo de 12 horas e ao grupo CLP+salina em ambos os tempos (Tabela 4).

Tabela 4. Carga Bacteriana nos animais Sham e pré-tratados com salina, ceftriaxona e saliva após 24 horas de indução de sepse.

Grupos	(x10 ³) UFC/mL ⁻¹					
	Orgãos					
	Baço	Coração	Fígado	Pulmão	L. Peritoneal	Sangue
Sham	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salina	4,5 ± 0,70	3,5 ± 0,70	2 ± 1,41	3 ± 1,41	4 ± 4,24	3,5 ± 2,12
Cef	0,5 ± 0,70	ND	ND	ND	ND	ND
Saliva	ND	ND	ND	ND	0,005 ± 0,002	ND

ND: Não detectável; Cef: Ceftriaxona

5.3 Migração leucocitária

5.3.1 SANGUE

De maneira geral, os animais do grupo sham não apresentaram influxo de neutrófilos, monócitos e linfócitos para o sangue nos tempos de 12 e 24 horas. Com relação aos neutrófilos, os animais com sepse pré-tratados com salina apresentaram aumento de neutrófilos com 12 horas, com redução destas células em 24 horas. Todavia, os tratamentos com Ceftriaxona e Saliva nos animais com sepse reduziram o influxo de neutrófilos comparado ao grupo CLP+salina, obtendo valores similares aos animais sham (Figura 19 A e B).

Relacionado aos monócitos, o grupo CLP + salina apresentou aumento destas células relação a partir de 24 horas comparado ao grupo sham, entretanto o tratamento com ceftriaxona diminuiu este influxo de mononucleares após 24 horas. Contudo, o grupo CLP + saliva apresentou influxo de monócitos em 12 horas e redução destas células após 24 horas comparado ao grupo CLP (Figura 19 C e D).

O número de linfócitos, no tempo de 12 horas, não estava alterado em nenhum dos grupos avaliados. Todavia, 24 horas após a CLP, os linfócitos do grupo CLP pré tratados com ceftriaxona ou saliva estavam aumentados comparados ao grupo sham, e o grupo CLP+ ceftriaxona também apresentava aumentado de linfócitos comparado ao grupo CLP +salina (Figura E e F).

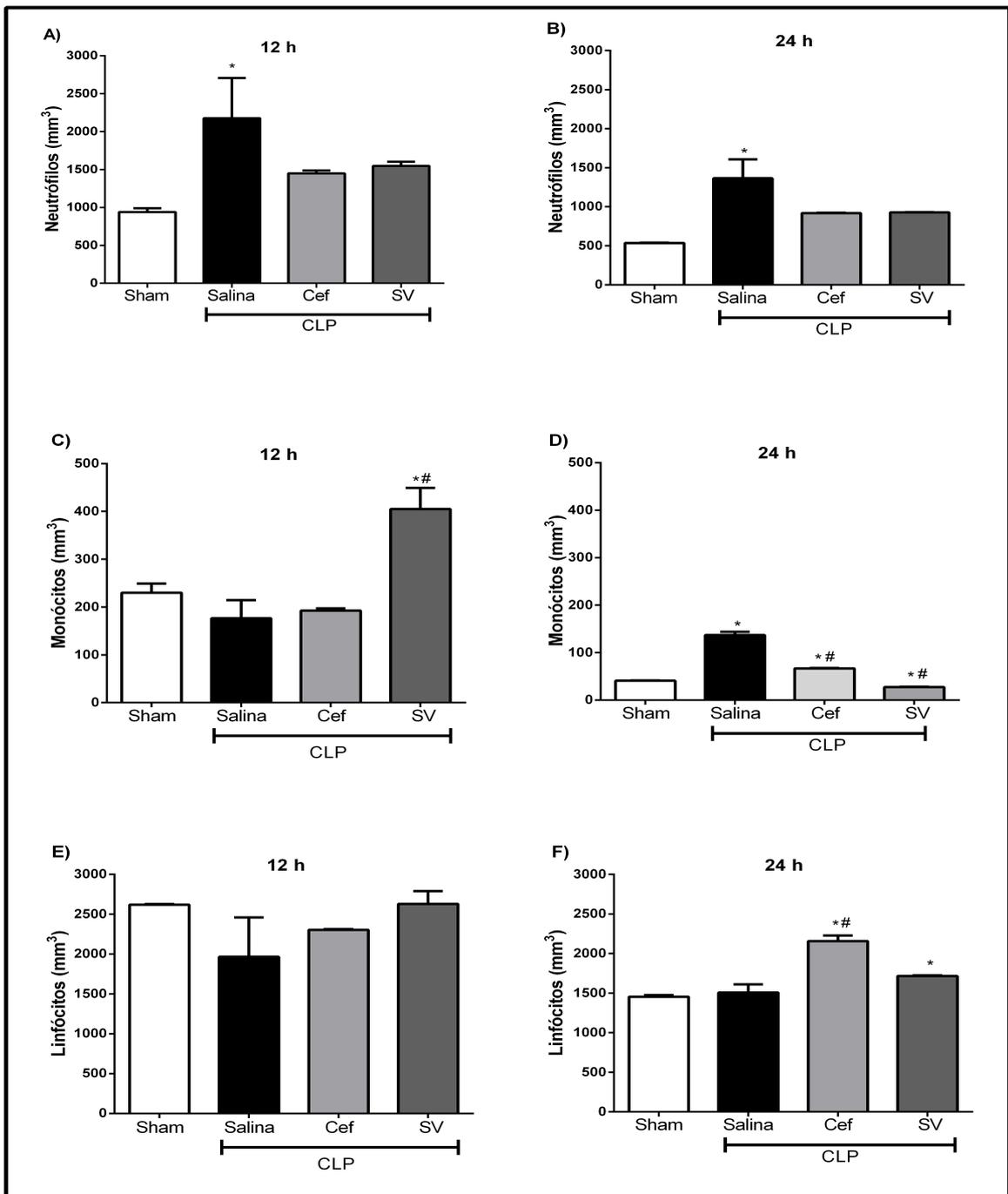


Figura 17. Migração leucocitária no lavado peritoneal nos animais com sepse. (A) Neutrófilos 12 e (B) 24 horas após a CLP; (C) Monócitos 12 horas e (D) 24 horas da CLP; (E) Linfócitos 12 horas e (F) 24 horas da CLP. Os animais foram divididos em: grupo Sham e CLP. Os animais do grupo CLP foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 µg/mL). * $p < 0,05$ comparado ao grupo sham # $p < 0,05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.3.2 LAVADO PERITONEAL

No lavado peritoneal, o grupo CLP + salina apresentou aumento de neutrófilos em 12 horas, com pico do influxo dessas células em 24 horas. Em relação aos tratamentos, a saliva não alterou em 12 horas o perfil de migração de neutrófilos

comparado ao grupo CLP+salina, no entanto em 24 horas, o pré-tratamento com saliva foi capaz de reduzir o influxo desta célula induzido pela sepse. Por outro lado, o tratamento com ceftriaxona induziu um aumento acentuado de neutrófilos em 12 horas e uma redução abrupta em 24 horas comparado ao grupo Sham e CLP + salina (Figura 20 A e B).

Em relação aos mononucleadas, todos os animais com sepse com os diferentes pré-tratamentos apresentaram aumento significativo no número destas células na cavidade peritoneal, com início do influxo em 12 horas e aumento progressivo em 24 horas (Figura 20 C e D).

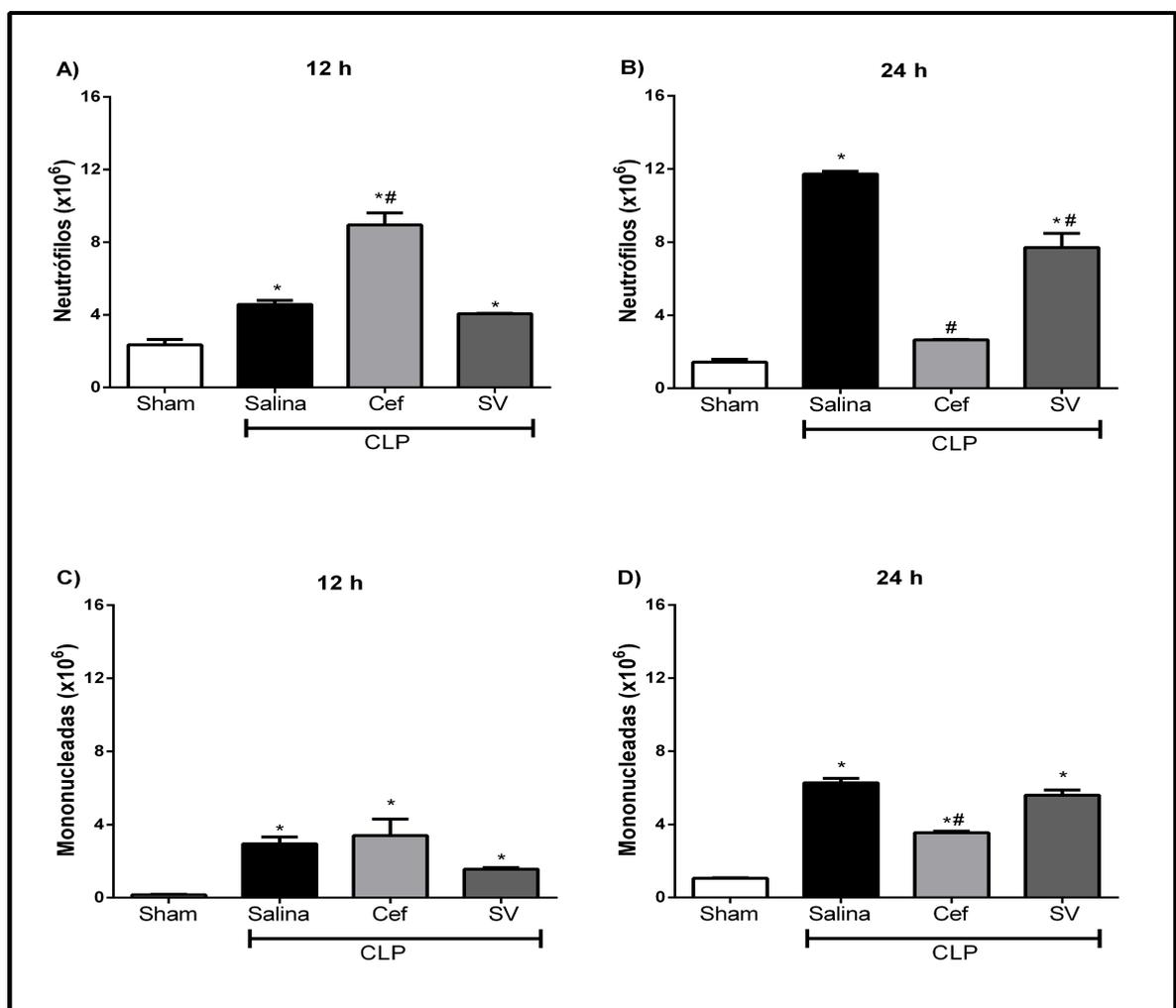


Figura 18. Migracão leucocitária no lavado peritoneal em animais com sepse. (A) Neutrófilos 12 horas e (B) 24 horas após a CLP; (C) Mononucleares 12 horas e (D) 24 horas da CLP. Os animais foram divididos em: grupo Sham e CLP. Os animais do grupo CLP foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 μ g/mL). * $p < 0.05$ comparado ao grupo sham # $p < 0.05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.4 Produção de óxido nítrico

5.4.1 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO NO SORO E LAVADO PERITONEAL

Os animais CLP tratados com salina apresentam aumento na produção de NO no soro e lavado peritoneal, principalmente no tempo de 12 horas mantendo-se até pelo menos 24 horas comparado aos animais sham. O tratamento com ceftriaxona foi capaz de reduzir parcialmente esta produção de NO no soro comparado ao grupo CLP+ salina, mas não alteraram os níveis de NO no lavado. O tratamento com a saliva também reduziu parcialmente NO no soro, entretanto potencializou os níveis deste mediador no lavado desde 12 após CLP comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 21 A e B).

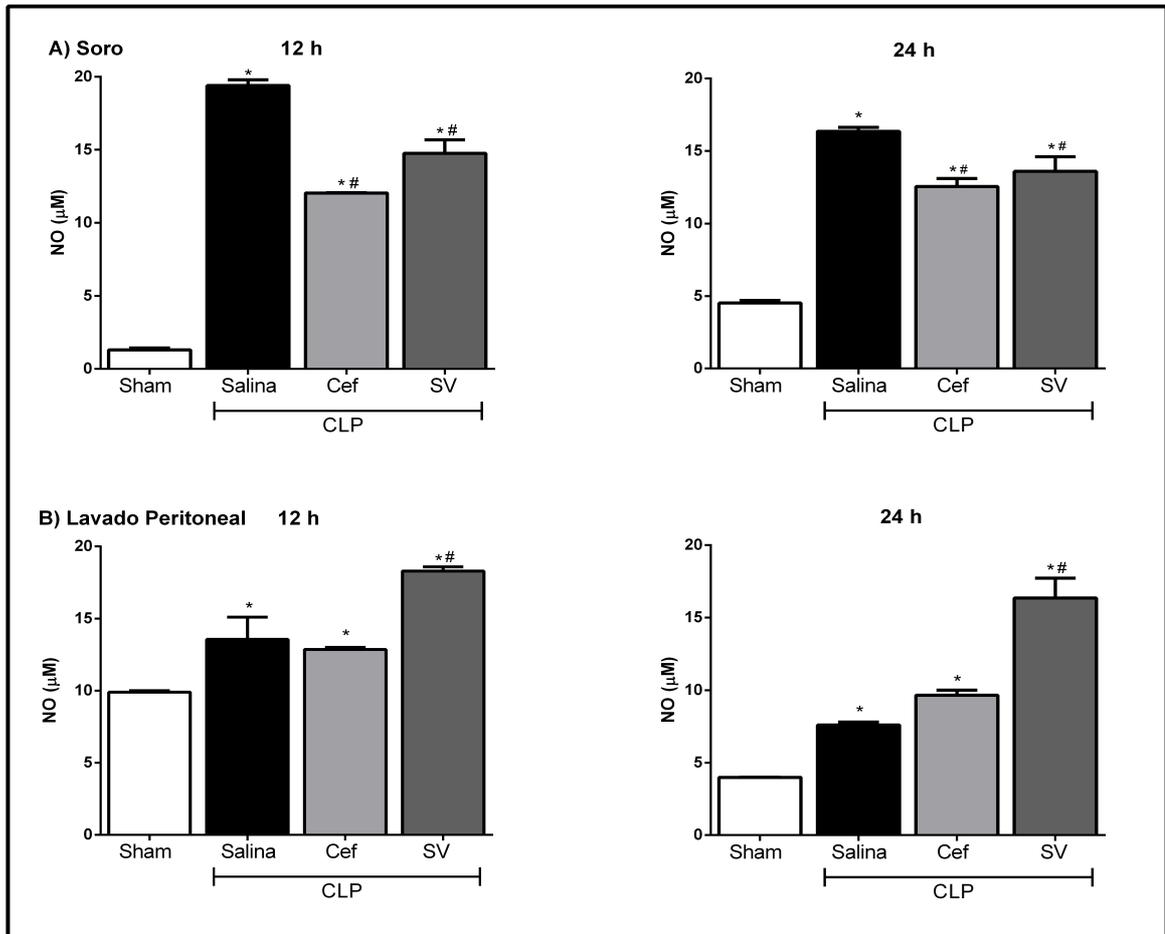


Figura 19. Produção de óxido nítrico no soro e lavado de animais com sepse. (A) no soro no tempo de 12 e 24 horas e no (B) lavado peritoneal no tempo de 12 e 24 horas. Os animais do grupo CLP foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 µg/mL). *p<0.05 comparado ao grupo sham #p<0.05 comparado ao grupo CLP+salina.

5.4.2 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NITRICO NOS ÓRGÃOS

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento significativo nos níveis de NO em todos os tecidos e tempos avaliados comparados ao grupo Sham (Figura 22 A e B). De maneira geral, os pré-tratamentos com ceftriaxona ou saliva nos animais com sepse não alteraram este aumento de NO nos tempos e tecidos avaliados. Somente, observou-se diferença no fígado com 12 horas e no coração com

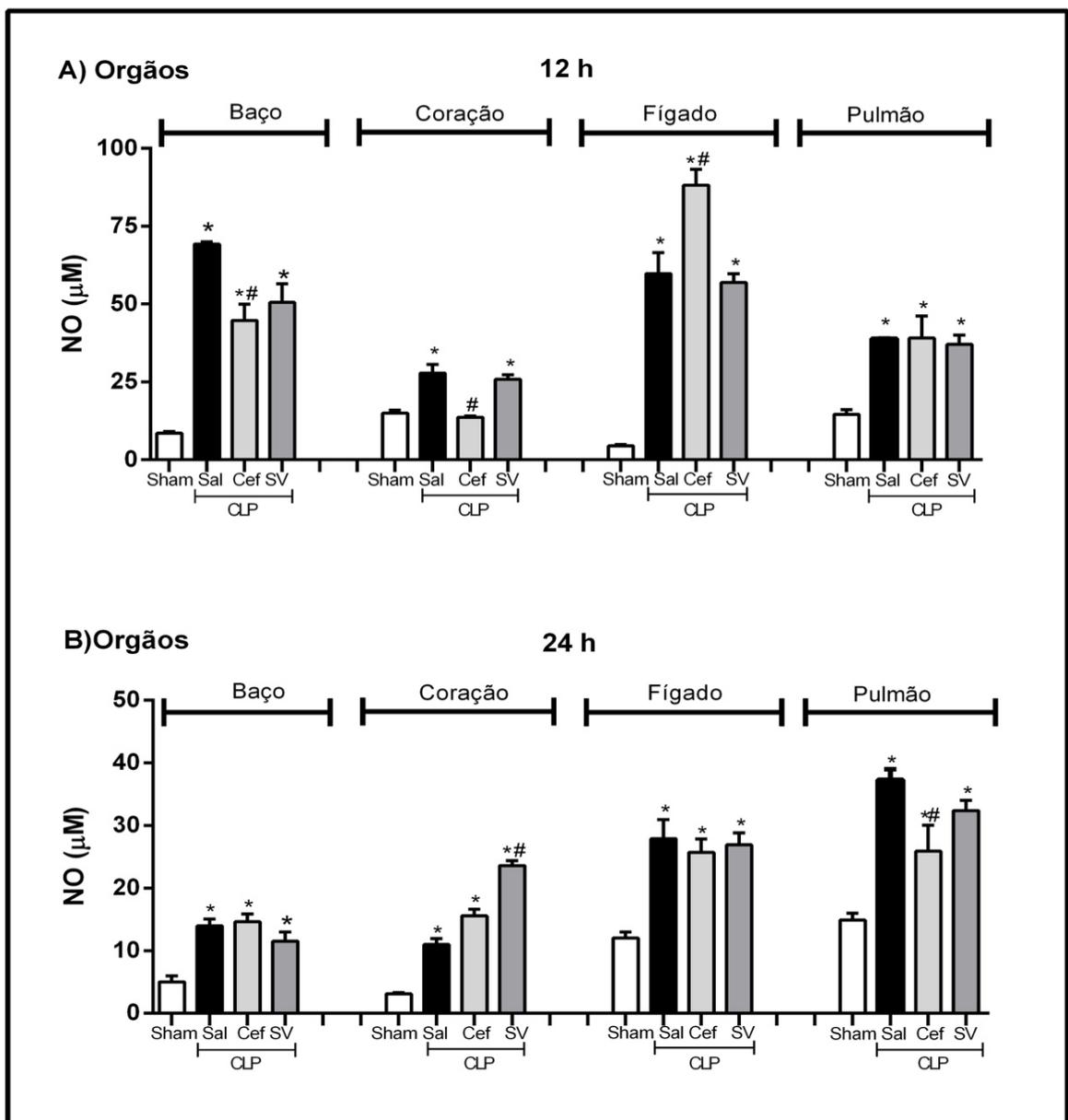


Figura 20. Produção de óxido nítrico nos órgãos de animais com sepse. Nos órgãos (A) 12 horas após a CLP e (B) 24 horas após a CLP. Os animais do grupo que tiveram indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 µg/mL). * $p < 0.05$ comparado ao grupo sham # $p < 0.05$ comparado ao grupo CLP+salina.

24 horas, que ceftriaxona e saliva, respectivamente, potencializaram a produção de NO induzido pelo processo de sepse (Figura 22 A e B).

5.5 Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA)

5.5.1 PRODUÇÃO DE MDA NO SORO E LAVADO PERITONEAL

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram aumento de MDA no soro e lavado peritoneal em todos os tempos avaliados. Os tratamentos (Ceftriaxona ou Saliva) levaram a diminuição nos níveis de MDA tanto no soro quanto no lavado peritoneal em ambos os tempos avaliados (Figura 23 A e B).

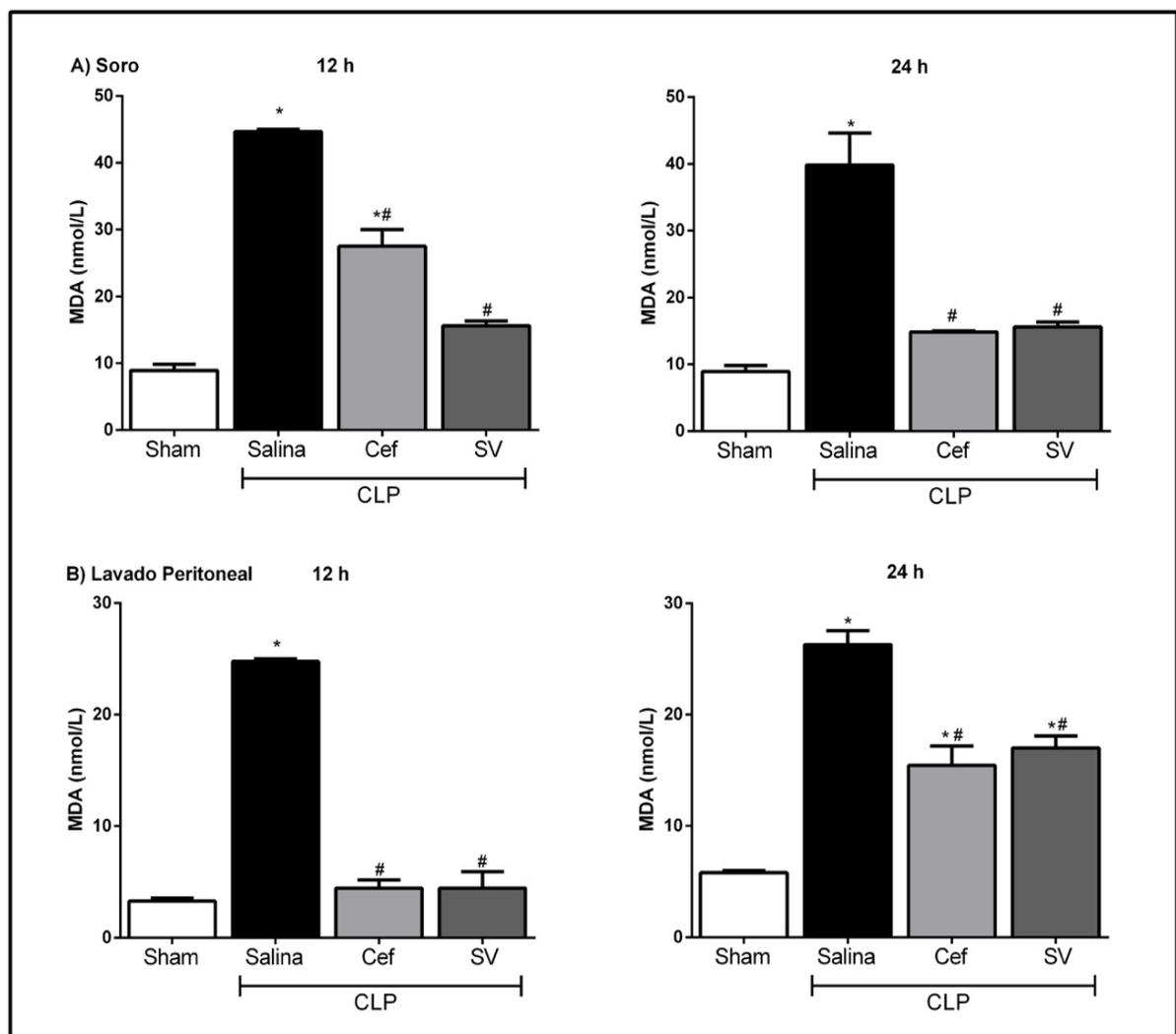


Figura 21. Produção de malondialdeído no soro e peritônio de animais com sepse. A) no soro 12 e 24 horas após a CLP e no (B) lavado peritoneal 12 e 24 horas após a CLP. Os animais do grupo que tiveram indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 µg/mL). *p<0.05 comparado ao grupo sham #p<0.05 comparado ao grupo CLP+salina.

5.5.2 PRODUÇÃO DE MDA NOS TECIDOS

Os animais do grupo CLP + salina também apresentaram aumento nos níveis de MDA em todos os órgãos e tempos avaliados (Figura 24A e B). Com relação aos tratamentos, a ceftriaxona foi capaz de reduzir os níveis de MDA nos órgãos principalmente em 12 horas, entretanto esta diminuição foi parcial no coração e no fígado no tempo de 12 horas, e não alterou os níveis elevados de MDA induzidos pela sepse no fígado e baço em 24 horas (Figura 25 A e B). Entretanto, o pre-tratamento com a saliva diminuiu abruptamente os níveis de MDA em todos os tecidos avaliados, principalmente em 12 horas, comparado aos animais com sepse tratados com salina (Figura 24 A e B).

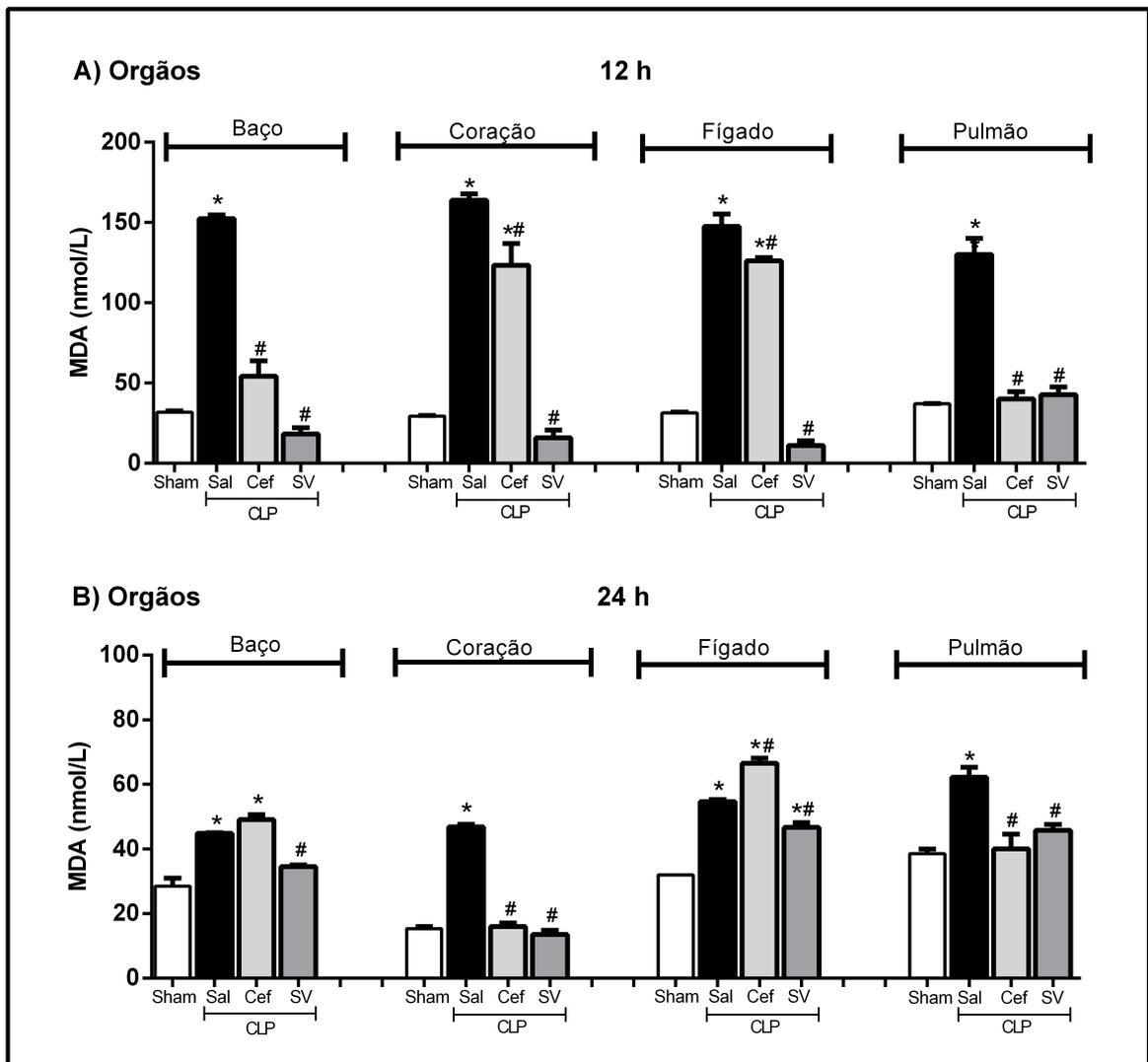


Figura 22. Produção de malondialdeído nos órgãos dos animais com sepse. Nos órgãos (A) 12 horas após a CLP e (B) 24 horas após a CLP. Os animais do grupo que tiveram indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 µg/mL). *p<0.05 comparado ao grupo sham #p<0.05 comparado ao grupo CLP+salina.

5.6 Liberação de espécies reativas de oxigênio (EROs)

A produção de EROs foi avaliada nos leucócitos presentes no lavado peritoneal 24 horas após a indução da sepse. Para isso, após 24 horas da CLP, os leucócitos destes animais foram removidos e incubados ou não com tBHP e quantificado por fluorescência.

Desta forma, os leucócitos peritoneais provenientes do grupo CLP+salina produziram maiores níveis de EROS na presença ou não de tBHP comparado ao grupo sham. Por outro lado, os tratamentos com ceftriaxona e saliva foram capazes de inibir a produção de EROS na presença ou não de tBHP, obtendo valores semelhantes ao grupo sham (Figura 25).

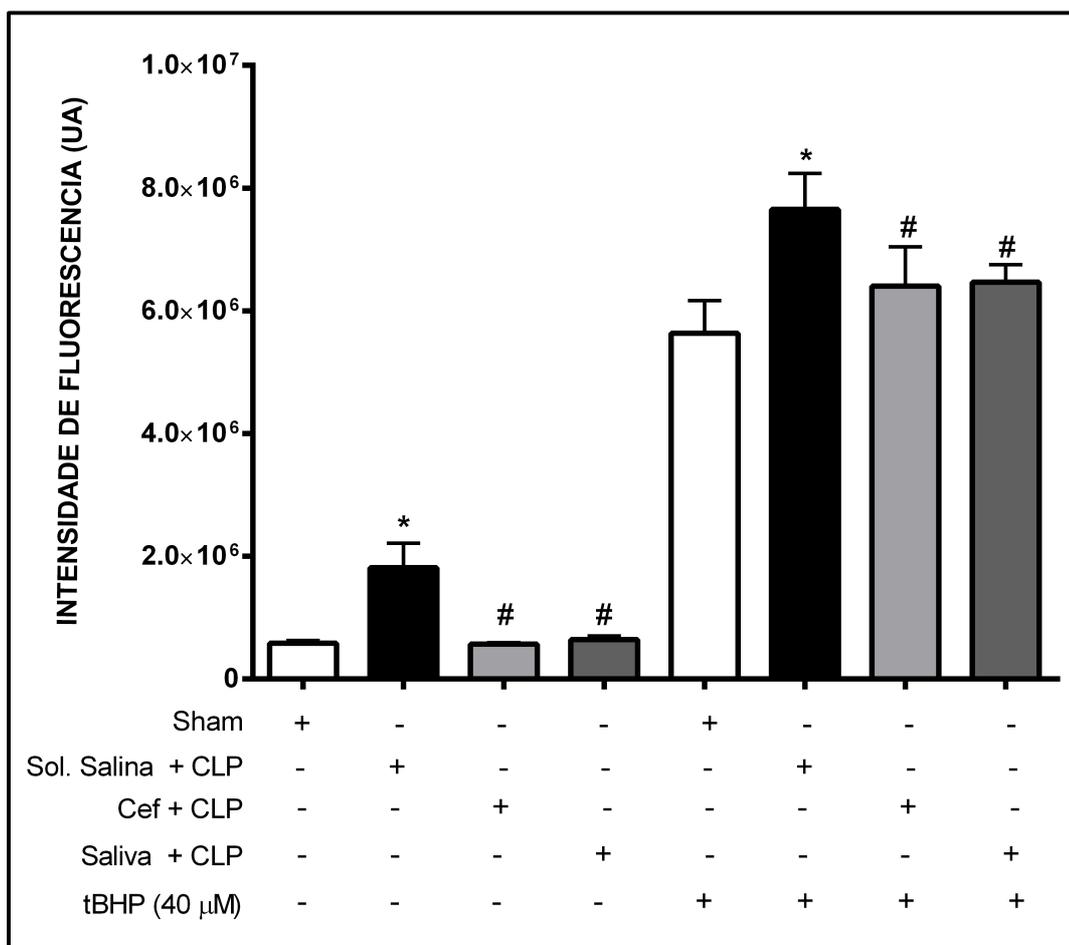


Figura 23. Liberação de espécies reativas de oxigênio de leucócitos peritoneais de animais com sepse. Leucócitos provenientes dos animais Sham e com indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 μg/mL) foram removidos após 24 horas da CLP e incubados ou não com tBHP e produção de EROS foi avaliada por fluorescência.*p<0.05 comparado ao controle Sham, #p<0.05 comparado ao grupo CLP+salina.

5.7 Capacidade antioxidante total pelo método do TEAC

5.7.1 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NO SORO E LAVADO PERITONEAL

Os animais com sepse tratados com salina apresentaram redução na capacidade antioxidante total no lavado peritoneal e no soro nos tempos avaliados (Figura 26 A e B). Os tratamentos, a ceftriaxona e a saliva foram capazes de reverter a inibição da capacidade antioxidante em ambos os tempos, obtendo valores elevados de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, principalmente no soro (Figura 26 A e B).

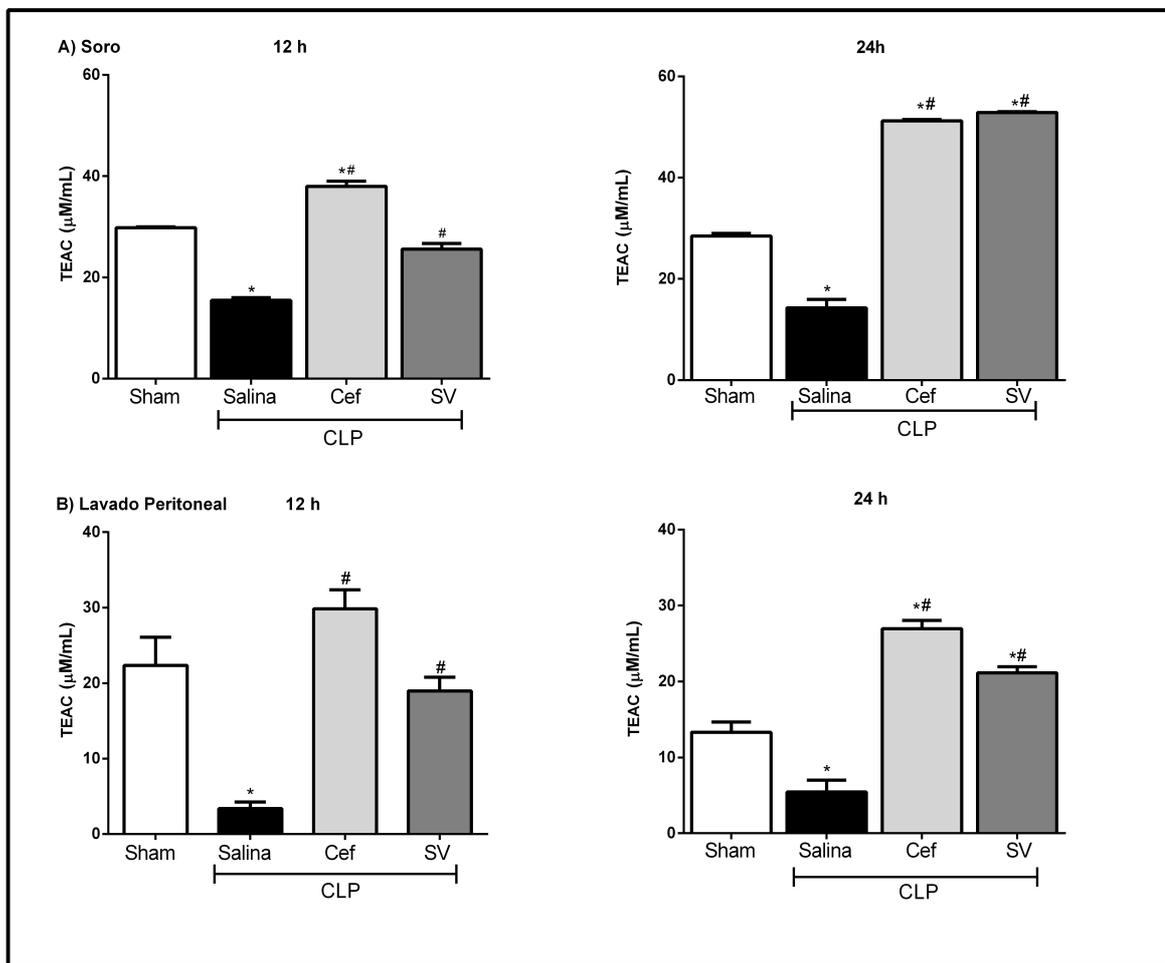


Figura 24. Capacidade antioxidante total no sangue e peritônio de animais com sepse. A) no soro 12 e 24 horas após a CLP e no (B) lavado peritoneal 12 e 24 horas após a CLP. Os animais do grupo que tiveram indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 μg/mL). * $p < 0.05$ comparado ao grupo sham # $p < 0.05$ comparado ao grupo CLP+salina.

5.7.2 CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL NOS ÓRGÃOS

Os animais com sepse e tratados com salina apresentaram redução nos fatores antioxidantes (capacidade antioxidante) em todos os tecidos e tempos avaliados (Figura 27 A e B). O tratamento com ceftriaxona nos animais com sepse foi capaz estimular a produção de fatores antioxidantes em todos os órgãos e tempos avaliados. Enquanto, o tratamento com saliva somente estimulou a produção dos fatores antioxidantes de todos os órgãos no tempo de 24 horas (Figura 27 A e B).

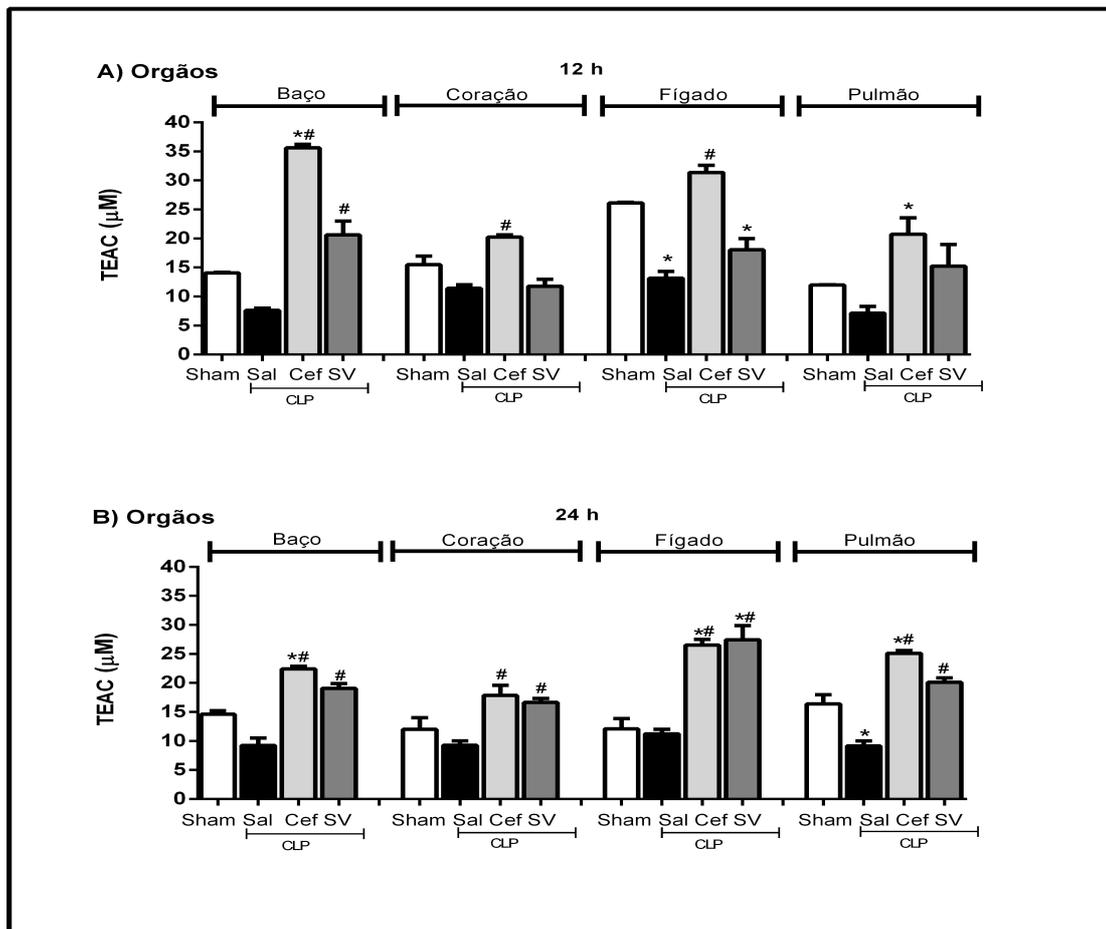


Figura 25. Capacidade antioxidante total nos órgãos de animais com sepse. Nos órgãos (A) 12 horas após a CLP e (B) 24 horas após a CLP. Os animais do grupo que tiveram indução de sepse foram pré-tratados com: solução salina 0,9% (CLP+salina), Ceftriaxona (CLP+Cef - 20 mg/kg) e saliva do *Ae. aegypti* (CLP+SV - 3,5 μg/mL). * $p < 0.05$ comparado ao grupo sham # $p < 0.05$ comparado ao grupo CLP+salina.

6 DISCUSSÃO

O modelo de CLP é considerado o padrão-ouro para a investigação da sepse *in vivo*, pois trata-se de um procedimento simples e se assemelha a progressão e as características da sepse humana (AYALA et al., 2000; DEJAGER et al., 2011; PARKER; WATKINS, 2001). O CLP em camundongos reproduz uma série de características chave da peritonite bacteriana secundária em seres humanos incluindo: infecção polimicrobiana (SIEMPOS et al., 2014), características hemodinâmica e a presença das fases anti e pró inflamatórias (DEJAGER et al., 2011; HOLLENBERG et al., 2001).

Desta forma, no modelo de sepse por CLP foi avaliado parâmetros que indicam o estado geral de saúde dos mesmos, tais como sobrevida e peso corporal, além de parâmetros imunológicos e oxidativo (GRANGER et al., 2013). Para isto, os animais foram pré tratados pela via intraperitoneal com salina 0,9%, ou ceftriaxona (20mg/Kg), considerada um dos antibióticos mais utilizados em caso de sepse (OMS, 2008) ou com a saliva do *Aedes aegypti* (3,5 ug/mL), um potencial imunomodulador.

Relacionado a sobrevida, os animais com sepse que receberam o tratamento com salina apresentaram perda significativa de peso corporal com morte em até 6 dias após o CLP. Segundo Bejamim, et al., (2000), o modelo de CLP considerado moderado pode sobreviver até 5 dias após o procedimento cirúrgico. Além disso, Siempos, et al. (2014) mostraram que 60% dos animais do modelo CLP moderado morrem até 7 dias após o procedimento. O mesmo foi demonstrado por Goncalves-De-Albuquerque et al. (2016), nos quais os animais com sepse tratados apenas com placebo foram a óbito em até 7 dias após a indução de CLP.

Como já mencionado anteriormente, o modelo CLP é caracterizado pela translocação bacteriana, com conseqüente infecção polimicrobiana. Entre as mais prevalentes e identificadas neste tipo de modelo estão a *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiela pneumoniae* e *Enterobacter agglomerans* (CUENCA et al., 2010; RITTIRSCH et al., 2009). Os camundongos do grupo CLP + salina apresentaram elevada carga bacteriana e, todos os tecidos e tempos avaliados, sendo que no sítio inflamatório houve redução desta carga 24 horas após a CLP, que pode ser justificado pela fagocitose realizada pelos leucócitos recrutados para estes tecidos (Xiao et al. 2006).

Com relação aos componentes da resposta imune, sabe-se que as células mononucleadas e polimorfonucleadas, principalmente neutrófilos, são essenciais para a defesa do organismo frente aos patógenos (BOOMER; GREEN; HOTCHKISS, 2014; OCUIN et al., 2011). Esses leucócitos derivam de precursores na medula óssea, que possuem uma célula-tronco hematopoiética pluripotente que origina todos os componentes celulares do sangue (WALDNER, 2009). Assim, durante o processo inflamatório da sepse ocorre a ativação e migração destas células. Sendo que na fase inicial, os neutrófilos circulam no sangue, mas migram para os tecidos se forem recrutados por células residentes presentes nos locais de infecção e inflamação (RIBET; COSSART, 2015).

Neste sentido, os animais com sepse pré-tratados com salina na fase inicial da infecção apresentaram aumento de neutrófilos no sangue e lavado peritoneal pelo menos até 24 horas após infecção, seguido de aumento de monócitos a partir de 24 horas. Outros estudos como Ocuin et al. (2011), também, mostraram que após 12 horas de indução de sepse houve o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o peritônio em modelo de CLP moderada. Por outro lado, no modelo de CLP grave embora ocorra uma estimulação exacerbada da resposta imune, há falência da migração celular, principalmente de neutrófilos (MARSHALL, 2005; PELLETIER et al., 2010).

Esses leucócitos, além da fagocitose e ativação da resposta imune adaptativa, também, produzem espécies reativas de nitrogênio, principalmente o NO pela ação da enzima iNOS, e junto com seus produtos gerados pela sua interação com outros intermediários irão atuar como microbicidas (OCUIN et al., 2011; WONG et al., 1996). Em nosso estudo, os animais com sepse pré-tratados com salina apresentaram aumento da produção de NO pelos leucócitos no soro, no lavado peritoneal e nos demais tecidos avaliados destes animais. O aumento da produção de NO está associado a ativação da iNOS nos leucócitos tanto em pacientes com sepse como em modelos de animais sépticos e sua relação com a gravidade da doença já está bem documentada (DE CRUZ; KENYON; SANDROCK, 2009; HUET et al., 2011; OCHOA et al., 1991). Os efeitos deletérios do NO já é demonstrado na literatura, sendo que o NO interage por exemplo com ânion superóxido gerando o peroxinitrito (ONOO^-), um agente oxidante responsável pela peroxidação lipídica. Whiteman e Halliwell (1996) mostraram que a falha na migração leucocitária na sepse severa foi mediada pelo

peroxinitrito e posteriormente Clements et al. (2003) mostraram que ao tratar os animais com um sequestrador de ONOO^- aumentou a migração e reduziu a carga bacteriana na circulação.

Além das ERNs, as EROs estão associadas a falência múltipla de órgãos, que é uma das consequências grave da sepse (DROSATOS et al., 2015). Nesse sentido, em nosso estudo, observou-se um aumento significativo da geração EROs no lavado peritoneal de animais com sepse. Nossos dados corroboram com Inada et al. (2001) e Wang et al. (2014), que demonstraram a produção de radicais no sangue e no lavado peritoneal com 4 e/ou 24 horas após CLP em ratos. Martins et al. (2003), também, mostraram que neutrófilos provenientes de pacientes sépticos quando estimulados *in vitro* por bactérias ou endotoxinas produzem elevados níveis de EROs.

Assim, a geração controlada de espécies reativas no espaço extracelular tem como função eliminar patógenos. No entanto, o excesso de EROs pode induzir efeitos deletérios como danos no DNA, perda da função de enzimas, reagir com lipídeos das membranas celulares produzindo a peroxidação lipídica, resultando em produtos finais como o malondialdeído e outros aldeídos que levam a morte celular (WEIDINGER et al., 2015). Nesse sentido, os animais com sepse e pré-tratados com salina, os níveis de MDA estavam elevados no peritônio, no soro e em todos os órgãos avaliados. Estudos realizados por Dear et al. (2006) e Zolalim et al. (2015), também, evidenciaram altos níveis de MDA nos pulmões e fígados de ratos e camundongos com sepse.

A fim de reduzir esses danos oxidativo, os animais possuem um sistema antioxidante enzimático e não enzimático que atua contra radicais livres e outros oxidantes. A capacidade antioxidante total pode ser avaliada pelo método do sequestro do radical ABTS⁺ (KAMBAYASHI et al., 2009), desta forma, os animais pré-com salina apresentaram redução na capacidade antioxidante total no lavado peritoneal, no soro e nos órgãos nos tempos avaliados. Sabe-se que na sepse, o aumento exacerbado de substâncias pró-oxidantes pode levar a uma redução nos estoques de antioxidantes, com isso estes são insuficientes para neutralizar o dano celular provocado por estes radicais, por este fato a suplementação com antioxidantes torna-se necessária (CARVALHO; TROTTA, 2003; PETRONILHO et al., 2016).

Até o momento, a sepse é tratada comumente com terapia antimicrobiana controlando a infecção, além do uso de terapias de suporte (ANDRADES et al. 2011).

Assim, a ceftriaxona, um dos antibióticos mais utilizados em caso de sepse (OMS, 2008), foi uma terapia de escolha. Todavia, em nossos dados, a ceftriaxona não melhorou o prognóstico dos animais com sepse, visto que os animais tratados com ceftriaxona morreram após 7 dias de indução de sepse e tiveram uma perda de peso corporal até o momento do óbito. Por outro lado, Doershung et al. (2004) mostraram que os antibióticos foram capazes de aumentar a sobrevivência dos animais comparado ao controle CLP, mas não evitar o óbito destes animais, mostrando que os antibióticos apenas diminuem a severidade da sepse (TURNBULL et al., 2003). Nesse sentido, animais com sepse pré tratados com ceftriaxona 12 horas antes da CLP e depois a cada 12 horas por sete dias, também mostraram que houve aumento da sobrevivência destes animais em relação ao grupo CLP, apesar de os mesmos terem evoluído a óbito (TURNBULL et al., 2003).

A carga bacteriana do grupo CLP + ceftriaxona estava presente apenas no baço e no sangue no início da infecção, regredindo posteriormente. A ceftriaxona é uma cefalosporina de terceira geração que interfere na síntese dos peptidoglicanos bacterianos após a ligação às proteínas de ligação de beta lactâmicos, levando a consequente lise celular (HUSSEIN et al., 2016; NAU; EIFFERT, 2002; YILMAZ et al., 2011). Desta forma, a atividade antimicrobiana do antibiótico já está bem documentada e relacionada ao seu mecanismo de ação.

De maneira geral, o tratamento com Ceftriaxona levou uma diminuição de neutrófilos no sangue e lavado peritoneal, mas não alterou o número de mononucleares. Dados semelhantes foram observados por Gomes et al. (2004), em que outros antibióticos como ciprofloxacina, clindamicina e imipenem diminuíram o influxo de neutrófilos para cavidade peritoneal 24 horas após a CLP. Além disso, Majhi et al. (2014) mostraram que a ceftriaxona diminuiu o influxo de polimorfonucleares para o sítio de inflamação no modelo inflamatório testado.

Quanto aos níveis de óxido nítrico, de maneira geral, o pré-tratamento com ceftriaxona não alterou o aumento de NO nos tempos e tecidos avaliados, com exceção do soro. Nesse sentido, Majhi et al. (2014) demonstraram expressão reduzida da iNOS após o tratamento com ceftriaxona no modelo infecção pulmonar por *S. pneumoniae*. Quanto a liberação EROs, o tratamento com o antibiótico inibiu a produção de EROs na presença ou não do oxidante tBHP, sugerindo que a ceftriaxona apresenta uma atividade antioxidante. Fato que foi comprovado pela avaliação do

MDA, o tratamento com ceftriaxona foi capaz de reduzir os níveis de MDA na maioria dos órgãos avaliados. Similarmente, Amin et al. (2014) mostraram que os níveis de MDA também estavam reduzidos após 7 dias de tratamento com o antibiótico nos ratos. Doerschung et al. (2004) verificou que a ceftriaxona foi apenas capaz de retardar a lesão pulmonar, explicando os níveis de MDA elevados no pulmão. Além disso, Alhumaidha (2014) relatou um aumento de MDA no fígado de ratos wistar após o tratamento com ceftriaxona com doses de 180mg/Kg.

Relacionado ao tratamento com a ceftriaxona, a mesma foi capaz de aumentar a capacidade antioxidante em ambos os tempos, principalmente no soro e em todos os órgãos. Estudos relatam uma atividade antioxidante da ceftriaxona como de Yilmaz et al. (2011) que administrou pela via i.p. a ceftriaxona (200mg/Kg) durante 10 dias em camundongos com estresse, observando aumento de glutathione peroxidase e catalase. Amin (2014), também, relatou que os animais tratados com ceftriaxona apresentaram aumento dos níveis de GSH. Recentemente, Hunssein et al. (2016) mostraram que o tratamento com ceftriaxona (200mg/Kg) em ratos com inflamação, levou ao aumento significativo da concentração de GSH e da atividade da catalase, além de reduzir as concentrações de MDA no hipocampo destes animais.

A literatura é escassa quanto a pesquisas que envolvam a atividade isolada da saliva do *Aedes aegypti* em modelos experimentais. Contudo, em nosso estudo, todos os animais pré tratados com a saliva sobreviveram por pelo menos 16 dias e recuperam a perda de peso induzida pelo processo de sepse. O único relato da literatura que disserta sobre seu efeito em modelo experimental é em modelo de colite experimental, no qual a saliva foi capaz de melhorar os “scores” da doença, reduzindo a gravidade da doença independente do tempo de tratamento ou da duração da exposição do agente indutor de colite aguda(SALES-CAMPOS et al., 2015).

A redução da carga bacteriana, também foi observada nos animais CLP pré-tratados com a saliva. No entanto, não há relatos na literatura que expliquem a atividade antibacteriana da saliva. Todavia, Rossignol e Lueders (1986), demonstraram a presença de um componente que atuava como um fator bacteriolítico que controlava o crescimento de bactérias patogênicas durante a ingestão de açúcares pelo mosquito, tal fator foi posteriormente descrito como uma lisozima (AAEL009670) (JUHN et al., 2011; RIBEIRO et al., 2007).

Com relação ao perfil leucocitário, de maneira geral, o pré-tratamento com a

saliva inibiu o influxo de neutrófilos, mas não alterou os mononucleares. Estudos mostraram a saliva do *Ae. aegypti* foi capaz de induzir a resposta inata à infecção por DENV através do recrutamento de neutrófilos (PINGEN et al., 2016; SCHMID et al., 2016). Entretanto, Ramos (2016) demonstrou que a saliva foi capaz de atuar diretamente em macrófagos, diminuindo sua ativação. Com relação aos linfócitos, a saliva foi capaz de suprimir a resposta proliferativa de linfócitos induzindo apoptose nas subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺ dependente de caspase-3 e caspase-8, sugerindo que apenas algumas subpopulações de células T *naïve* são afetadas (BIZZARRO et al., 2013a; SALES-CAMPOS et al., 2015; WANASEN et al., 2004).

O tratamento com a saliva reduziu parcialmente a produção de NO induzido por sepse na maioria dos tecidos avaliados. O tratamento com saliva também foi capaz de inibir a produção de EROS na presença ou não de tBHP. Por outro lado, alguns estudos relatam que as sialoquininas I e II presentes na saliva do *Aedes aegypti* induzem elevados níveis de NO na circulação do hospedeiro (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994). Essas moléculas são constituídas de peptídeos pertencentes à família das taquiquininas que são responsáveis pela ação vasodilatadora da saliva (RIBEIRO, 1992). Assim, as taquiquininas se ligam aos receptores presentes na parede dos vasos e induzem a liberação de NO e consequente relaxamento vascular (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994).

Além disso, o tratamento com Saliva nos animais com sepse mostrou um efeito antioxidante, diminuindo nos níveis de MDA e foi capaz de reverter a inibição dos fatores antioxidantes na maioria dos órgãos avaliados. Um estudo realizado por Girard et al. (2010), relatou vários componentes presentes na saliva de *Aedes*, os quais estão diretamente relacionados com a atividade antioxidante e processos relacionados ao estresse (enzimas do citocromo P450, glutathiona s-transferase, citocromo c oxidase, , heme peroxidase animal, thioredoxina 1). Assim, outro estudo de constituintes proteico da saliva do *Aedes aegypti*, também relatou componentes relacionados ao estresse oxidativo como superóxido dismutase, citocromo P450, Glutathiona s-transferase, NADH-ubiquinona oxidoreductase, oxidoreductase transportadora de eltron entre outras (ALMERAS et al., 2010). Desta forma, estes dados sugerem que a saliva do *Aedes* apresentou efeito antioxidante no modelo de sepse, visto que inibiu os níveis de NO, EROs e MDA, além de aumentar os fatores antioxidantes, fato que pode estar relacionada aos seus componentes proteicos.

7 CONCLUSÃO PRELIMINAR

O tratamento com saliva do *Aedes aegypti* foi capaz de melhorar o prognóstico dos animais com sepse, aumentando a sobrevivência e os pesos desses animais. Além disso, reduziu a carga bacteriana e aumentou o influxo de monócitos no sangue.

O tratamento com a saliva mostrou efeito antioxidante, visto que diminuiu a produção de NO e EROS. Por outro lado, aumentou os fatores antioxidantes nas amostras dos animais com sepse.

O tratamento com saliva nos animais com sepse levou a diminuição do dano celular, representada pela inibição da peroxidação lipídica induzida pela sepse em todos os tecidos avaliados.

Portanto, apesar dos danos causados pela sepse em animais, a saliva demonstrou elevada atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória *in vivo* melhorando o prognóstico da sepse.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

- ABEID, M.; SOUZA, S. H. DE; BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. p. 349–362, 1998.
- ADHIKARI, N. K. J. et al. Critical care and the global burden of critical illness in adults. **Lancet (London, England)**, v. 376, n. 9749, p. 1339–1346, out. 2010.
- AIRD, W. C. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. **Blood**, v. 101, n. 10, p. 3765–3777, maio 2003.
- AJROUCHE, R. et al. Statins decrease mortality in Lebanese patients with sepsis: A multicenter study. **Pharmacy practice**, v. 11, n. 2, p. 102–108, abr. 2013.
- ALMERAS, L. et al. Salivary gland protein repertoire from *Aedes aegypti* mosquitoes. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 10, 2010.
- AMIN, B.; ABNOUS, K.; MOTAMEDSHARIATY, V. Attenuation of oxidative stress , inflammation and apoptosis by ethanolic and aqueous extracts of *Crocus sativus* L . stigma after chronic constriction injury of rats. 2014.
- ANGUS, D. C.; VAN DER POLL, T. Severe Sepsis and Septic Shock. **New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 9, p. 840–851, 28 ago. 2013.
- AYALA, A. et al. Immune depression in polymicrobial sepsis: the role of necrotic (injured) tissue and endotoxin. **Critical care medicine**, v. 28, n. 8, p. 2949–2955, ago. 2000.
- BARRETT, A. D. T.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annual review of entomology**, v. 52, p. 209–229, 2007.
- BARROS, M. S. et al. Exposure to *Aedes aegypti* Bites Induces a Mixed-Type Allergic Response following Salivary Antigens Challenge in Mice. **PloS one**, v. 11, n. 5, p. e0155454, 2016.
- BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, jan. 2007.
- BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite immunology**, v. 15, n. 1, p. 27–33, jan. 1993.
- BIZZARRO, B. et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasites & vectors**, v. 6, p. 329, 2013a.
- BIZZARRO, B. et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 2013b.
- BONE, R. C. et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. **Chest**, v. 101, n. 6, p. 1644–1655, jun. 1992.

- BONE, R. C. Sepsis and its complications: the clinical problem. **Critical care medicine**, v. 22, n. 7, p. S8-11, jul. 1994.
- BOOMER, J. S. et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. **JAMA**, v. 306, n. 23, p. 2594–2605, dez. 2011a.
- BOOMER, J. S. et al. Immunosuppression in Patients Who Die of Sepsis and Multiple Organ Failure. **Jama**, v. 306, n. 23, p. 2594–2605, 21 dez. 2011b.
- BOOMER, J. S. et al. A prospective analysis of lymphocyte phenotype and function over the course of acute sepsis. **Critical care (London, England)**, v. 16, n. 3, p. R112, 2012.
- BOOMER, J. S.; GREEN, J. M.; HOTCHKISS, R. S. The changing immune system in sepsis: is individualized immuno-modulatory therapy the answer? **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 45–56, jan. 2014.
- BOPPANA, V. D. et al. SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 T cells to express IL-4. **Parasite immunology**, v. 31, n. 6, p. 287–295, jun. 2009.
- BROWN, L. et al. Through the wall: extracellular vesicles in Gram-positive bacteria, mycobacteria and fungi. **Nature reviews. Microbiology**, v. 13, n. 10, p. 620–630, out. 2015.
- BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. **Toxicology letters**, v. 152, n. 1, p. 73–84, ago. 2004.
- CALVO, E. et al. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **J Biol Chem**, v. 281, 2006.
- CAO, C. et al. **The role of regulatory T cells in immune dysfunction during sepsis** *World Journal of Emergency Medicine* China, 2015.
- CARVALHO, P. R. A.; TROTTA, E. DE A. **Avanços no diagnóstico e tratamento da sepse** *Jornal de Pediatria* scielo , , 2003.
- CAVAILLON, J.-M.; ADIB-CONQUY, M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. **Critical care (London, England)**, v. 10, n. 5, p. 233, 2006.
- CAWCUTT, K. A.; PETERS, S. G. Severe Sepsis and Septic Shock: Clinical Overview and Update on Management. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 89, n. 11, p. 1572–1578, 24 maio 2016.
- CHAGAS, A. C. et al. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 19, p. 6946–6951, 2014.
- CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from

the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 1, p. 138–142, 1994.

CHHABRA, M. et al. Chikungunya fever: a re-emerging viral infection. **Indian journal of medical microbiology**, v. 26, n. 1, p. 5–12, 2008.

CIMOLAI, M. C. et al. **Mitochondrial Mechanisms in Septic Cardiomyopathy** (G. Coppotelli, J. M. Ross, Eds.) **International Journal of Molecular Sciences**, ago. 2015.

CLEMENTS, M. K. et al. Inhibition of actin polymerization by peroxynitrite modulates neutrophil functional responses. **Journal of leukocyte biology**, v. 73, n. 3, p. 344–355, mar. 2003.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885–891, dez. 2002.

CONDOTTA, S. A. et al. Sustained and incomplete recovery of naïve CD8(+) T-cell precursors after sepsis contributes to impaired CD8(+) T-cell responses to infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 190, n. 5, p. 1991–2000, 1 mar. 2013.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: [s.n.].

CONWAY, M. J. et al. Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. **Journal of virology**, v. 88, n. 1, p. 164–175, jan. 2014.

CROSS, A. R.; SEGAL, A. W. The NADPH oxidase of professional phagocytes--prototype of the NOX electron transport chain systems. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1657, n. 1, p. 1–22, jun. 2004.

CUENCA, A. G. et al. Current Protocols in Immunology: Cecal Ligation and Puncture. **Current protocols in immunology / edited by John E. Coligan ... [et al.]**, v. CHAPTER, p. Unit-19.13, nov. 2010.

D'ACAMPORA, A. J.; LOCKS, G. DE F. Median lethal needle caliber in two models of experimental sepsis. **Acta cirurgica brasileira**, v. 29, n. 1, p. 1–6, jan. 2014.

DE, A. K. et al. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 96, n. 1, p. 52–66, jul. 2000.

DE CRUZ, S. J.; KENYON, N. J.; SANDROCK, C. E. Bench-to-bedside review: the role of nitric oxide in sepsis. **Expert review of respiratory medicine**, v. 3, n. 5, p. 511–521, out. 2009.

DEAR, J. W. et al. Sepsis-induced organ failure is mediated by different pathways in the kidney and liver: Acute renal failure is dependent on MyD88 but not renal cell apoptosis. p. 832–836, 2006.

- DEJAGER, L. et al. Cecal ligation and puncture: the gold standard model for polymicrobial sepsis? **Trends in microbiology**, v. 19, n. 4, p. 198–208, abr. 2011.
- DELLINGER, R. P. et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. **Critical care medicine**, v. 36, n. 1, p. 296–327, jan. 2008.
- DINARELLO, C. A. Proinflammatory and anti-inflammatory cytokines as mediators in the pathogenesis of septic shock. **Chest**, v. 112, n. 6 Suppl, p. 321S–329S, dez. 1997.
- DOYLE, S. L.; O'NEILL, L. A. J. Toll-like receptors: from the discovery of NFkappaB to new insights into transcriptional regulations in innate immunity. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 9, p. 1102–1113, out. 2006.
- DRANOFF, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 1, p. 11–22, jan. 2004.
- DRIFTE, G. et al. Innate immune functions of immature neutrophils in patients with sepsis and severe systemic inflammatory response syndrome. **Critical care medicine**, v. 41, n. 3, p. 820–832, mar. 2013.
- DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, jan. 2002.
- DROSATOS, K. et al. Pathophysiology of sepsis-related cardiac dysfunction: driven by inflammation, energy mismanagement, or both? **Current heart failure reports**, v. 12, n. 2, p. 130–140, abr. 2015.
- EDUL, V. S. K. et al. Quantitative assessment of the microcirculation in healthy volunteers and in patients with septic shock. **Critical care medicine**, v. 40, n. 5, p. 1443–1448, maio 2012.
- FERREIRA-CRAVO, M. et al. Antioxidant responses and reactive oxygen species generation in different body regions of the estuarine polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae). **Chemosphere**, v. 66, n. 7, p. 1367–1374, jan. 2007.
- FIALKOW, L.; WANG, Y.; DOWNEY, G. P. Reactive oxygen and nitrogen species as signaling molecules regulating neutrophil function. **Free radical biology & medicine**, v. 42, n. 2, p. 153–164, jan. 2007.
- FINK, M. P.; WARREN, H. S. Strategies to improve drug development for sepsis. **Nat Rev Drug Discov**, v. 13, n. 10, p. 741–758, out. 2014.
- FITZSIMMONS, J.; SHAH, S. **Zika Virus. The New England journal of medicine** United States, jul. 2016.
- FOREL, J.-M. et al. Phenotype and functions of natural killer cells in critically-ill septic patients. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e50446, 2012.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci**, v. 14, 2009.
- FUNK, D. J.; PARRILLO, J. E.; KUMAR, A. Sepsis and septic shock: a history. **Critical**

care clinics, v. 25, n. 1, p. 83–101, viii, jan. 2009.

GALLEY, H. F. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in sepsis. **British journal of anaesthesia**, v. 107, n. 1, p. 57–64, jul. 2011.

GAUER, R. L. et al. Early Recognition and Management of Sepsis in Adults: The First Six Hours. 2013.

GETTINS, P. G. W. Serpin structure, mechanism, and function. **Chemical reviews**, v. 102, n. 12, p. 4751–4804, dez. 2002.

GIRARD, Y. A. et al. Transcriptome changes in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) salivary glands during West Nile virus infection. **J Med Entomol**, v. 47, 2010.

GONCALVES-DE-ALBUQUERQUE, C. F. et al. Omega-9 Oleic Acid Induces Fatty Acid Oxidation and Decreases Organ Dysfunction and Mortality in Experimental Sepsis. **PloS one**, v. 11, n. 4, p. e0153607, 2016.

GRANGER, J. I. et al. Sepsis-induced morbidity in mice: effects on body temperature, body weight, cage activity, social behavior and cytokines in brain. **Psychoneuroendocrinology**, v. 38, n. 7, p. 1047–1057, jul. 2013.

GRIFFITH, B. et al. NOX enzymes and pulmonary disease. **Antioxidants & redox signaling**, v. 11, n. 10, p. 2505–2516, out. 2009.

HARDAWAY, R. M.; WILLIAMS, C. H.; VASQUEZ, Y. Disseminated intravascular coagulation in sepsis. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 27, n. 6, p. 577–583, dez. 2001.

HE, K.-L.; TING, A. T. A20 inhibits tumor necrosis factor (TNF) alpha-induced apoptosis by disrupting recruitment of TRADD and RIP to the TNF receptor 1 complex in Jurkat T cells. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 17, p. 6034–6045, set. 2002.

HENKIN, C. S. et al. Sepse : uma visão atual Sepsis : current aspects. p. 135–145, [s.d.].

HOFFMAN, M. A cell-based model of coagulation and the role of factor VIIa. **Blood reviews**, v. 17 Suppl 1, p. S1-5, set. 2003.

HOLLENBERG, S. M. et al. Characterization of a hyperdynamic murine model of resuscitated sepsis using echocardiography. **American journal of respiratory and critical care medicine**, v. 164, n. 5, p. 891–895, set. 2001.

HOTCHKISS, R. S. et al. The sepsis seesaw: tilting toward immunosuppression. **Nature medicine**, v. 15, n. 5, p. 496–497, maio 2009.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. **Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach** *The Lancet infectious diseases*, mar. 2013a.

HOTCHKISS, R. S.; MONNERET, G.; PAYEN, D. Sepsis-induced

immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 12, p. 862–874, dez. 2013b.

HUET, O. et al. Oxidative stress and endothelial dysfunction during sepsis. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, v. 16, p. 1986–1995, 2011.

HUNTINGTON, J. A. Natural inhibitors of thrombin. **Thrombosis and haemostasis**, v. 111, n. 4, p. 583–589, abr. 2014.

HUSSEIN, A. M. et al. Beta Lactams Antibiotic Ceftriaxone Modulates Seizures, Oxidative Stress and Connexin 43 Expression in Hippocampus of Pentylentetrazole Kindled Rats. **Journal of epilepsy research**, v. 6, n. 1, p. 8–15, jun. 2016.

INADA, T. et al. Propofol depressed neutrophil hydrogen peroxide production more than midazolam, whereas adhesion molecule expression was minimally affected by both anesthetics in rats with abdominal sepsis. **Anesthesia and analgesia**, v. 92, n. 2, p. 437–441, fev. 2001.

INCE, C. **The microcirculation is the motor of sepsis** *Critical Care*, 2005.

INNERHOFER, P.; KIENAST, J. Principles of perioperative coagulopathy. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 24, n. 1, p. 1–14, mar. 2010.

INOUE, S. et al. Persistent inflammation and T cell exhaustion in severe sepsis in the elderly. **Critical care (London, England)**, v. 18, n. 3, p. R130, 2014.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Sepse : Um problema de saúde pública**. Brasília: Conselho Federal de Medicina, 2015.

INSTITUTO LATINO AMERICANO DE SEPSE. **Declaração Sepsis 3**. [s.l: s.n.].

JUHN, J. et al. Spatial mapping of gene expression in the salivary glands of the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Parasites & vectors**, v. 4, p. 1, 2011.

KABANOV, D. S.; PROKHORENKO, I. R. Structural analysis of lipopolysaccharides from Gram-negative bacteria. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 75, n. 4, p. 383–404, abr. 2010.

KAMBAYASHI, Y. et al. Efficient Assay for Total Antioxidant Capacity in Human Plasma Using a 96-Well Microplate. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 44, n. 1, p. 46–51, 27 jan. 2009.

KAMPOLI, A.-M. et al. Novel agents targeting nitric oxide. **Current vascular pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 61–76, jan. 2012.

KASTEN, K. R. et al. T-cell activation differentially mediates the host response to sepsis. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 34, n. 4, p. 377–383, out. 2010.

KAYMAK, C.; BASAR, H.; SARDAS, S. Reactive Oxygen Species (Ros) Generation in Sepsis. p. 41–47, 2012.

KEHRER, J. P.; KLOTZ, L.-O. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for Health. **Critical reviews in toxicology**, v.

45, n. 9, p. 765–798, 2015.

KOHN, H. I.; LIVERSEDGE, M. ON A NEW AEROBIC METABOLITE WHOSE PRODUCTION BY BRAIN IS INHIBITED BY APOMORPHINE, EMETINE, ERGOTAMINE, EPINEPHRINE, AND MENADIONE. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 82, n. 3, p. 292 LP-300, 1 nov. 1944.

KOVACH, M. A.; STANDIFORD, T. J. The function of neutrophils in sepsis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 25, n. 3, p. 321–327, jun. 2012.

KRAEMER, M. U. G. et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **eLife**, v. 4, p. e08347, 2015.

LEVER, A.; MACKENZIE, I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 335, n. 7625, p. 879–883, out. 2007.

LEVI, M.; TEN CATE, H. Disseminated intravascular coagulation. **The New England journal of medicine**, v. 341, n. 8, p. 586–592, ago. 1999.

LEVY, M. M. et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. **Critical care medicine**, v. 31, n. 4, p. 1250–1256, abr. 2003.

LOKUTA, M. A.; HUTTENLOCHER, A. TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 1, p. 210–219, jul. 2005.

LOLIS, E.; BUCALA, R. Therapeutic approaches to innate immunity: severe sepsis and septic shock. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, n. 8, p. 635–645, ago. 2003.

MACHAIN-WILLIAMS, C. et al. Association of human immune response to *Aedes aegypti* salivary proteins with dengue disease severity. **Parasite Immunol**, v. 34, 2012.

MAJHI, A. et al. Levofloxacin-ceftriaxone combination attenuates lung inflammation in a mouse model of bacteremic pneumonia caused by multidrug-resistant *Streptococcus pneumoniae* via inhibition of cytolytic activities of pneumolysin and autolysin. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5164–5180, set. 2014.

MAJNO, G. The ancient riddle of sigma eta psi iota sigma (sepsis). **The Journal of infectious diseases**, v. 163, n. 5, p. 937–945, maio 1991.

MARSHALL, J. C. The staging of sepsis: understanding heterogeneity in treatment efficacy. **Critical care (London, England)**, v. 9, n. 6, p. 626–628, 2005.

MARTINS, P. S. et al. Upregulation of reactive oxygen species generation and phagocytosis, and increased apoptosis in human neutrophils during severe sepsis and septic shock. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 20, n. 3, p. 208–212, set. 2003.

MAYR, F. B.; YENDE, S.; ANGUS, D. C. Epidemiology of severe sepsis. **Virulence**, v. 5, n. 1, p. 4–11, jan. 2014.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–6055, nov. 1969.

- MCCRACKEN, M. K. et al. Aedes aegypti salivary protein “aegyptin” co-inoculation modulates dengue virus infection in the vertebrate host. **Virology**, v. 468–470, p. 133–139, nov. 2014.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. J. Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. **Seminars in immunology**, v. 10, n. 5, p. 351–353, out. 1998.
- MELO, B. et al. Bioactive Compounds of the Salivary Glands from Aedes aegypti with Anti-Hemostatic Action. **Annual Research & Review in Biology**, v. 8, n. 2, p. 1–17, 2015.
- MILLER, N. J. et al. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. **Clinical science (London, England : 1979)**, v. 84, n. 4, p. 407–412, abr. 1993.
- MOHR, A. et al. Sepsis leads to a reduced antigen-specific primary antibody response. **European journal of immunology**, v. 42, n. 2, p. 341–352, fev. 2012.
- MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 25 fev. 2016.
- MONNERET, G. et al. The anti-inflammatory response dominates after septic shock: association of low monocyte HLA-DR expression and high interleukin-10 concentration. **Immunology letters**, v. 95, n. 2, p. 193–198, set. 2004.
- MONSERRAT, J. et al. Early alterations of B cells in patients with septic shock. **Critical care (London, England)**, v. 17, n. 3, p. R105, 2013.
- MUEHLSTEDT, S. G.; LYTE, M.; RODRIGUEZ, J. L. Increased IL-10 production and HLA-DR suppression in the lungs of injured patients precede the development of nosocomial pneumonia. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 17, n. 6, p. 443–450, jun. 2002.
- MUHL, D. et al. Comparison of oxidative stress & leukocyte activation in patients with severe sepsis & burn injury. **The Indian journal of medical research**, v. 134, p. 69–78, jul. 2011.
- MUSZYNSKI, J. A.; HALL, M. W. Sepsis-induced Innate and Adaptive Immune Suppression. v. 14, p. 67–73, 2011.
- NAKAE, H. et al. The effective removal of proinflammatory cytokines by continuous hemofiltration with a polymethylmethacrylate membrane following severe burn injury: Report of three cases. **Surgery Today**, v. 29, n. 8, p. 762–765, 1999.
- NAU, R.; EIFFERT, H. **Modulation of Release of Proinflammatory Bacterial Compounds by Antibacterials: Potential Impact on Course of Inflammation and Outcome in Sepsis and Meningitis** **Clinical Microbiology Reviews**, jan. 2002.
- O’SULLIVAN, S. T. et al. Major injury leads to predominance of the T helper-2 lymphocyte phenotype and diminished interleukin-12 production associated with decreased resistance to infection. **Annals of Surgery**, v. 222, n. 4, p. 482–492, out.

1995.

OCHOA, J. B. et al. Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis. **Annals of surgery**, v. 214, n. 5, p. 621–626, nov. 1991.

OCUIN, L. M. et al. Neutrophil IL-10 suppresses peritoneal inflammatory monocytes during polymicrobial sepsis. **Journal of leukocyte biology**, v. 89, n. 3, p. 423–432, mar. 2011.

OKAMOTO, K.; TAMURA, T.; SAWATSUBASHI, Y. **Sepsis and disseminated intravascular coagulation** *Journal of Intensive Care* London, 2016.

OPAL, S. M.; ESMON, C. T. Bench-to-bedside review: functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis. **Crit Care**, v. 7, 2003.

PAPPALARDO, F. et al. Protein C zymogen in severe sepsis: a double-blinded, placebo-controlled, randomized study. **Intensive care medicine**, v. 42, n. 11, p. 1706–1714, nov. 2016.

PARKER, S. J.; WATKINS, P. E. Experimental models of gram-negative sepsis. **The British journal of surgery**, v. 88, n. 1, p. 22–30, jan. 2001.

PASTILLE, E. et al. Modulation of dendritic cell differentiation in the bone marrow mediates sustained immunosuppression after polymicrobial sepsis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 2, p. 977–986, jan. 2011.

PELLETIER, M. et al. Evidence for a cross-talk between human neutrophils and Th17 cells. **Blood**, v. 115, n. 2, p. 335–343, jan. 2010.

PENG, Z. et al. Mosquito salivary allergen Aed a 3: cloning, comprehensive molecular analysis, and clinical evaluation. **Allergy**, nov. 2015.

PETRONILHO, F. et al. Alpha-Lipoic Acid Attenuates Oxidative Damage in Organs After Sepsis. **Inflammation**, v. 39, n. 1, p. 357–365, fev. 2016.

PINGEN, M. et al. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection Article Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1455–1469, 2016.

PIZARRO, C. F.; TROSTER, E. J. Função adrenal na sepse e choque séptico. **Jornal de Pediatria**, v. 83, p. S155–S162, 2007.

POEHLMANN, H. et al. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. **Critical care (London, England)**, v. 13, n. 4, p. R119, 2009.

RAMOS, A. D. Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato da glândula salivar de *Aedes aegypti*. [s.d.].

RAUCH, P. J. et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 335, n. 6068, p. 597–601, fev. 2012.

- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free radical biology & medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, maio 1999.
- REMICK, D. G. Pathophysiology of Sepsis. **The American Journal of Pathology**, v. 170, n. 5, p. 1435–1444, 23 maio 2007.
- REPETTO, M.; SEMPRINE, J.; BOVERIS, A. Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. p. 3–30, 2012.
- RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**, v. 4, n. 3, p. 143–152, set. 1995.
- RIBEIRO, J. M.; ARCA, B. From Sialomes to the Sialoverse: An insight into the salivary potion of blood feeding insects. **Adv Insect Physiol**, v. 37, 2009.
- RIBEIRO, J. M. C. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **J. exp. Biol**, v. 165, p. 61–71, 1992.
- RIBEIRO, J. M. C. et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC genomics**, v. 8, p. 6, 2007.
- RIBEIRO, J. M.; MANS, B. J.; ARCA, B. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 40, 2010.
- RIBET, D.; COSSART, P. How bacterial pathogens colonize their hosts and invade deeper tissues. **Microbes and infection**, v. 17, n. 3, p. 173–183, mar. 2015.
- RITTIRSCH, D. et al. Immunodesign of experimental sepsis by cecal ligation and puncture. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 31–36, 2009.
- RITTIRSCH, D.; FLIERL, M. A.; WARD, P. A. Harmful molecular mechanisms in sepsis. **Nature reviews. Immunology**, v. 8, n. 10, p. 776–787, out. 2008.
- ROBBINS, C. S.; SWIRSKI, F. K. **Newly discovered innate response activator B cells: crucial responders against microbial sepsis. Expert review of clinical immunology** England, jul. 2012.
- ROSSIGNOL, P. A.; LUEDERS, A. M. Bacteriolytic factor in the salivary glands of *Aedes aegypti*. **Comp Biochem Physiol B**, v. 83, 1986.
- RUSSELL, J. A. Management of sepsis. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 16, p. 1699–1713, out. 2006.
- SALES-CAMPOS, H. et al. *Aedes aegypti* salivary gland extract ameliorates experimental inflammatory bowel disease. **International immunopharmacology**, v. 26, n. 1, p. 13–22, maio 2015.
- SAN MARTIN, J. L. et al. The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am J Trop Med Hyg**, v. 82, 2010.
- SCHMID, M. A. et al. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent

Enhancement. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 6, p. e1005676, jun. 2016.

SCHNEIDER, B. S. et al. Aedes aegypti salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. **Viral immunology**, v. 17, n. 4, p. 565–573, 2004.

SCHNEIDER, B. S.; HIGGS, S. The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 102, n. 5, p. 400–408, maio 2008.

SCHULTE, W.; BERNHAGEN, J.; BUCALA, R. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets — An Updated View. v. 2013, 2013.

SHAO, B. et al. **Myeloperoxidase: An oxidative pathway for generating dysfunctional HDL** *Chemical research in toxicology*, mar. 2010.

SHIMAOKA, M.; PARK, E. J. Advances in understanding sepsis. **European journal of anaesthesiology. Supplement**, v. 42, p. 146–153, 2008.

SHUBIN, N. J.; MONAGHAN, S. F.; AYALA, A. Anti-inflammatory mechanisms of sepsis. **Contributions to microbiology**, v. 17, p. 108–124, 2011.

SIEMPOS, I. I. et al. Cecal ligation and puncture-induced sepsis as a model to study autophagy in mice. **Journal of visualized experiments : JoVE**, n. 84, p. e51066, fev. 2014.

SILVA, E. et al. Brazilian Sepsis Epidemiological Study (BASES study). **Critical care (London, England)**, v. 8, n. 4, p. R251-60, ago. 2004.

SINGER, M. et al. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). **JAMA**, v. 315, n. 8, p. 801–810, 23 fev. 2016.

SINGH, S.; EVANS, T. W. Organ dysfunction during sepsis. **Intensive care medicine**, v. 32, n. 3, p. 349–360, mar. 2006.

SMITH, T. M. et al. Cloning, expression, and characterization of a soluble calcium-activated nucleotidase, a human enzyme belonging to a new family of extracellular nucleotidases. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 406, n. 1, p. 105–115, 2002.

SOUZA-FONSECA-GUIMARAES, F. et al. Toll-like receptors expression and interferon-gamma production by NK cells in human sepsis. **Critical care (London, England)**, v. 16, n. 5, p. R206, 2012.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **Experimental parasitology**, v. 81, n. 3, p. 321–331, nov. 1995.

STEARNS-KUROSAWA, D. J. et al. The Pathogenesis of Sepsis. **Annual review of pathology**, v. 6, p. 19–48, 2011.

- STUEHR, D. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 82, n. 22, p. 7738–7742, nov. 1985.
- SULIMAN, H. B. et al. Lipopolysaccharide induces oxidative cardiac mitochondrial damage and biogenesis. **Cardiovascular research**, v. 64, n. 2, p. 279–288, nov. 2004.
- THANNICKAL, V. J.; FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology**, v. 279, n. 6, p. L1005–28, dez. 2000.
- TURNBULL, I. R. et al. Effects of age on mortality and antibiotic efficacy in cecal ligation and puncture. **Shock (Augusta, Ga.)**, v. 19, n. 4, p. 310–313, abr. 2003.
- VASCONCELOS, S. M. L. et al. **Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação** *Química Nova* scielo , , 2007.
- WALDNER, H. The role of innate immune responses in autoimmune disease development. **Autoimmunity reviews**, v. 8, n. 5, p. 400–404, mar. 2009.
- WANASEN, N. et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Medical and veterinary entomology**, v. 18, n. 2, p. 191–199, jun. 2004.
- WASSERMAN, H. A.; SINGH, S.; CHAMPAGNE, D. E. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. **Parasite immunology**, v. 26, n. September, p. 295–306, 2004.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, mar. 2015.
- WEIDINGER, A. et al. Vicious inducible nitric oxide synthase-mitochondrial reactive oxygen species cycle accelerates inflammatory response and causes liver injury in rats. **Antioxidants & redox signaling**, v. 22, n. 7, p. 572–586, mar. 2015.
- WONG, H. R. et al. Nitric oxide production in critically ill patients. **Archives of disease in childhood**, v. 74, n. 6, p. 482–489, jun. 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Vector-borne diseases**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs387/en/#>>.
- WU, S.-Q. et al. [Secretory expression of salivary ATP diphosphohydrolase (apyrase) from *Aedes albopictus* in *Pichia pastoris*]. **Zhongguo ji sheng chong xue yu ji sheng chong bing za zhi = Chinese journal of parasitology {&} parasitic diseases**, v. 31, n. 1, p. 73–75, 2013.
- YESILKAYA, H. et al. *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an

unusual approach to living with radicals. **Trends in microbiology**, v. 21, n. 4, p. 187–195, abr. 2013.

YILMAZ, N. et al. Ceftriaxone ameliorates cyclosporine A-induced oxidative nephrotoxicity in rat. **Cell biochemistry and function**, v. 29, n. 2, p. 102–107, mar. 2011.

ZANG, Q. et al. Cardiac mitochondrial damage and inflammation responses in sepsis. **Surgical infections**, v. 8, n. 1, p. 41–54, fev. 2007.

ANEXO

ANEXO 1

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
1	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35	225	20	35	2028.06
	SGS1 (<i>Ae. aegypti</i>) ^b	gi 66828491	346.51		5	15	733.86
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873896	369.18		4	13	643.09
	na ⁺ /k ⁺ atpase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871576	111.86		4	3	239.84
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879763	42.15		12	4	172.45
2	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35	211	14	22	1256.12
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873896	369.18		5	16	705.79
3	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35	201	36	63	3664.63
	Vitellogenin-B (<i>Ae. aegypti</i>) ^b	gi 37528873	250.39		4	8	389.27
	Glutamate synthase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108868750	231.67		2	4	145.47
4	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35	168	9	18	1106.45
	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468442	59.52		7	3	151.76
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879764	42.05		7	3	138.12
5	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35	141	10	21	1005.36
	Pyruvate carboxylase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 550486	132.85		6	7	312.53
	na ⁺ /k ⁺ atpase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871577	111.91		5	4	311.51
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108879668	71.58		10	6	289.44
	Stretchin-m1ck (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108876801	80.19		6	4	262.23
	Pupal-specific flight muscle actin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 41393662	41.84		18	6	242.55
	Fructose-bisphosphate aldolase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878478	39.97		13	4	226.9
6	na ⁺ /k ⁺ atpase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871577	111.91	124	19	15	1105.81
	2-Oxoglutarate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108877402	115.04		19	17	842.19
	Paramyosin, long form (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872770	103.39		13	11	592.78
	Calcium-transporting atpase sarcoplasmic/endoplasmic reticulum type (calcium pump) (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108877602	110.55		11	10	540.78
	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878633	222.35		2	4	258.77
	Glycogen phosphorylase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108884025	97.35	111	20	17	784.28
7	Alpha-actinin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108876788	104.20		12	10	612.73
	Elongation factor 2 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 12667408	95.31		9	8	335.54
	Spermatogenesis associated factor (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873203	89.43		9	7	275.19
	Dynammin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108876817	94.24		6	4	243.88
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879763	42.15		12	4	220.54
	Paramyosin, long form (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872770	103.39		4	4	199.61

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
8	Aconitase, mitochondrial (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108870681	86.41	102	56	31	1736.69
	Glutamate semialdehyde dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108877298	87.53		20	14	766.36
	Heat shock protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108868694	81.82		10	7	354.58
	Heat shock cognate 70 (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 94468818	72.35		10	6	284.42
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873896	369.18		1	3	216.65
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873839	81.32		10	7	218.96
	Myosin heavy chain, nonmuscle or smooth muscle (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878534	222.99		2	2	159.16
9	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873896	369.18	93	6	18	1169.56
	NADH-ubiquinone oxidoreductase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871047	80.11		18	10	611.62
	3-Hydroxyacyl-coa dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873690	82.87		9	6	324.3
	Heat shock cognate 70 (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 94468966	71.38		12	7	357.15
	Moesin/ezrin/radixin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108876119	69.13		9	6	272.3
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108880571	81.65		7	5	265.87
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881790	29.54		15	4	207.76
10	Transferrin precursor (<i>Ae. aegypti</i>) ^b	gi 2645497	71.70	81	32	18	942.53
	Apyrase, putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 108877845	63.17		23	11	547.61
	Proline oxidase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108870085	44.60		21	8	408.27
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881789	32.75		18	5	292.78
	Vitellogenin-C (<i>Ae. aegypti</i>) ^b	gi 37528871	243.28		3	6	273.14
	Succinate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873156	72.80		8	5	230.48
11	Chaperonin-60kD, ch60 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872102	61.15	72	14	7	307.99
	Transketolase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108879967	68.46		11	6	285.15
	Bifunctional purine biosynthesis protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108870755	64.64		7	4	185.01
	Proline oxidase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108870085	44.60		8	3	173.47
	Apyrase, putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 108877845	63.17		5	2	110.22
	Lamin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881054	64.01		4	3	100.61
	Failed axon connections protein, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881007	34.51		12	3	98.32
	Cytochrome P450 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108877345	62.65		5	2	95.91
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879764	42.05		5	2	86.32
	adp,atp carrier protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872852	28.85		9	2	73.15
12	Pyroline-5-carboxylate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878912	63.63	66	27	14	666.26
	Chaperonin-60kD, ch60 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872102	61.15		19	9	526.56
	Malic enzyme (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108883625	72.55		10	6	320.16
	Adenosine deaminase (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b,d}	gi 108878609	59.94		17	7	331.37
	Pyruvate kinase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108868621	58.04		18	7	305.23
	α -tubulin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468850	50.56		11	4	198.02
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879764	42.05		9	3	191.16

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
13	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468442	59.52	57	62	26	1626.05
	ATP synthase beta subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881686	53.87		55	19	1251.26
	β -4 tubulin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 111035022	50.59		39	12	670.51
14	ATP synthase beta subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881105	53.94	51	35	13	844.37
	Mitochondrial ATP synthase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468442	59.52		25	13	777.66
	Enolase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108882996	46.87		28	9	546.64
	Phosphoglycerate kinase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 18091771	44.05		25	10	503.85
	Pupal-specific flight muscle actin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 41393662	41.84		31	9	502.26
	Mitochondrial processing peptidase beta subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878872	52.84		18	8	487.53
	Serine protease inhibitor (serpin-4), putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^b	gi 108881841	50.03		23	9	484.3
	Translation elongation factor EF-1 alpha/Tu (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468780	50.78		25	10	458.31
	Succinyl-coa synthetase beta chain (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871926	48.64		16	7	420.09
	Putative serpin (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b,d}	gi 18568304	47.31		17	6	320.72
	Aspartate ammonia lyase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108875839	54.78		14	5	308.42
	Actin (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 108879764	42.05		17	5	260.23
	Imaginal disc growth factor (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108882601	48.28		10	4	239.51
	15	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex core protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108879066	45.88	45	33	11
Pupal-specific flight muscle actin (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 41393662	41.84		36	10	686.74
Citrate synthase (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108881547	51.85		29	12	577.39
Fructose-bisphosphate aldolase (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108878478	39.97		21	6	400.63
Creatine kinase (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468822	40.19		29	8	351.2
16	Fructose-bisphosphate aldolase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878479	39.55	41	48	14	954.41
	Creatine kinase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468822	40.19		51	14	832.83
	Isocitrate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108884328	44.04		32	10	535.44
	Pyruvate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108869893	42.80		10	4	211.72
	d-3-phosphoglycerate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878977	35.72		15	4	184.92
	Sodium/potassium-dependent atpase beta-2 subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872996	36.37		22	5	174.87
	Putative purine hydrolase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 18568280	38.16		7	3	123.13
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881790	29.54		8	2	84.51
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881788	31.03	40	31	9	396.92
ATP synthase beta subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881105	53.94		6	3	181.52	

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
18	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108883108	39.44	39	34	9	614.75
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881786	32.47		29	9	477.96
	D7 protein, putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 108877769	37.44		14	5	210.98
19	ATP synthase beta subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881105	53.94	38	27	11	687.94
	D7 protein, putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 108877769	37.44		28	10	435.98
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881783	32.61		24	7	415.68
	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108883107	39.83		19	5	261.53
20	D7 protein, putative (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 108877768	39.17	36	6	2	88.63
	Malate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108875864	45.04		19	7	427.58
	Electron transport oxidoreductase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108869776	34.44		12	3	207.17
	FOF1-type ATP synthase b subunit (<i>Ae. aegypti</i>) ^d	gi 94468834	53.93		6	3	177.09
	Putative 34 kDa secreted protein (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b,d}	gi 18568296	36.38		10	3	172.42
	Succinyl-CoA synthetase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468890	34.79		9	3	163.5
	Prohibitin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871326	33.12		12	4	141.06
	Tropomyosin invertebrate (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108881790	29.54		12	3	116.27
	21	Malate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108875864	45.04	34	37	13
14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108872598	29.60		21	5	271.81
Vacuolar ATP synthase subunit E (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94469084	25.72		17	4	191.63
Succinyl-CoA synthetase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468890	34.80		11	3	183.81
Mitochondrial porin (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468842	30.79		16	4	173.1
22		14-3-3 protein sigma, gamma, zeta, beta/alpha (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872598	29.60	31	41	9
	ATP synthase gamma subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108875130	33.01		31	8	499.79
	Multifunctional 14-3-3 family chaperone (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468884	28.32		33	7	443.26
	Mitochondrial porin (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468842	30.79		29	7	363.65
	Putative 30 kDa allergen-like protein (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 18568322	23.79		23	5	239.35
	adp,atp carrier protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872852	28.85		19	5	172.44
	30 kDa salivary gland allergen variant 3 (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b,d}	gi 94468552	27.91		11	3	167.84
	ADP/ATP translocase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468376	33.21		14	4	166.24
	Vacuolar ATP synthase subunit E (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94469084	25.72		20	4	151.98
	Malate dehydrogenase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108875864	45.04		7	3	149.5

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
23	Phosphoglycerate mutase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878150	28.59	28	40	9	562.34
	ADP/ATP translocase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468376	33.21		31	10	441.23
	Multifunctional 14-3-3 family chaperone (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468884	28.32		34	8	433.29
	adp, atp carrier protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108872852	28.85		29	8	369.73
	30 kDa salivary gland allergen variant 2 (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b,c}	gi 94468546	29.42		17	5	276.02
	Electron transfer flavoprotein beta-subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108879274	22.90		22	5	204.1
	Putative 30 kDa allergen-like protein (<i>Ae. aegypti</i>) ^{b-d}	gi 18568322	23.79		15	3	173.73
	Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108873666	23.63		12	3	163.2
	NADH-ubiquinone oxidoreductase 24 kda subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108878789	23.08		18	3	116.94
	24	Triosephosphate isomerase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108882001	26.70	26	32	6
Peroxiredoxin 6, prx-6 (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108882310	25.10		29	5	210.96
Secreted ferritin G subunit precursor, putative (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108876699	17.68		27	3	186.04
Creatine kinase (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468822	40.19		6	2	108.69
Mitochondrial ATP synthase alpha subunit (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468442	59.52		4	2	105.66
Conserved hypothetical protein (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108883588	21.79		14	2	104.93
adp, atp carrier protein (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108872852	28.85		9	2	102.97
Troponin i (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 108872887	24.66		9	2	95.02
Ribosomal protein S5 (<i>Ae. aegypti</i>)		gi 94468378	24.79		6	1	85.13
25		Ferritin subunit 1, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108876700	23.74	23	31	6
	Adenylate kinase isoenzyme (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108874575	22.57		22	4	257.7
	Glutathione s-transferase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 108871931	23.26		23	4	196.64
	40S ribosomal protein S8 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94468438	23.40		11	2	122.15
26	Hypothetical protein AaeL_AAEL004249 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157105256	17.24	21	26	3	146.76
	Myosin light chain 1, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157167811	18.15		15	2	108.88
	Calcium-binding protein, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157119961	22.12		10	3	94.79
27	Myosin light chain 1, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157167807	18.30	17	29	4	228.82
	Superoxide dismutase (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157127037	15.62		18	2	129.98
	Histone H2B (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157137739	13.86		25	3	124.59
	Cytochrome c oxidase subunit iv (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157108935	46.92		8	3	119.64
	Histone H4 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157138406	11.40		21	2	106.07

Band number excised	Protein name	Accession no. ^a	Molecular weight (kDa)		Coverage (%)	Number of MS/MS peptide sequences identified	Significance (Mascot score)
			Theoretical	Observed			
28	Histone H4 (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157138406	11.40	14	40	4	195.63
	Myosin light chain 1, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157167807	18.30		22	3	163.55
	Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase 13 kDa-B subunit (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 94469096	13.87		13	2	116.65
29	Cytochrome c oxidase, subunit VB, putative (<i>Ae. aegypti</i>)	gi 157119566	14.01	11	20	2	83.15
30	n.i.			7			

ANEXO 2



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "AVALIAÇÃO DO EFEITO IMUNOMODULADOR DA SALIVA DO MOSQUITO *Aedes aegypti* EM MODELO DE SEPSE", protocolado sob o CEUA nº 5919210516, sob a responsabilidade de **Marta Chagas Monteiro** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) em reunião de 30/06/2016.

We certify that the proposal "EVALUATION OF THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF THE *Aedes aegypti* MOSQUITO'S SALIVA IN SEPSIS MODEL", utilizing 60 Isogenics mice (60 males), protocol number CEUA 5919210516, under the responsibility of **Marta Chagas Monteiro** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes (or teaching) - it's in accordance with Law 11.794, of October 8 2008, Decree 6899, of July 15, 2009, with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 06/30/2016.

Vigência da Proposta: de 06/2016 a 07/2017

Área: Pos-graduação Em Ciências Farmacéuticas

Procedência: Biotério Central ICB/UFPA

Espécie: Camundongos isogênicos

Gênero: Machos

idade: 30 a 90 dias N: 60

Linhagem: Swiss

Peso: 20 a 30 g

Resumo: A sepsé são situações nas quais se estabelece uma síndrome de resposta inflamatória sistêmica desencadeada por infecção suspeita ou confirmada (SIQUEIRA-BATISTA et al, 2011). Esta síndrome é um grave problema de saúde pública em Unidade de Terapia Intensiva (UTI), sendo um desafio considerável e crescente aos cuidados de saúde. Sabe-se que a resposta normal do organismo contra agentes infecciosos é a inflamação, sendo que a sepsé e SRIS são caracterizadas pela produção excessiva de mediadores e recrutamento celular, resultando em um desequilíbrio metabólico onde o organismo não consegue estabelecer a homeostase (PEREIRA JR et al., 1998). Sabe-se que a saliva do *A. aegypti* é capaz de inibir a secreção de TNF-ALFA em mastócitos de ratos, porém a liberação de histamina por estas células não é afetada. Afeta, também, a proliferação de linfócitos de camundongo in vitro induzindo apoptose nessas células (BIZARRO et al., 2013; CROSS, CUPP e ENRIQUEZ, 1994; WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004). Além disso, WASSERMAN e colaboradores (2004), mostraram uma diminuição significativa de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF-?) e citocinas do perfil Th1, IL-2 e IFN-ALFA mas, pouco efeito foi observado nos níveis das citocinas Th2, IL-4 e IL-5. A partir destes dados acima, em conjunto, de que a saliva de *A. aegypti* apresenta forte ação imunomoduladora seria de grande interesse investigar se essa ação da saliva é capaz de proteger animais com sepsé de uma acentuada infecção e processo inflamatório, que levam o animal ao óbito. In vivo será utilizado o modelo de sepsé murino denominado de transfusão do coto-cecal, onde após o tempo de tratamento os animais serão sacrificados de acordo com a normas internacionais para pesquisa e experimentação em animal, com autorização prévia do Comitê de Ética Em Pesquisas Com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Para? (CEPAE/UFPA)

Belém do Pará, 14 de novembro de 2016

Prof. Dr. Moisés Hamoy
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará