UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA

LEILA SANTOS NETO

MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE SENSIBILIZAÇÃO E DESSENSIBILIZAÇÃO A PICADAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

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

São Paulo – SP

2018

LEILA SANTOS NETO

MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NO PROCESSO DE SENSIBILIZAÇÃO E DESSENSIBILIZAÇÃO A PICADAS DO MOSQUITO *Aedes aegypti*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Versão Original.

São Paulo – SP

2018

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Neto, Leila Santos
Mediadores e mecanismos envolvidos no processo de sensibilização e dessensibilização a picadas do mosquito Aedes aegypti / Leila Santos Neto; orientador Anderson de Sá Nunes. -- São Paulo, 2018.
97 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Aedes aegypti. 2. Saliva. 3. Alergia. 4. Sensibilização. 5. Dessensibilização. I. de Sá Nunes, Anderson , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Leila Santos Neto

Titulo da Tese: Mediadores e mecanismos envolvidos no processo de sensibilização e dessensibilização a picadas do mosquito *Aedes aegypti*

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a **...../...../.....**, considerou o(a) candidato(a):

( ) Aprovado(a) ( ) Reprovado(a)

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Examinador(a):

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

Presidente:

Assinatura: .....

Nome: .....

Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **75** nas fls. **20** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Anderson de Sá Nunes,** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Mediadores e mecanismos envolvidos no processo de sensibilização e dessensibilização a picadas do mosquito Aedes aegypti*" do qual participam o(s) aluno(s) **Leila Santos Neto, Michele Silva de Barros, Anderson Daniel Ramos, Priscila Guirão Lara,** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela *COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS* (CEUA) em **18.08.2014, com validade de 4 anos**.

São Paulo, 19 de agosto de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador- CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

EXPEDIÇÃO
DATA 2/5/14
REL. Nº 2323

Dedico este trabalho aos meus pais, Lori e Maria e também para todos aqueles em que o destino e a vida pediram para irem em busca dos seus sonhos, se distanciaram dos que mais amam e pagaram o alto preço de viver longe de casa. Nós que viemos não estamos livres do medo e de tantas fraquezas, mas estamos para sempre livres do medo de nunca termos tentado.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por estar comigo, me mantendo firme e lutando por tudo o que desejo e por suportar minhas fraquezas e me ajudar a superá-las.

A minha família, por depositar confiança em mim e me fazer acreditar que eu conseguiria, por participar da minha luta e acreditar no meu futuro e por sempre me dar forças para seguir em frente.

Ao meu companheiro e amigo Marcus Vinícius Gonçalves Lima, pelo carinho e pela paciência e disposição em me ouvir.

Aos amigos de longa data que estiveram comigo em todos os momentos (de alegria, de choro, de desespero, dentre muitos outros) e que me incentivaram mesmo estando longe: Tassiane Morais, Rafael Pessoa, Gilziane Paulo e Denize Dall' Agnol.

Aos companheiros e colegas do Laboratório de Imunologia Experimental, pelo tempo dispensado, e por terem sido de grande ajuda durante a realização deste trabalho: Bruna Bizarro, Eliane Esteves, Priscila Guirão Lara e Marcelo Salvatte Pinheiro.

Gostaria de agradecer especialmente a Maressa de Oliveira Henrique, Mariana Hayashi Garcia, Michele Silva de Barros e Josiane Betim Assis, que de colegas de laboratório passaram a ser amigas para uma vida e que sem elas este trabalho simplesmente não seria possível.

A nossa técnica Sandra Alexandre Alves, pelo o esmero e dedicação em seu trabalho.

Agradeço aqui também a todos os professores do Programa de Pós–Graduação em Imunologia que me permitiram tomar um pouco do seu conhecimento o que me fez capaz de escrever o conteúdo destas páginas.

A professora Margareth de Lara Capurro Guimarães do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, pela valorosa colaboração e por ceder os mosquitos *Aedes aegypti*.

As técnicas Isabel e Ediane pelo cuidado na criação e manutenção dos mosquitos utilizados neste projeto.

A Dra. Helena Correa de Araújo pelo ensino da técnica de oviposição dos mosquitos *Aedes aegypti.*

Ao meu orientador, Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, por ter confiado em mim e ter tido paciência e dedicação ao ensinar-me.

A FAPESP por fornecer recursos necessários para realização desta pesquisa e pelo fornecimento de bolsa de estudos para que eu pudesse me dedicar integralmente ao doutorado.

Por fim agradeço a todos que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram para que este estudo tivesse a forma que tem hoje.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Processo nº 2014/14379-4, pela bolsa-Doutorado e auxilio concedido, sem o qual não seria possível a realização deste estudo. Agradeço também à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido.

O saber aprendemos com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende com a vida e com os humildes.

Cora Coralina

RESUMO

NETO, L.S. **Mediadores e mecanismos envolvidos no processo de sensibilização e dessensibilização a picadas do mosquito *Aedes aegypti.*** 2018. 97 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Fêmeas da espécie *Aedes aegypti* são vetores de importantes doenças como dengue, febre amarela, Chikungunya e Zika. A alimentação sanguínea realizada pelo mosquito fêmea é importante e necessária para a maturação dos ovos. Durante este processo, os mosquitos hematófagos precisam lidar com desafios impostos pelo hospedeiro vertebrado como a barreira da hemostasia e seu sistema imunológico. Estudos clássicos mostraram que a exposição à saliva do mosquito é capaz de sensibilizar o homem, embora boa parte dos indivíduos apresente dessensibilização às proteínas salivares ao longo da vida. Resultados recentes do nosso grupo sugerem que o processo de sensibilização e dessensibilização pode ser reproduzido em modelo murino. Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo estudar os processos de sensibilização e dessensibilização aos antígenos salivares de *A. aegypti*, seu impacto no *fitness* biológico do mosquito (ingestão de sangue, oviposição e escolha do hospedeiro) e potenciais moléculas envolvidas nesse processo. Inicialmente, padronizamos um modelo de exposição natural, no qual camundongos BALB/c fêmeas foram expostos 10 vezes às picadas de 30 mosquitos *A. aegypti* fêmeas, com um intervalo de 15 dias entre cada exposição. Avaliamos o perfil de anticorpos séricos entre cada exposição e observamos uma mudança no padrão de anticorpos ao longo do tempo, inicialmente com forte componente Th2 (IgE total e IgG1 específica) e mais tardiamente, a presença de um componente Th1 (IgG2a específica). Além disso, o soro de animais expostos 4 vezes aos mosquitos apresentou atividade anafilática dependente de IgE superior ao soro de animais *naive* e de animais expostos 10 vezes ao mosquito. O perfil de citocinas presentes em culturas de células totais de baço mostrou forte produção de IL-4 e IL-5 antígeno-específicas, que foi semelhante entre os grupos expostos 4 ou 10 vezes aos mosquitos. A avaliação da migração celular na orelha induzida pelas picadas do mosquito mostrou que, comparado com as células residentes da orelha de animais *naive*, todos os tipos celulares fenotipados estavam presentes maior quantidade em tanto em animais expostos 4 vezes quanto expostos 10 vezes aos mosquitos, com destaque para os eosinófilos (aumentados ~2000 e ~1000 vezes, respectivamente). Entretanto, o número total de eosinófilos e de linfócitos B se mostrou reduzido, enquanto o número de neutrófilos estava aumentado, nos animais expostos 10 vezes quando comparados aos animais expostos 4 vezes. Do ponto de vista do vetor, não observamos grandes

alterações no volume de sangue ingerido durante o repasto sanguíneo, embora haja uma tendência de maior aquisição de sangue em animais expostos 7 vezes ao mosquito. Por outro lado, a oviposição foi gradativamente diminuída entre a segunda e a sétima exposição quando comparada com a primeira exposição, voltando aos níveis originais à partir da oitava exposição. Um modelo de inflamação peritoneal aguda induzido pela inoculação do extrato da glândula salivar (EGS) de fêmeas do mosquito *A. aegypti*, revelou um aumento de eosinófilos, semelhante ao observado no modelo crônico de inflamação na orelha. Esse modelo foi usado para estudar o papel de moléculas do hospedeiro potencialmente envolvidas na migração eosinofílica em resposta aos antígenos salivares, revelando a importância da IL-5 e dos leucotrienos nesse processo. Assim, podemos concluir que a saliva do mosquito *A. aegypti* provoca uma forte resposta alérgica em camundongos, que apesar de não alterar o volume de sangue ingerido pelos mosquitos, é capaz de afetar sua oviposição. A exposição crônica induz um processo de dessensibilização, com aumento de anticorpos de perfil Th1 e diminuição da migração de eosinófilos no sítio da picada, mas que se refletiu em maior oviposição por parte dos mosquitos. Finalmente, IL-5 e leucotrienos são mediadores que parecem estar envolvidos na inflamação eosinofílica em resposta aos componentes salivares do mosquito.

Palavras – chave: *Aedes aegypti*, saliva, alergia, sensibilização, dessensibilização, eosinófilos.

ABSTRACT

NETO, L.S. **Mediators and mechanisms involved in the sensitization and desensitization to *Aedes aegypti* bites.** 2018. 97 p. Tesis (PhD. in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Females of *Aedes aegypti* species are vectors of important diseases such as dengue, Yellow Fever, Chikungunya Fever and Zika. The blood meal is essential and necessary for the maturation of eggs in female mosquitoes. During this process, hematophagous mosquitoes need to cope with challenges imposed by the vertebrate host, such as the hemostasis and the immune system barriers. Classical studies have shown that exposure to mosquito saliva is able to sensitize humans, although most individuals show desensitization to salivary proteins throughout their lives. Recent results from our group suggest that the process of sensitization and desensitization can be reproduced in a murine model. Thus, the aim of the present work was to study the sensitization and desensitization processes to *A. aegypti* salivary antigens, their impact on the biological fitness of the mosquito (blood ingestion, oviposition and host choice) and potential molecules involved in this process. Initially, we standardized a model of natural exposure in which female BALB/c mice were exposed 10 times to the bites of 30 female *A. aegypti* mosquitoes, with a 15-day interval between each exposure. We evaluated the serum antibody profile between each exposure and observed a change in antibody pattern over time, initially with a strong Th2 component (total IgE and specific IgG1) and later, the presence of a Th1 (specific IgG2a) component. In addition, the serum of animals exposed 4 times to the mosquitoes showed stronger IgE-dependent anaphylactic activity than the serum of naive animals and animals exposed 10 times to the mosquitoes. The cytokine profile in spleen cell cultures showed strong antigen-specific production of IL-4 and IL-5, similar between the groups exposed 4 or 10 times to the mosquitoes. The evaluation of cell migration into the ear induced by mosquito bites showed that, compared to the resident cells of the ear of naive animals, all phenotyped cell types were present in larger amounts in both animals exposed, 4 times and 10 times, to mosquitoes, specially eosinophils (increased ~2000 and ~1000 times, respectively). However, the total number of eosinophils and B lymphocytes was reduced, while the number of neutrophils was increased, in animals exposed 10 times when compared to animals exposed 4 times. From the vector perspective, we did not observe significant changes in the volume of blood taken during the blood feeding, although there is a tendency of greater blood acquisition in animals exposed 7 times to the mosquitoes. On the other hand, the

oviposition was gradually diminished between the second and the seventh exposure when compared to the first exposure, returning to the original levels from the eighth exposure. A model of acute peritoneal inflammation induced by the inoculation of female *A. aegypti* salivary gland extract (SGE) revealed an increase in eosinophils, similar to that observed in the chronic model of inflammation in the ear. This model was used to study the role of host molecules potentially involved in eosinophil migration in response to salivary antigens, revealing the importance of IL-5 and leukotrienes in this process. Thus, we can conclude that the saliva of the *A. aegypti* mosquito causes a strong allergic response in mice that it does not alter the volume of blood ingested by mosquitoes, but it is able to affect their oviposition. Chronic exposure induced a desensitization process, with increased antibodies of Th1 profile and decreased eosinophil migration to the bite site, but that resulted in greater oviposition by the mosquitoes. Finally, IL-5 and leukotrienes are mediators that seem to be involved in eosinophilic inflammation in response to the salivary components of the mosquito.

Key Words: *Aedes aegypti*, saliva, allergy, sensitization, desensitization, eosinophils.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquematização do protocolo experimental utilizado para o desafio das orelhas de camundongos aos mosquitos *A. aegypti*	36
Figura 2	Estratégia de imunofenotipagem para análise de células da orelha por citometria de fluxo	39
Figura 3	Ensaio de PCA	40
Figura 4	Esquematização da exposição de camundongos aos mosquitos *A. aegypti* para avaliação da escolha no repasto sanguíneo	42
Figura 5	Estratégia de imunofenotipagem para análise de células da cavidade peritoneal por citometria de fluxo	45
Figura 6	Produção de IgE total, IgG1 e IgG2a específicas para antígenos salivares no soro de camundongos expostos à picadas de *A. aegypti* ..	49
Figura 7	PCA induzida em animais que receberam soro de animais *naive* e animais expostos 4 e 10 vezes a picadas do mosquito *A. aegypti*	51
Figura 8	Proliferação e citocinas produzidas por células totais de baço de camundongos *naive* e expostos a picadas do mosquito *A. aegypti*	54
Figura 9	Cinética do edema e migração celular para a orelha induzidas pela picada do mosquito *A. aegypti*	56
Figura 10	Migração de células mieloides para a orelha de camundongos expostos ou não a picadas de *A. aegypti*	58
Figura 11	Migração de células linfoides para a orelha de camundongos expostos ou não a picadas de *A. aegypti*	59
Figura 12	Ingestão de sangue por mosquitos *A. aegypti* em camundongos com diferentes níveis de exposição	62
Figura 13	Oviposição de mosquitos *A. aegypti* após o repasto em camundongos.....	64
Figura 14	Atratividade de camundongos *naive* e sensibilizados pelas picadas de *A. aegypti*	66
Figura 15	Células totais do LCP de camundongos inoculados com EGS de *A. aegypti*	68
Figura 16	Células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos no LCP de camundongos inoculados com EGS de *A. aegypti*	69
Figura 17	Determinação de IL-5 e papel dessa citocina na migração eosinofílica induzida pelo EGS de *A. aegypti* para a cavidade peritoneal de camundongos.....	72
Figura 18	Papel dos leucotrienos na migração eosinofílica induzida pelo EGS de *A. aegypti* para a cavidade peritoneal de camundongos	73
Figura Suplementar 1	Imunofenotipagem de populações mieloides da cavidade peritoneal de camundongos inoculados com PBS ou EGS de *A. aegypti*.....	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estágios das reações cutâneas a picadas de insetos hematófagos..... 25

Tabela 2 Anticorpos utilizados para avaliação dos marcadores extracelulares em células do infiltrado celular na orelha por citometria de fluxo..... 37

Tabela 3 Anticorpos utilizados para avaliação dos marcadores extracelulares em células do LCP por citometria de fluxo..... 44

Tabela 4 Quantificação relativa das populações de leucócitos da orelha de animais *naive* (0x) e de animais sensibilizados (4x e 10x) e posteriormente desafiados com a picada de mosquitos *A. aegypti*..... 60

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – Grupo de diferenciação (do inglês "*Cluster of Differentiation*")

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

D.O. – Densidade óptica

EGS – Extrato da glândula salivar

ELISA - Ensaio imunoenzimático (do inglês *"Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay*")

FACS – Citometria de Fluxo (do inglês *"Fluorescence-Activated Cell Sorting"*)

FSC – Tamanho (do inglês "*Foward Scatter*")

GM-CSF – Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (do inglês *"Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor")*

H_3PO_4 – Ácido fosfórico

IFN-γ – Interferon gama

IL – Interleucina

Ig – Imunoglobulina

i.p. – intraperitonealmente

kDa – Quilodalton

LCP – Lavado da cavidade peritoneal

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade (do inglês "*Major Histocompatibility Complex"*)

PBS – Salina tamponada com fosfato (do inglês "*Phosphate-Buffered Saline*")

PCA - Anafilaxia cutânea passiva (do inglês *"passive cutaneous anaphylaxis*"

SFB – Soro fetal bovino

SSC - Granulosidade (do inglês *"Side Scatter")*

Th1 – T auxiliar 1 (do inglês *"T helper 1"*)

Th2 – T auxiliar 2 (do inglês *"T helper 2")*

TNF-α – Fator de necrose tumoral – alfa (do inglês *"Tumor necrosis fator – α"*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 19

1.1 Atividades biológicas dos componentes salivares do mosquito Aedes aegypti 20

1.2 Sensibilização e dessensibilização a picadas de mosquitos A. aegypti 23

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS.....28

3 MATERIAL E MÉTODOS 31

3.1 Animais 32

3.2 Extrato da glândula salivar (EGS) 32

3.3 Modelo de sensibilização e dessensibilização à picadas de A. aegypti 33

3.4 Avaliação da resposta humoral de camundongos BALB/c expostos a picadas de A. aegypti 33

3.5 Avaliação da proliferação e do perfil de citocinas por células totais de baço de camundongos BALB/c expostos a picadas de A. aegypti 34

3.6 Desafio de animais previamente expostos a picadas do mosquito A. aegypti. 36

3.7 Caracterização do infiltrado celular no tecido da orelha por citometria de fluxo 37

3.8 Ensaio de transferência de imunidade - anafilaxia cutânea passiva (PCA – do inglês "passive cutaneous anaphylaxis) 40

3.9 Avaliação de preferência do repasto sanguíneo in vivo.....41

3.10 Avaliação do volume sanguíneo após repasto do A. aegypti 42

3.11 Oviposição 43

3.12 Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos inoculados com EGS de A. aegypti*: modelo de inflamação aguda* 43

3.13 Imunofenotipagem celular do LCP por citometria de fluxo 44

3.14 Participação da IL-5 na eosinofilia induzida pelo EGS de A. aegypti.....46

3.15 Participação dos leucotrienos na eosinofilia induzida pelo EGS de A. aegypti 46

3.16 Análise estatística 46

4 RESULTADOS 47

4.1 Perfil de anticorpos séricos de animais expostos a picadas do mosquito A. aegypti 48

4.2 Ensaio de PCA 50

4.3 Perfil de citocinas na cultura de esplenócitos de animais naive *e expostos 4 e 10 vezes às picadas de* A. aegypti 52

4.4 Avaliação do edema e da migração celular na orelha de animais naive *e expostos 4 e 10 vezes à picadas de* A. aegypti 55

4.5. Avaliação do volume de sangue ingerido pelos mosquitos A. aegypti *ao longo das exposições* 61

4.6 Ensaio de Oviposição 63

4.7. Escolha da fonte do repasto sanguíneo por mosquitos A. aegypti *em camundongos* naive *e previamente expostos a picadas* 65

4.8 Modelo de inflamação aguda induzida pelos componentes salivares de A. aegypti *na cavidade peritoneal* 67

5 DISCUSSÃO 74

6 CONCLUSÕES 84

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 86

8. APÊNDICE 97

1. INTRODUÇÃO

1.1 Atividades biológicas dos componentes salivares do mosquito Aedes aegypti

Do ponto de vista da saúde pública, os mosquitos hematófagos são os principais responsáveis pela transmissão de doenças infecciosas e parasitárias de importância clínica e epidemiológica para o homem, tais como malária, filariose, febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika, dentre outras. Esses vetores estão distribuídos em todo território brasileiro e apresentam uma ampla capacidade de adaptação às mudanças climáticas e à invasão do homem ao seu *habitat* natural (BEZERRA et al., 2016; BOGOCH et al., 2016; CARRINGTON; CAMERON, 2014; GUBLER, 2002). Dentre as espécies de mosquitos de importância médica, *Aedes aegypti* é a melhor caracterizada até o momento. Tanto os machos quanto as fêmeas dessa espécie precisam de carboidratos para seu metabolismo basal, normalmente obtido do néctar das plantas ou qualquer outra fonte contendo açúcares simples. No entanto, as fêmeas necessitam se alimentar também de sangue para obter os nutrientes necessários para o amadurecimento dos ovários e o desenvolvimento dos ovos (CHRISTOPHERS, 1960; FORATTINI, 2002). No momento do repasto sanguíneo, a ruptura dos vasos sanguíneos provocada pelo vetor na pele do hospedeiro vertebrado desencadeia mecanismos de hemostasia, um sistema redundante e complexo que atua limitando o fluxo sanguíneo no local da picada de maneira a reduzir a hemorragia, além de iniciar a agregação plaquetária e a coagulação sanguínea. Como esses processos potencialmente dificultam a alimentação, as fêmeas de *A. aegypti* desenvolveram em sua saliva substâncias com potentes ações vasodilatadoras, anti-agregante de plaquetas e anti-coagulantes (CHAMPAGNE, 2006; FONTAINE et al., 2011a; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). A atividade vasodilatadora é decorrente das moléculas salivares sialocinina I e sialocinina II, peptídeos com massa molecular de aproximadamente 1400 Da, membros da família das taquicininas (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992). A inibição da agregação plaquetária é provocada pela enzima apirase (ATP-difosfohidrolase), que possui a capacidade de hidrolisar ATP e ADP liberados por plaquetas ativadas e células endoteliais lesadas (CHAMPAGNE et al., 1995; RENO; NOVAK, 2005; RIBEIRO et al., 1984). Outro inibidor encontrado na saliva de *A. aegypti* é a aegyptina, uma proteína capaz de se ligar à integrina α2β1,à glicoproteína VI e ao fator de von Willebrand, todos expressos pelas plaquetas e que estão envolvidos no processo de agregação plaquetária (CALVO et al., 2007). Já a atividade anticoagulante é desempenhada por inibidores de serinoproteases (serpinas) denominados AaTI (do inglês "*Aedes aegypti trypsin inhibitor*") e AFXa (do inglês "*Anticoagulant-factor Xa*"), que se ligam a trombina e ao fator Xa, respectivamente (WATANABE et al., 2010, 2011; STARK; JAMES, 1995, 1998). Uma

outra serpina, caracterizada pelo nosso grupo e denominada AET-7393, foi capaz de aumentar o sangramento de camundongos inoculados com a molécula, mas os seus mecanismos de ação ainda não foram elucidados (LINO, 2013).

Um segundo desafio encontrado pelo *A. aegypti* no momento de sua alimentação é a reação inflamatória e imune que ocorre na pele do hospedeiro. Por isso, além dos componentes com atividades anti-hemostáticas descritos acima, a saliva das fêmeas dessa espécie também possui diversas moléculas com ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras. Porém, a literatura a respeito deste assunto ainda é bastante reduzida e pouco se conhece sobre as moléculas responsáveis por tais atividades, sendo que muitos estudos se baseiam em preparações brutas conhecidas como extrato da glândula salivar (EGS). Por exemplo, o EGS de *A. aegypti* fêmeas é capaz de inibir a produção de TNF-α por mastócitos peritoneais de ratos, não afetando sua desgranulação (BISSONNETTE; ROSSIGNOL; BEFUS, 1993). O EGS do mosquito também é capaz de inibir a proliferação policlonal e antígeno-específica de linfócitos T (CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). Trabalhos do nosso grupo revelaram que essa inibição é decorrente de morte celular dos linfócitos mediada pela ativação de caspase-3 e de caspase-8 (BIZZARRO et al., 2013), que ocorre de maneira seletiva em linfócitos, mas não em células dendríticas ou neutrófilos (BIZZARRO et al., manuscrito em preparação). A produção de citocinas do perfil Th1 (IFN-γ e IL-2) e pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF-α) pelos linfócitos também é inibida pelo EGS, porém as citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-5) são pouco afetadas (CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). Outra atividade encontrada na saliva de *A. aegypti* é a indução da polarização das respostas imunes adaptativas para um perfil Th2, com o aumento dos níveis séricos de anticorpos do tipo Th2 (IgE e IgG1) em camundongos expostos a sucessivas picadas ou imunizados com o EGS do mosquito (BARROS et al., 2016; CHEN; SIMONS; PENG, 1998; PENG; SIMONS, 1998, 2004). Além desse fenótipo, também já foi demonstrado que esplenócitos de animais expostos às picadas de *A. aegypti* produziram níveis maiores das citocinas IL-4 e menores de IFN-γ (CHEN; SIMONS; PENG, 1998). Uma molécula denominada SAAG-4, presente na saliva de *A. aegypti*, foi identificada como sendo um fator capaz de induzir a expressão de IL-4 e programar a diferenciação de células T $CD4^+$ para o padrão Th2 (BOPPANA et al., 2009). Outra molécula presente na saliva, a sialocinina I (descrita originalmente com um vasodilatador), é capaz de reduzir a produção de citocinas do tipo Th1 e aumentar a produção de citocinas do perfil Th2 (ZEIDNER et al., 1999). Por outro lado, o EGS de *A. aegypti* não foi capaz de afetar a diferenciação, maturação e função de células

dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos (BIZZARRO et al., 2013), assim como não foi capaz de alterar a expressão de moléculas de superfície envolvidas nas funções dessas células (CD40, CD83 e MHC de classe I e de classe II) em células dendríticas mielóides humanas infectadas com vírus da dengue (ADER et al., 2004). Em macrófagos, foi demonstrado que o EGS de *A. aegypti* diminui significativamente a expressão de IFN-β e NO sintase induzível enquanto aumenta de maneira transiente a expressão de IL-10 (SCHNEIDER et al., 2010) Um outro trabalho mostrou que a saliva do *A. aegypti* é capaz de diminuir a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1α, IL-6, IL-12 e TNF-α produzidas por macrófagos murinos da linhagem J744 estimulados com LPS e IFN-γ (WASSERMAN, 2005). E nosso grupo demonstrou que em macrófagos peritoneais murinos, a produção de óxido nítrico e das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-12 é diminuída na presença do EGS de *A. aegypti*, enquanto a produção de IL-10 é aumentada. Essas alterações estão associadas a uma diminuição da atividade bactericida dos macrófagos, mas não são acompanhadas por morte celular, por polarização para o peril M2 ou por alterações na expressão de CD40, CD80 e CD86 nos macrófagos (BARROS, 2017).

Conhecendo o papel dos componentes imunomoduladores na saliva de *A. aegypti*, alguns pesquisadores propõem que essas moléculas podem se tornar potenciais alvos no desenvolvimento de vacinas ou outras medidas profiláticas com o objetivo de controlar a transmissão de doenças (TITUS; BISHOP; MEJIA, 2006). Por essas razões, esses componentes também apresentam potencial terapêutico, podendo ser utilizados no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. Nesse contexto, trabalhos em andamento do nosso grupo e outros realizados em colaboração demonstraram que o EGS de *A. aegypti* é capaz de melhorar o quadro clínico em modelos experimentais para o estudo da esclerose múltipla (RAMOS, 2014), hepatite autoimune (ASSIS, 2018) e de doenças inflamatórias intestinais (LARA, 2017; SALES-CAMPOS et al., 2015).

1.2 Sensibilização e dessensibilização a picadas de mosquitos A. aegypti

Como já dito anteriormente, para se alimentar com sucesso, as fêmeas do mosquito *A. aegypti* necessitam primeiramente localizar vasos sanguíneos após a ruptura física da pele e, posteriormente, lidar com dois desafios apresentados pelo hospedeiro vertebrado: a barreira da hemostasia e de seu sistema imunológico (RIBEIRO, 2000). Durante esse processo, a secreção salivar é depositada no tecido do hospedeiro tanto durante o "*probing*" (processo de inserção da probóscide e inoculação de saliva em busca de vasos sanguíneos) quanto durante o repasto sanguíneo. Se por um lado o coquetel salivar introduzido no hospedeiro durante o repasto sanguíneo possui as atividades bioquímicas e imunofarmacológicas descritas anteriormente, por outro, essas mesmas moléculas são potencialmente antigênicas (RIBEIRO, 1987). Os primeiros relatos de que as reações cutâneas a picadas de mosquitos hematófagos diferem entre os indivíduos e que exposições repetidas causam alterações nessas respostas foram publicados há quase um século (BOYCOTT, 1928; GORDON, 1922). Porém, os estudos pioneiros mostrando que a reação à picada de mosquitos é de natureza imunológica e a descrição da sequência de eventos decorrentes dessa exposição aconteceram apenas nas décadas seguintes (MCKIEL, 1959; MELLANBY, 1946).

Mellanby (1946) realizou um estudo na Inglaterra com 25 voluntários que nunca haviam viajado para fora do país e que, portanto, provavelmente nunca haviam entrado em contato com o mosquito *A. aegypti* naquela época. Ele observou que quando esses indivíduos eram expostos pela primeira vez aos mosquitos, apenas uma pequena região vermelha, de 1 mm de diâmetro, era observada no sítio da picada, mas nenhuma outra reação cutânea imediata visível ou coceira se desenvolvia. Porém, após um período que variou de indivíduo para indivíduo, foi observada uma reação tardia no local, com um halo avermelhado de até 3 cm e uma pápula central de 1 cm associados a coceira e outros sintomas. A exposição repetida aos mosquitos durante um mês alterou drasticamente a reação observada, com o desenvolvimento de uma reação imediata envolvendo pápula, rubor e coceira. Após 2 horas, esses sintomas desapareciam, mas no dia seguinte a reação tardia descrita voltava a aparecer. Após mais um período de exposição frequente aos mosquitos, a reação imediata continuava a aparecer, mas a reação tardia lentamente diminuiu. Apesar deste estudo não ter continuado a partir desse ponto, na época já existiam relatos de pessoas afirmando que após repetidas exposições a milhares de picadas, a reação imediata também desaparecia. Já McKiel (1959), trabalhando com modelos experimentais, mostrou que nem os mosquitos inteiros nem suas secreções são

tóxicos quando inoculados em animais de laboratório. Ele também observou que coelhos e cobaias não desenvolveram reações cutâneas após a primeira exposição aos mosquitos, exceto uma pequena hemorragia ocasional causada pela lesão mecânica decorrente do repasto sanguíneo. Após várias exposições, esses animais desenvolveram uma reação imediata e uma reação tardia de natureza alérgica. Esses animais sensibilizados por picadas de mosquito responderam ao desafio tanto com extrato de cabeça/tórax quando com extrato da região abdominal, porém enquanto o primeiro extrato foi capaz de sensibilizar os animais para responder às picadas, o segundo extrato não apresentou tal capacidade. Finalmente, esse estudo concluiu que a secreção salivar apresentava mais de um antígeno "sensibilizante", o que de fato foi confirmado por estudos posteriores apresentados a seguir a respeito dos alérgenos salivares de *A. aegypti*.

Em um trabalho mais recente, Peng e Simons (1998), realizaram um estudo prospectivo avaliando paralelamente a resposta de um ser humano e de um coelho expostos a mosquitos de maneira prolongada. A cada 2 semanas, por 48 semanas, um indivíduo que nunca antes foi picado por *Culex quinquefasciatus* foi exposto cerca de 100 mosquitos criados em laboratório. Em paralelo, os coelhos receberam cerca de 140 picadas de *A. aegypti* toda semana por 10 meses. O soro do paciente e do animal foi coletado a cada duas semanas. A resposta imediata na pele e a resposta humoral de anticorpos saliva-específicos IgE e IgG foram monitorados. Inicialmente as picadas não provocaram reações visíveis na pele. Em ambos os casos, reações imediatas e tardias se desenvolveram a partir da terceira semana, com um pico entre as semanas 5-19 e finalmente desapareceram por volta da vigésima sexta semana no ser humano e um pouco antes no coelho. A resposta dos anticorpos a antígenos salivares IgE e IgG específica para o *C. quinquefasciatus* ocorreu em paralelo as reações imediata e tardia na pele no ser humano, mas a resposta de IgG voltou a crescer à partir da 20ª semana e se manteve até o final do período de observação (50ª semana). Já no coelho, a resposta de IgG específica para o *A. aegypti* surgiu à partir da 5ª semana, alcançou um platô entre a 20ª e a 30ª semana e somente a partir daí começou a reduzir até o final do período de observação. Diante destes achados, os autores sugeriram que o processo completo de sensibilização e dessensibilização natural poderia ocorrer em ambas as espécies, com algumas especificidades inerentes à espécie do hospedeiro e do mosquito. Todavia vale ressaltar que em seres humanos, tanto a sensibilização quanto a dessensibilização natural a picadas de mosquitos pode levar anos para ocorrer, ou serem adquiridas através de reações cruzadas com outros antígenos salivares de espécies diferentes, ou ainda, nunca acontecer.

Em alguns casos, durante o processo de sensibilização, o indivíduo pode não apresentar reação alguma ao passo que em outros casos, o indivíduo pode apresentar uma variedade de reações no local da picada. Numerosos casos clínicos indicam que alguns indivíduos respondem a picada com uma reação na pele visível de 10 a 15 minutos após a picada e desaparecendo após algumas horas. Este tipo de reação pode ser classificado como reação imediata a picada e é caracterizada usualmente pelo aparecimento de prurido e consistente eritema e edema no local, as quais podem progredir para reações de fase tardia e persistir por dias e algumas vezes por semanas ou meses (FEINGOLD; BENJAMIN; MICHAELI, 1968). Nas últimas décadas, diversos outros estudos acerca deste processo de sensibilização a picadas de artrópodes designaram estágios semelhantes de sensibilização do hospedeiro vertebrado após a picada de insetos hematófagos (BENJAMINI et al., 1961; LARRIVEE et al., 1964; MCKIEL, 1955; MELLANBY, 1946). À partir desses estudos, foram definidos os 5 estágios de reatividade do hospedeiro à picada desses insetos, ainda aceitos até os dias de hoje (Tabela 1).

Tabela 1. Estágios das reações cutâneas a picadas de insetos hematófagos.

Estágio I	Período de indução de hipersensibilidade – não ocorrem reações cutâneas
Estágio II	São observadas reações tardias na pele
Estágio III	Ocorre reação imediata seguida de reação tardia
Estágio IV	Ocorre somente reação imediata
Estágio V	Não ocorre nenhum tipo de reação

Assim, desde os primeiros estudos até os dias atuais, acredita-se que sequência de eventos cutâneos decorrente da picada de insetos hematófagos envolvam um processo de sensibilização crescente (reação negativa – somente reação tardia – reação imediata e tardia) seguida por um processo de dessensibilização (reação imediata e tardia – somente reação imediata – reação negativa) (HEILESEN, 1949). Entretanto, não é possível afirmar com certeza que o processo de dessensibilização realmente ocorra em pessoas naturalmente expostas ao mosquito porque como já dito, na vida real a sensibilização natural pode levar anos para ocorrer ou pode mesmo nunca ocorrer, uma vez que as pessoas geralmente evitam a exposição aos mosquitos quando possível. De fato, para muitas pessoas, as picadas de mosquitos representam apenas um pequeno incômodo decorrente de reações cutâneas limitadas que envolvem a formação de pápula

e eritema e que em alguns casos causam coceira. O termo “alergia a mosquitos” somente é utilizado quando durante o processo de sensibilização, o indivíduo desenvolve graus variados de sintomas após a picada de um mosquito, que consistem em reações não usuais vesiculadas e equimóides, que podem progredir para urticária generalizada e anafilaxia (BRUMMER-KORVENKONTIO; LAPPALAINEN, 1994; ENGLER, 2001; KULTHANAN; WONGKAMCHAI, 2010). Uma reação grave, conhecida como Síndrome de Skeeter, foi descrita e consiste em uma intensa reação inflamatória local induzida pela picada de mosquitos que por vezes é acompanhada de febre (SIMONS; PENG, 1999).

Com base nessas informações, é possível afirmar que a alergia causada por mosquitos é de significância clínica crescente e tem um impacto negativo na vida da população de um modo geral. Embora a opinião dominante é que a alergia as mosquitos seja altamente prevalente, há poucos estudos epidemiológicos dando suporte a essa percepção (AGARWAL et al., 1991; GONZALEZ DIAZ et al., 2010) e nenhum deles foi realizado na América do Sul. Eliminando-se os fatores do “trauma físico” (ocasionado pela inserção das peças bucais dos insetos na pele) e da presença de detritos de mosquitos na poeira doméstica, há várias décadas se reconhece o papel da saliva dos mosquitos em todo esse processo de sensibilização alérgica (FEINGOLD; BENJAMIN; MICHAELI, 1968). Corroborando essa visão, (HUDSON et al., 1960) demonstraram que se os dutos das glândulas salivares de *A. aegypti* são cortados, os mosquitos ainda são capazes de se alimentar, mas as reações cutâneas normalmente associadas às picadas não ocorrem.

De maneira geral, em processos alérgicos a saliva de *A. aegypti* é capaz de induzir a polarização da resposta imune para um perfil Th2 em camundongos expostos a sucessivas picadas ou imunizados com o EGS do mosquito (BARROS et al., 2016; CHEN; SIMONS; PENG, 1998; PENG; SIMONS, 1998, 2004). Nosso grupo demonstrou que camundongos BALB/c expostos repetidas vezes a picadas do mosquito *A. aegypti* de maneira natural e na ausência de adjuvantes, e posteriormente desafiados intranasalmente com o EGS do mosquito, apresentaram um aumento expressivo do infiltrado de macrófagos, neutrófilos, linfócitos e eosinófilos juntamente com um aumento significativo de citocinas características de um padrão Th2 de resposta como a IL-4, IL-5 e IL-13 no lavado da cavidade broncoalveolar destes animais (BARROS et al., 2016). A proteína SAAG-4 encontrada na saliva de *A. aegypti* é aparentemente um dos fatores responsáveis por essa polarização, uma vez que foi capaz de induzir a produção de IL-4, responsável pela diferenciação de células T $CD4^+$ em células Th2 (BOPPANA et al., 2009). Este perfil de resposta imune também é comumente observado em trabalhos que

utilizam proteínas recombinantes derivadas de componentes salivares, com importante aumento de anticorpos específicos IgG (especialmente IgG4 e IgE) contra Aed a 1, Aed a 2, Aed a 3 e Aed a 4, os principais alérgenos salivares descritos em *A. aegypti* (PENG et al., 2001, 2006, 2016). A proteína recombinante Aed a 1 (rAed a 1), que foi primeiramente descrita por Peng e colaboradores (2001), assim como o EGS total do mosquito, induziram respostas imediata e tardia na pele dos pacientes sensibilizados. Os resultados mostraram que o alérgeno isolado foi mais eficaz em sensibilizar o hospedeiro com um importante aumento dos anticorpos IgE. Também foi observada uma grande reatividade do soro de pacientes previamente sensibilizados com a picada de mosquitos *A. aegypti* às proteínas rAed a 2 e rAed a 3, com aumento significativo de IgE e IgG alérgeno-específicas (PENG et al., 2001; 2016). Estes alérgenos atuam de maneira similar aos componentes salivares que são injetados na derme do hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. Assim como estes, vários outros estudos abordam mecanismos de sensibilização aos componentes salivares do mosquito *A. aegypti*. Com efeito, alguns autores inferiram que a exposição natural aos mosquitos pode induzir uma resposta de anticorpos IgG em indivíduos que vivem em áreas endêmicas e além disso, sugerem que algumas proteínas salivares poderiam ser utilizadas como marcadores imunológicos para avaliar a exposição individual a picadas do mosquito (FONTAINE et al., 2011b). Diversos estudos vêm confirmando essa hipótese em indivíduos com malária (REMOUE et al., 2006; WAITAYAKUL et al., 2006) e dengue (DOUCOURE et al., 2012; LONDONO-RENTERIA et al., 2013), dentre outras doenças transmitidas por insetos vetores.

Portanto, diante do exposto até aqui, observamos a importância do sistema imune do hospedeiro vertebrado diante dos processos de sensibilização e posterior dessensibilização aos componentes salivares. Trata-se de um campo de estudo amplo, pois ainda não se conhecem a fundo os mecanismos efetores pelos quais os componentes salivares realizam esta modulação do sistema imune do hospedeiro vertebrado. Os estudos que abordam esta temática apresentam diversas limitações, assim, cabe a novos pesquisadores a busca por modelos que elucidem este processo para que futuramente estes resultados possam ser utilizados como ferramenta para estudos em busca de vacinas, medicamentos e estratégias de controle epidemiológico do mosquito *A. aegypti* e tratamento de reações alérgicas intensas aos componentes salivares do mosquito.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Um aspecto importante a ser ressaltado é que, além dos estudos em seres humanos, durante muito tempo a alergia à picada de mosquitos foi apenas avaliada experimentalmente em coelhos e cobaias. Somente nos últimos 20 anos é que modelos animais murinos começaram a ser utilizados para o estudo da alergia associada à saliva de *A. aegypti* e, mesmo assim, os relatos na literatura continuam escassos. Nos últimos anos, nosso grupo tem trabalhado na elucidação do chamado "imunoma funcional" da saliva de *A. aegypti*, um painel das atividades imunomoduladoras da saliva dessa espécie. Resultados recentes de nosso laboratório chamaram a atenção para a resposta imunológica desenvolvida em camundongos expostos naturalmente ao mosquito *A. aegypti* por 4 vezes, com intervalos de 15 dias entre as exposições. Quando esses animais, sensibilizados com a picada dos mosquitos, foram posteriormente desafiados intratraquealmente com o EGS desse vetor, observou-se um influxo predominante de eosinófilos para o espaço broncoalveolar, com presença de IL-4, IL-5 e IL-13 no lavado dessa cavidade, sugerindo um processo ativo de sensibilização alérgica (resposta de perfil Th2). De maneira complementar, quando foram avaliados os níveis séricos de anticorpos do padrão Th2, (IgG1 específica e IgE total), foi possível observar que o número de exposições aos mosquitos induz aumento proporcional da produção desses isotipos. Porém, de forma contrastante, observamos também o aparecimento de anticorpos IgG2a, um isótipo de padrão Th1, no soro desses animais. Esse perfil misto de anticorpos não foi observado quando os animais foram sensibilizados pela imunização com OVA emulsificada em alúmen, um protocolo clássico de indução de alergia experimental (BARROS et al., 2016).

Conjuntamente, esses resultados indicam que a exposição natural aos mosquitos induz um padrão misto Th1/Th2 de resposta ou eventualmente, que um processo de dessensibilização estaria em curso, o que não foi possível determinar dentro dos parâmetros experimentais avaliados. Diante dessas evidências, nossa hipótese de trabalho é de que é possível estudar os processos de sensibilização e dessensibilização aos antígenos salivares de mosquitos em modelo murino, a partir de um período mais prolongado de exposição, visto que a literatura sugere que a exposição crônica a picadas do vetor proporcionaria uma completa dessensibilização do hospedeiro vertebrado. Assim, tivemos como objetivo geral deste trabalho **avaliar o perfil da resposta imunológica envolvida nos processos de sensibilização e dessensibilização aos componentes salivares do mosquito *A. aegypti* e os parâmetros biológicos dos mosquitos que se alimentam nesses hospedeiros**. Para tanto, tivemos como objetivos específicos:

I) Desenvolver um modelo de sensibilização e dessensibilização natural em camundongos à partir de repetidas exposições ao mosquito *A. aegypti* e avaliar seus parâmetros associados: resposta imune humoral e celular aos antígenos salivares do mosquito e também a migração celular induzida no tecido pela picada de *A. aegypti*.

II) Determinar se as alterações no perfil imunológico desses animais durante o processo de sensibilização e dessensibilização são capazes de afetar o "*fitness*" biológico do mosquito *A. aegypti*: volume de sangue ingerido, fertilidade das fêmeas e escolha dos hospedeiros.

III) Avaliar os mediadores envolvidos na inflamação eosinofílica induzida pelos componentes salivares do mosquito *A. aegypti*, utilizando um modelo de inflamação aguda induzida pelo extrato de glândula salivar na cavidade peritoneal de camundongos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou na Lei Federal nº 11.794/2008 (Lei Arouca), no Decreto 6899/2009 e nas Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP), cujo certificado foi registrado sob o protocolo nº 75, folha 20, livro 3.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, 129/Sv (selvagens) e 129/Sv deficientes para a enzima 5-lipoxigenase (ALOX 5) fêmeas com idade inicial entre 4 e 6 semanas, fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Antes e após a manipulação, os animais foram mantidos no biotério, acondicionados em caixas coletivas contendo no máximo cinco animais por caixa, sob condições controladas de temperatura e luminosidade com alimentação e água *ad libitum*.

3.2 Extrato da glândula salivar (EGS)

Machos e fêmeas de mosquitos *A. aegypti* foram mantidos no biotério de insetos do Departamento de Parasitologia, ICB/USP, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro, onde foram alimentados e acasalados. Glândulas salivares de fêmeas de *A. aegypti* com 3-5 dias após emergência foram dissecadas em salina tamponada com fosfato (PBS – do inglês "*Phosphate-Buffered Saline*") e transferidas para um tubo do tipo *eppendorf* contendo 100 µL de PBS gelado estéril. Os tubos foram sonicados para liberação do material solúvel das glândulas e, em seguida, centrifugados a 14.000 *g* por 10 min a 4°C para remoção do material particulado. O sobrenadante resultante de cada tubo, referido como EGS, foi reunido e esterilizado por passagem através de uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm. A concentração proteica foi determinada e o material foi aliquotado e armazenado a -80ºC até o momento de uso.

3.3 Modelo de sensibilização e dessensibilização à picadas de A. aegypti

Para determinar se o processo de sensibilização e dessensibilização pelas picadas de *A. aegypti* poderia ser reproduzido em um modelo experimental murino, camundongos BALB/c foram submetidos a um protocolo de exposição aos mosquitos, desenvolvido em nosso laboratório e que foi refinado no presente trabalho. Para isso, cada camundongo foi anestesiado por inoculação subcutânea de cetamina (80mg/kg) e xilazina (10mg/kg) e exposto a 30 fêmeas do *A. aegypti* por 30 minutos, por 10 vezes consecutivas em intervalos de 15 dias entre cada exposição. Na semana seguinte a cada exposição, uma alíquota de 200 µL de sangue foi coletada na ausência de anticoagulante e o soro resultante foi armazenado até o momento de uso a -80ºC. Cada exposição foi representada por um código, iniciando em 0x (animais "*naive*" não expostos), seguido por 1x (uma exposição), 2x (duas exposições), e assim por diante até 10x (dez exposições). Um grupo controle, consistindo de animais apenas anestesiados nos dias das exposições também teve seu soro coletado no início e no fim do experimento para comparação.

3.4 Avaliação da resposta humoral de camundongos BALB/c expostos a picadas de A. aegypti

O perfil da resposta imunológica humoral induzido após cada exposição foi avaliado pela determinação dos níveis totais de IgE total e IgG1 e IgG2a específicas para os componentes salivares do *A. aegypti* nos soros dos animais, utilizando o método de ELISA (do inglês "*enzyme-linked immunosorbent assay*").

Para a determinação de IgE total, foi utilizado o mouse IgE ELISA Opteia Set (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), conforme instruções do fabricante. Foi realizado o *coating* de placas de 96 poços de fundo chato com anticorpo anti-IgE diluído em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,5). As placas foram mantidas a 4ºC por 16 h e, em seguida, foram lavadas 3 vezes com uma solução de PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) por 1 h a temperatura ambiente. Após as 3 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço do soro dos animais descritos no item 3.3 (diluição 1:100, em tampão PBS/SFB 10%) e de uma curva padrão de IgE preparada em diluição seriada (1,6 ng/mL a 100 ng/mL). As placas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente e, após esse tempo, foram então lavadas 5 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, 100 µL/poço da solução de detecção (contendo anticorpo secundário conjugado a biotina e estreptoavidina conjugada a peroxidase) foi adicionado e incubado a temperatura ambiente por 1 h. Após 7 lavagens com PBS/Tween 0,05%, foram adicionados 100 µL/poço do substrato cromogênico formado

por tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB). A reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço da solução de parada (H_3PO_4, 1M). A densidade óptica (D.O.) de cada poço foi medida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices, Silicon Valley, CA, USA) a 450 nm. A concentração de IgE total nas amostras foi calculada à partir da correlação entre valores de D.O. das amostras e da curva padrão preparada com IgE na mesma placa.

Para a determinação de IgG1 e IgG2a específicas, foi realizado o *coating* de placas de 96 poços de fundo chato com EGS de *A. aegypti* (500 ng/poço em 100 µL) diluído em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,5). As placas foram mantidas a 4ºC por 16 h e, em seguida, foram lavadas 3 vezes com uma solução de PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com PBS/SFB 10% por 1 h a temperatura ambiente. Após as 3 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço do soro dos animais descritos no item 3.3 (diluição 1:10.000 para IgG1 e 1:500 para IgG2a, ambos em tampão PBS/SFB 10%). As placas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente e, após esse tempo, foram então lavadas 5 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, 100 µL da solução de detecção (contendo anticorpo secundário conjugado a peroxidase) foram adicionados em cada poço, seguida por incubação a temperatura ambiente por 1 h. Após 7 lavagens com PBS/Tween 0,05%, foram adicionados 100 µL/poço do substrato cromogênico formado por tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio. A reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço da solução de parada (H_3PO_4, 1M). A D.O. de cada poço foi medida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices) a 450 nm. Os valores de D.O. das amostras incubadas na mesma diluição, pelo mesmo tempo e na mesma placa foram comparados como um parâmetro indireto da produção dos anticorpos.

3.5 Avaliação da proliferação e do perfil de citocinas por células totais de baço de camundongos BALB/c expostos a picadas de A. aegypti

Após eutanásia, camundongos *naive* (grupo 0x) e expostos 4 ou 10 vezes aos mosquitos *A. aegypti* (grupos 4x e 10x, respectivamente) tiveram o baço retirado em condições assépticas e colocado em 5 mL de RPMI 1640 (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA). O órgão foi macerado em peneiras com poros de 40 µm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA) com a ajuda de um êmbolo de seringa estéril. As células foram centrifugadas a 300 *g* (5 min/4 ºC), e após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados com tampão de lise (ACK lysing buffer – Gibco Invitrogen). As células foram lavadas novamente e ressuspendidas em meio completo (meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL penicilina, 100 µg/mL

de estreptomicina, 25 mM Hepes, 2,5 × 10^{-5} M 2-mercaptoetanol - Gibco Invitrogen) para contagem em câmara de Neubauer. Suspensões celulares contendo 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço, em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados nos poços da cultura 100 µL de meio somente (grupo controle), concanavalina A (Con A – concentração final na cultura de 1 µg/mL) ou EGS de *A. aegypti* (concentração final na cultura 10 µg/mL), seguido de incubação a 37 ºC e 5% CO_2. Após 48 horas de incubação, 25 µL de resazurina 0,01% (preparada em meio completo) foram adicionados em todos os poços. A resazurina é um composto de cor azul, não tóxico, permeável e não fluorescente que utiliza as reações de redução provenientes de células metabolicamente ativas para converter a resazurina em uma molécula vermelha fluorescente chamada resorufina. A quantidade de fluorescência e também a variação na coloração produzida durante o ensaio é proporcional ao número de células vivas e seu metabolismo. Entre 18 e 24 horas após a adição da resazurina, a D.O. de cada poço foi medida a 570 e 600 nm em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices) e a proliferação foi avaliada indiretamente pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras.

Para avaliar a produção de citocinas, suspensões contendo 5 × 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço, em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados nos poços da cultura 100 µL de meio somente (grupo controle), concanavalina A (Con A – concentração final na cultura de 1 µg/mL) ou EGS de *A. aegypti* (concentração final na cultura 10 µg/mL), seguido de incubação a 37 ºC e 5% CO_2 por 72 horas. O sobrenadante de cultura foi coletado e as citocinas IL-4, IL-5, IFN-γ e IL-10 presentes nas amostras foram determinando utilizando o ELISA Opteia Set (BD Biosciences), conforme instruções do fabricante. Para cada citocina, foi realizado o *coating* de placas de 96 poços de fundo chato com os anticorpos anti-IL-4, -IL-5, -IFN-γ e -IL-10 diluídos em tampão carbonato de sódio (0,1 M, pH 9,5). As placas foram mantidas a 4ºC por 16 h e, em seguida, foram lavadas 3 vezes com uma solução de PBS/Tween 0,05% e bloqueadas com PBS/SFB 10% por 1 h a temperatura ambiente. Após as 3 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço do sobrenadante proveniente da cultura de células do baço dos animais *naive* (0x) e dos animais sensibilizados (4x e 10x) e de uma curva padrão de cada citocina testada, as quais foram preparadas em diluição. As placas foram incubadas por 2 h a temperatura ambiente e, após esse tempo, foram então lavadas 5 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, 100 µL/poço da solução de detecção (contendo anticorpo secundário conjugado a biotina e estreptoavidina conjugada a peroxidase) foi adicionado e incubado a temperatura ambiente por 1 h. Após 7 lavagens com PBS/Tween 0,05%, foram adicionados 100 µL/poço do substrato

cromogênico formado por tetrametilbenzidina e peróxido de hidrogênio (TMB). A reação foi interrompida com a adição de 50 µL/poço da solução de parada (H_3PO_4, 1M). A D.O. de cada poço foi medida em espectrofotômetro SpectraMax 190 (Molecular Devices) a 450 nm. A concentração de cada citocina nas amostras foi calculada à partir da correlação entre valores de D.O. das amostras e das respectivas curvas-padrão preparadas na mesma placa. O limite de detecção para cada citocina foi: IL-4 (3,1 pg/mL); IL-5 (15,6 pg/mL); IFN-γ (3,1 pg/mL); IL-10 (15,6 pg/mL).

3.6 Desafio de animais previamente expostos a picadas do mosquito A. aegypti

Para caracterização do infiltrado celular na pele da orelha decorrente do desafio com picadas de *A. aegypti*, foram utilizados camundongos *naive* e camundongos expostos 4 e 10 vezes ao mosquito, conforme descrito no item 3.3. Os mesmos foram anestesiados por inoculação subcutânea de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e a região anterior de cada orelha foi exposta a 5 mosquitos adultos fêmeas por 30 minutos. Para tanto, os mosquitos foram colocados em um recipiente plástico (copo descartável de 50 mL) recoberto com filó e contendo uma fita adesiva passando pelo centro do recipiente, conforme metodologia adaptada de Maciel et al. (2014). A cabeça dos animais anestesiados foi colocada sobre o filó na região da fita adesiva de modo que apenas as orelhas ficassem expostas aos mosquitos (Figura 1).

Para determinar o momento ideal das análises, a espessura das orelhas foi medida antes das picadas e após 2, 6, 12, e 24 horas para avaliar a cinética do edema decorrente da exposição aos mosquitos. A espessura da orelha na região das picadas foi medida com o auxílio de um paquímetro de precisão (Mitutoyo 7301, Kawasaki, Kanagawa, Japão) e comparada com a medida obtida antes da exposição aos mosquitos.

Figura 1. Esquematização do protocolo experimental utilizado para o desafio das orelhas de camundongos aos mosquitos *A. aegypti*. Camundongos anestesiados tiveram cada uma das orelhas expostas a 5 mosquitos fêmeas durante 30 minutos (Fonte: HENRIQUE, 2016).

3.7 Caracterização do infiltrado celular no tecido da orelha por citometria de fluxo

As orelhas dos animais expostos aos mosquitos (sensibilizados) foram removidas 24 horas após a exposição e processadas para fenotipagem celular por citometria de fluxo, conforme metodologia adaptada de Belkaid; Jouin e Milon (1996). As orelhas removidas foram separadas em folhas ventral e dorsal e cortadas em pequenos fragmentos. Para separação das células da orelha, o "*pool*" das orelhas de cada grupo foi digerido em uma solução de PBS/SFB 10%, 10 mg/mL de colagenase tipo IV (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e 1 mg/mL de desoxirribonuclease 1 (DNAse) (Sigma-Aldrich) e incubadas a 37 °C, durante 40 minutos, sob agitação de 1250 rpm. Decorrido o tempo de incubação, a folha da derme foi separada da epiderme e, esta suspenção contendo as células e os fragmentos da orelha foi transferida para uma peneira de nylon com poro de 40 µm e macerada com êmbolo de seringa. A suspensão resultante foi centrifugada a 300 *g* durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 1 mL de meio completo. Orelhas de animais *naive*, foram processadas da mesma maneira e usadas para comparação.

As células foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS contendo 1% de SFB (tampão de FACS, do inglês *"Fluorescence-Activacted Cell Sorting"*) e contadas. O mesmo número de células de cada grupo foi adicionado em tubos de polipropileno de 12 × 75 mm e incubadas por 15 min a 4ºC com anticorpo anti-CD16/CD32 (diluição final 1:1000) para bloqueio dos receptores Fc presentes em fagócitos. Em seguida, as células foram incubadas por 30 min à 4ºC protegidos da luz com os seguintes anticorpos em diluições apropriadas (Tabela 2). Após nova lavagem, as células foram ressuspendidas em tampão de FACS e adquiridas no citômetro FACSCanto II, do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia, ICB/USP. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (TreeStar Inc).

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para avaliação dos marcadores extracelulares em células do infiltrado celular na orelha por citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	Clone	Fabricante
Anti-mouse CD45	APC	1:2000	30 - F11	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
Anti-mouse Siglec-F	PE	1:400	E50 - 2440	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
Anti-mouse Gr-1	FITC	1:100	1A8	Biolegend (San Diego, CA, EUA)

Anti-mouse FcεRI	PE/Cy7	1:200	MAR - 1	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
Anti-mouse CD11b	Bv510	1:1600	HL3	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
Anti-mouse F4/80	PB	1:800	C1: A3 - 1	Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)
Anti-mouse CD117	APC H7	1:100	2B 8	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
Anti-mouse CD3	Bv510	1:2000	30 – F11	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA
Anti-mouse CD3	Bv421	1:200	145 – 2C11	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA
Anti – Mouse CD4	PercP	1:400	GK 1.5	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
Anti – mouse CD8	FITC	1:100	53 – 6.7	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA
Anti – mouse CD19	PE	1:400	1D 3	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA
Anti-mouse MHC - II	PerCPcy 5.5	1:600	M5/ 114. 15. 2	Biolegend (San Diego, CA, EUA)

Para análise das populações celulares, foi utilizada a seguinte estratégia de imunofenotipagem. Primeiramente, foi feita a exclusão de debris celulares (Figura 2A). Em seguida realizamos a separação de eventos considerados $CD45^+$ para caracterizar as células do sistema imunológico (LÓPEZ; PALMER; LAWRENCE, 2009) (Figura 2B). Depois disso, realizamos a separação de eventos únicos que passaram pelo laser *(singlets*) através da análise por FSC-A *versus* FSC-H (Figura 2C). A partir daí, avaliamos a expressão de CD11b na superfície das mesmas (Figura 2D). As células negativas para e expressão de CD11b foram analisadas em função da expressão de $CD3^+$ e $CD19^+$, caracterizando linfócitos T e B, respectivamente (PRIESNER et al., 2016) (Figura 2E). As células CD3 e CD19 negativas foram analisadas para expressão de cKit e FcεRI, caracterizando os mastócitos (Figura 2F). Células CD3 positivas foram analisadas para a expressão de CD4 e CD8, caracterizando células T auxiliares e citotóxicas, respectivamente (Figura 2G). Células duplo-positivas para CD11b e MHC-II foram analisadas para a expressão de F4/80, caracterizando os macrófagos (Figura 2H). Células MHC-II negativas foram avaliadas para a expressão de Siglec–F e Gr-1, caracterizando eosinófilos e neutrófilos, respectivamente (FLORSHEIM et al., 2015) (Figura 2I).

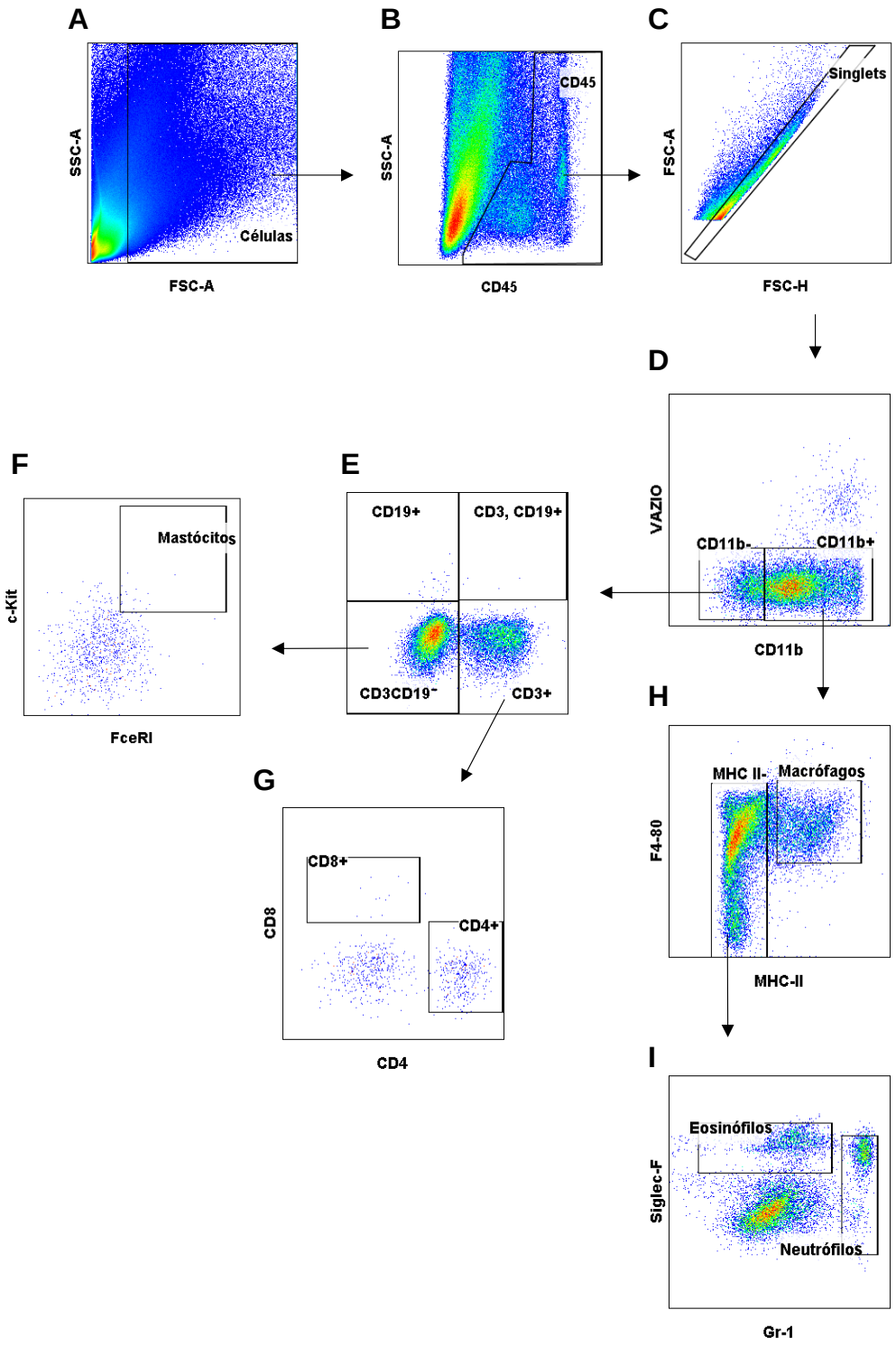

Figura 2. Estratégia de imunofenotipagem para análise de células da orelha por citometria de fluxo - Exclusão de *debris* celulares (A); Seleção das células CD45$^+$ (B); Exclusão de *doublets* (C); Avaliação da expressão de células CD11b (D); Expressão das moléculas CD3 e CD19 em células CD11b$^-$ (E); Expressão de moléculas cKit e FcεRI em células CD11b$^-$/CD3$^-$/CD19$^-$ (F); Expressão de moléculas CD4 e CD8 em células CD3$^+$ (G); Expressão de moléculas F4/80 e MHC de classe II em células CD11b$^+$ (H); Expressão de Siglec–F e Gr-1 em células MHC de classe II$^-$.

*3.8 Ensaio de transferência de imunidade - anafilaxia cutânea passiva (PCA – do inglês "***passive cutaneous anaphylaxis***)***

Para realização do ensaio para avaliação da anafilaxia cutânea passiva (PCA), camundongos BALB/c *naive* tiveram o dorso tricotomizado 24 horas antes do experimento. Após este processo, soros coletados dos animais que foram expostos 0, 4 e 10 vezes ao *A. aegypti* foram inoculados na região dorsal dos animais tricotomizados por via intradérmica. Cerca de 2 ou 70 horas após a inoculação do soro, foi realizado um desafio com o EGS do mosquito (0,4 µg em 10 µL de PBS) no mesmo local de inoculação do soro. Cerca de 30 minutos após este desafio, o corante vital azul de Evans foi inoculado para determinação de extravasamento no tecido desafiado (5 mg/kg em 200 µL). Após este processo os animais foram eutanasiados e a pele da região dorsal foi rebatida, onde o tecido foi seccionado e acondicionado em tubos contendo 1 mL de formamida. As amostras foram mantidas *overnight* a uma temperatura de 63 C. Após este processo, 300 µL foram coletados de cada tudo e transferidos para uma placa de 96 poços em duplicata para a realização da leitura da D.O. em espectrofotômetro a 620nm (Figura 3).

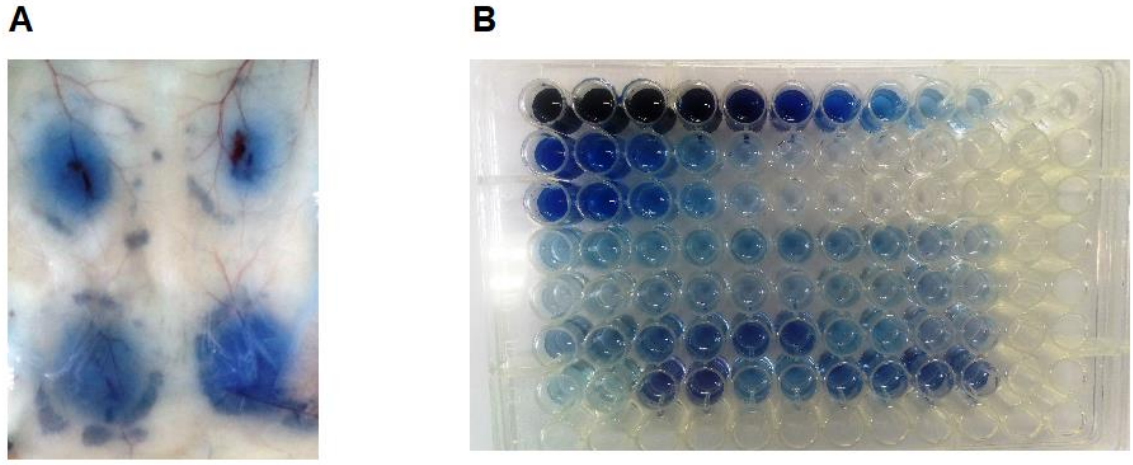

Figura 3. Ensaio de PCA (A) Animais *naive* receberam o soro de animais expostos 0, 4, e 10 vezes por via intradérmica. Cerca de 2 ou 70 horas após a inoculação foi realizado o desafio com EGS (0,4 µg em 10 µL de PBS) no mesmo local onde foi feita a inoculação do soro e após 30 minutos, os animais foram inoculados com azul de Evans (5 mg/kg em 200 µL). (B) Após eutanásia dos animais, a pele da região dorsal foi rebatida e seccionada. Em seguida as amostras foram acondicionadas individualmente em 1 mL de formamida e mantidas *overnight* a 63ºC. Trezentos microlitros de cada amostra foram coletados em duplicatas para a leitura a 620nm.

3.9 Avaliação de preferência do repasto sanguíneo in vivo

Camundongos BALB/c *naive* (0x) e aqueles expostos 10 vezes aos mosquitos *A. aegypti* (10x) foram utilizados para testar a preferência dos mosquitos da fonte do repasto sanguíneo. A metodologia para avaliar a escolha do animal no qual o mosquito realizou o repasto seguiu a metodologia de um trabalho de nosso grupo (MACIEL et al., 2014). Para poder discriminar qual animal foi escolhido por cada mosquito, um animal do grupo controle injetado intravenosamente (veia caudal) com 0,2 mL de PBS foi pareado com um animal do grupo experimental (10x) inoculado com o mesmo volume do corante vital azul de Evans diluído em PBS (200 mg/kg). Alíquotas de 20 µL de sangue de cada camundongo injetado com PBS ou azul de Evans foram coletadas antes do repasto sanguíneo dos mosquitos e diluídas em 500 µL de água destilada. Esse material foi submetido a uma diluição seriada (1:2) também em água destilada para obtenção de uma curva padrão, com o objetivo de estimar o volume de sangue ingerido por cada mosquito. As fêmeas de *A. aegypti* foram separadas em grupos de 50 indivíduos e mantidas com sacarose em recipientes plásticos individuais de 500 mL cobertos por uma tela de filó até o dia do experimento. A sacarose foi retirada 24 horas antes de cada exposição e o repasto sanguíneo foi realizado por 30 minutos nos animais pareados e anestesiados, conforme descrito no item 3.3. Após o repasto, os camundongos foram eutanasiados e os mosquitos foram congelados e macerados com um pistilo em tubo do tipo *eppendorf* contendo 250 µL de água destilada. O material macerado de cada mosquito foi individualmente transferido para um poço de uma placa de 96 poços com fundo arredondado e centrifugado por 10 minutos a 300 *g*. Duzentos microlitros do sobrenadante livre de material particulado e das diluições da curva padrão foram transferidos para uma nova placa de 96 poços com fundo plano e a D.O. das amostras foi determinada no espectrofotômetro. Para a discriminação das amostras de sangue de animais injetados com azul de Evans dos animais injetados com PBS, a D.O. das amostras de sangue foi avaliada em espectrofotômetro em dois diferentes comprimentos de onda: 540 nm, para estimativa de hemoglobina, e 620 nm, para estimativa do azul de Evans (MACIEL et al., 2014). Uma regressão linear foi gerada pelo uso de valores de densidade óptica a partir das diluições do sangue e utilizado como uma "curva padrão" para estimar o volume de sangue ingerido por cada mosquito. Como contraprova, o mesmo ensaio foi realizado com outros animais, mas desta vez o animal *naive* recebeu o azul de Evans e o animal do grupo 10x recebeu PBS.

A Figura 4A mostra uma imagem representativa das condições de exposição dos camundongos inoculados com PBS ou com azul de Evans, após anestesia. Na Figura 4B é apresentado o sobrenadante do macerado dos mosquitos adicionados em placa de 96 poços, onde os poços de coloração avermelhada representam mosquitos que se alimentaram em animais controle (inoculados com PBS) e os poços de coloração azulada representam mosquitos que se alimentaram nos animais do grupo inoculado com azul de Evans.

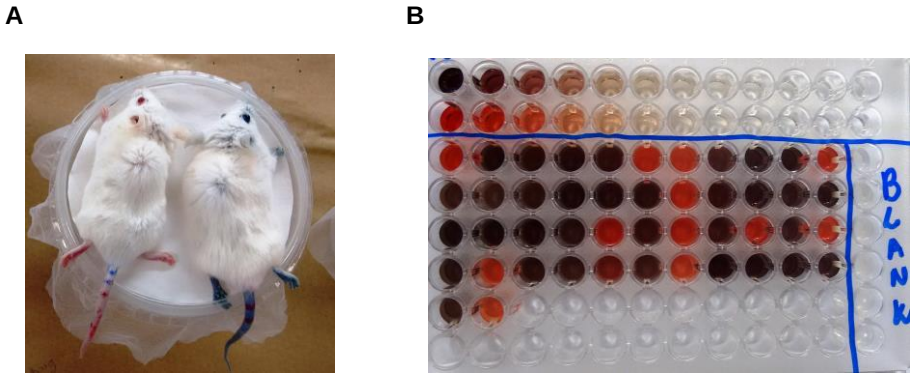

Figura 4. Esquematização da exposição de camundongos aos mosquitos *A. aegypti* para avaliação da escolha no repasto sanguíneo. Os camundongos foram anestesiados e dispostos aos pares em recipientes contendo 50 mosquitos. (A) Camundongo à esquerda, *naive*, nunca antes expostos à picadas de *A. aegypti* recebeu apenas PBS pela veia caudal; camundongo à direita recebeu corante azul de Evans diluído em PBS na concentração de 200mg/kg (B) Placa com curvas e sobrenadante proveniente do macerado corporal dos mosquitos. Cada poço corresponde a um mosquito. Leitura realizada a 540 e 620 nm respectivamente.

3.10 Avaliação do volume sanguíneo após repasto do A. aegypti

As fêmeas de *A. aegypti* foram divididas em grupos de 30 indivíduos e mantidas com sacarose em copo plástico de 500 mL até o dia do experimento. Foram preparados cruzamentos na proporção de indivíduos 1:2 (1 macho para cada 2 fêmeas). Machos e fêmeas copularam por 2 dias e após este período a sacarose foi retirada e 24 horas depois, as fêmeas realizaram o repasto sanguíneo em camundongo anestesiado. Após o repasto as fêmeas foram congeladas e maceradas com um pistilo em tubo eppendorf contendo 250 mL de água destilada. O material macerado de cada mosquito foi transferido para um poço de uma placa de 96 poços com fundo arredondado e centrifugado por 10 minutos a 300 *g*. Duzentos microlitros do sobrenadante foram transferidos para uma nova placa de 96 poços com fundo plano e a D.O. das amostras foi determinada em espectrofotômetro a 540nm para a quantificação indireta da hemoglobina.

3.11 Oviposição

Em um outro grupo de experimentos, após cada repasto sanguíneo descrito no item 3.3, os mosquitos fêmeas alimentados foram anestesiados e em seguida acondicionados individualmente em placas de propileno de 24 poços na proporção de 1 mosquito por poço. Cada poço foi forrado com papel filtro umedecido com cerca de 200 µL de água destilada para oferecer condições do mosquito fêmea realizar a postura dos ovos. Em/ seguida as placas foram acondicionadas em ambiente com temperatura e luz controlados por 24h. Após este período, os mosquitos foram eutanasiados por exposição a baixas temperaturas e a contagem dos ovos por mosquito foi realizada utilizando estereomicroscópio.

3.12 Avaliação do influxo de leucócitos para a cavidade peritoneal de camundongos inoculados com EGS de **A. aegypti***: modelo de inflamação aguda*

A fim de avaliar o recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti*, camundongos BALB/c foram divididos em 6 grupos experimentais, que foram inoculados da seguinte maneira:

- Grupo PBS 5X: 0,5 mL de PBS intraperitonealmente (i.p.) por 5 dias consecutivos;
- Grupo EGS 1X: 5 µg de EGS em 0,5 ml de PBS i.p. (uma inoculação);
- Grupo EGS 2X: 5 µg de EGS em 0,5 ml de PBS i.p. por 2 dias consecutivos;
- Grupo EGS 3X: 5 µg de EGS em 0,5 ml de PBS i.p. por 3 dias consecutivos;
- Grupo EGS 4X: 5 µg de EGS em 0,5 ml de PBS i.p. por 4 dias consecutivos;
- Grupo EGS 5X: 5 µg de EGS em 0,5 ml de PBS i.p. por 5 dias consecutivos;

Os grupos foram organizados de maneira que a última inoculação ocorresse no mesmo dia. Após 24 horas, os camundongos foram eutanasiados por deslocamento cervical e o lavado da cavidade peritoneal (LCP) foi coletado após inoculação com 3 mL de PBS gelado. As amostras foram centrifugadas a 300 *g* por 10 min à 4º C e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80ºC. A contagem das células totais presentes no LCP foi realizada em câmara de Neubauer diluindo-se 10 µL da amostra em 90 µL do corante Turk (diluição 1:10). A contagem diferencial das células foi feita pela confecção de lâminas em citocentrífuga que posteriormente foram coradas com corante hematológico e analisadas por microscopia óptica. O número absoluto de cada tipo

celular identificado foi calculado pela multiplicação entre sua respectiva porcentagem e o número total de células.

3.13 Imunofenotipagem celular do LCP por citometria de fluxo

As células do LCP foram coletadas como descrito no item 3.12, centrifugadas e ressuspendidas em tampão de FACS e, então, incubadas por 15 min a 4ºC com anticorpo anti-CD16/CD32 (diluição final 1:1000) para bloqueio dos receptores Fc presentes em fagócitos. Em seguida, as células foram incubadas por 30 min a 4°C e protegidas da luz, com os anticorpos monoclonais contra os marcadores de superfície em diluições apropriadas (Tabela 3). Após lavagem, as células forma transferidas para tubos de polipropileno de 12 x 75 mm e adquiridas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences, San Juan, CA, EUA), do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia do ICB/USP. A análise dos resultados foi realizada pelo software FlowJo, versão 7.5.5 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

Tabela 3 - Anticorpos utilizados para avaliação dos marcadores extracelulares em células do LCP por citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluorocromo	Diluição	Clone	Fabricante
anti-mouse Gr1	FITC	1:400	1A8	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
anti-mouse Siglec-F	PE	1:400	E50 – 2440	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
anti-mouse CD117	APC/Cy7	1:100	2B 8	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
anti-mouse FcεRI	PE/Cy7	1:200	MAR – 1	Biolegend (San Diego, CA, EUA)
anti-mouse CD11b	Bv510	1:1600	HL3	BD Pharmingen (San Diego, CA, EUA)
anti-mouse F4/80	PB	1:800	C1: A3 – 1	Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA)

Para análise das populações celulares, foi utilizada a seguinte estratégia de imunofenotipagem. Primeiramente, foi feita a exclusão de células potencialmente mortas e *debris* celulares (Figura 5A). Em seguida, foram selecionados apenas os eventos únicos que passaram pelo laser *(singlets*) através da análise por FSC-A *versus* FSC-H (Figura 5B). Para eliminar a autofluorescência observada nas células analisadas, um canal do citômetro que não estava sendo utilizado na análise permaneceu aberto durante

todas as aquisições (FL3-H - Figura 5C). A partir de células FL3-H negativas, avaliamos a expressão de CD11b na superfície das mesmas (Figura 5D). As células CD11b negativas foram analisadas em função da expressão de CD117 e do receptor FcεRI (Figura 5E), caracterizando os mastócitos (CANTOR et al., 2008). Nas células CD11b positivas foi analisada a expressão de MHC de classe II (Figura 5F). Nas células MHC de classe II negativas, foi analisada a expressão de Siglec-F e Gr-1 (Figura 1G), determinando-se a porcentagem de eosinófilos e neutrófilos (FLORSHEIM et al., 2015). E nas células MHC positivas foi avaliada a expressão de F4/80 para determinar os macrófagos (Figura 5H).

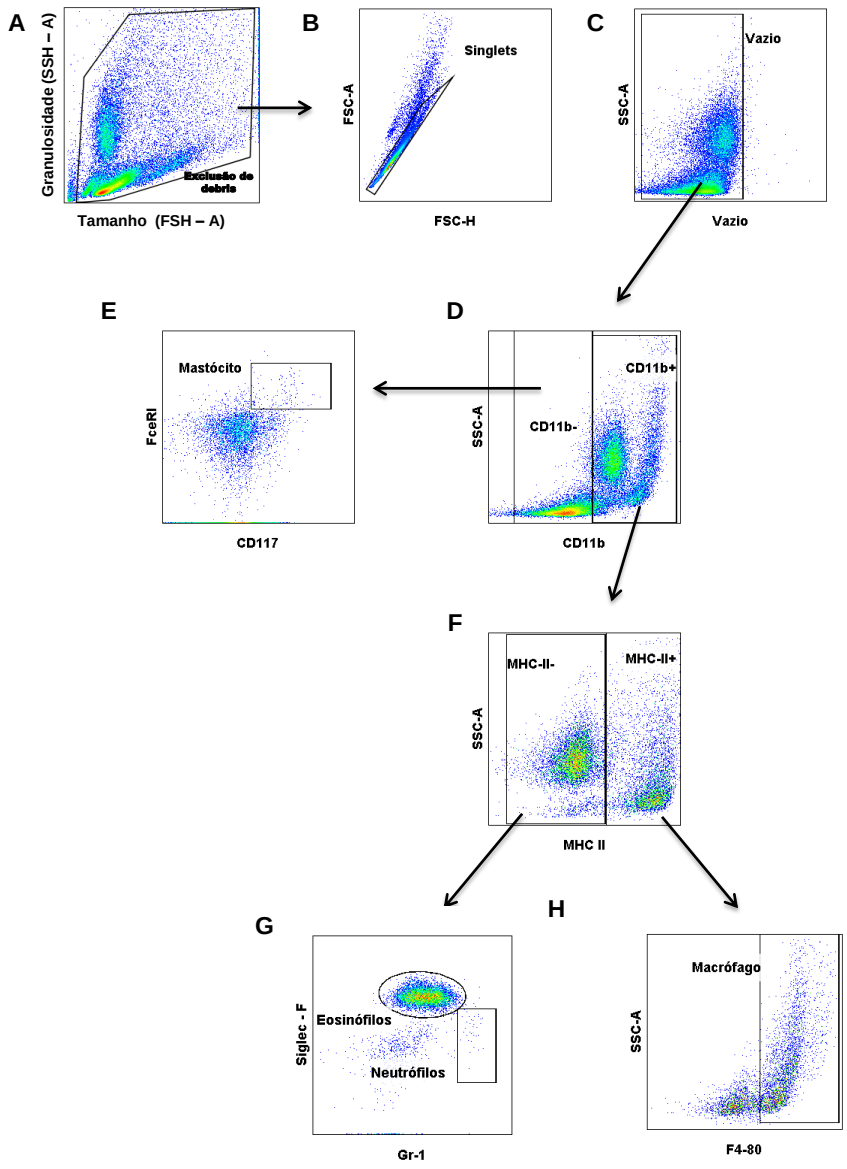

Figura 5. Estratégia de imunofenotipagem para análise de células da cavidade peritoneal por citometria de fluxo. Exclusão de *debris* celulares (A); Exclusão de *doublets* (B); Exclusão de células autofluorescentes (C); Avaliação da expressão de células CD11b negativas e positivas (D); Expressao das moléculas FcεRI e CD117 (E); Expressão de células MHC de classe II (F); Expressão das moléculas Siglec-F e Gr-1 (G); Expressão de moléculas F4/80 (H).

3.14 Participação da IL-5 na eosinofilia induzida pelo EGS de **A. aegypti**

Uma outra série de experimentos foi realizada de maneira semelhante ao descrito no item 3.12, porém comparando apenas os grupos inoculados por 5 dias consecutivos com PBS (PBS 5X) e EGS (EGS 5X). Para a dosagem da IL-5 presente no LCP utilizamos o "BD OptEIA ELISA Set" (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante. O ensaio foi realizado de maneira semelhante ao descrito para outras citocinas no item 3.5 e a concentração de IL-5 foi calculada à partir da correlação entre valores de D.O. das amostras e da curva-padrão preparada na mesma placa. O limite de detecção foi de 15,6 pg/mL.

Para avaliar a participação da IL-5 na eosinofilia peritoneal induzida pela inoculação do EGS de *A. aegypti*, camundongos da linhagem BALB/c receberam 50 μg do anticorpo monoclonal anti-IL-5 (clone TRFK5) i.p. diluído em 0,5 mL de PBS. Animais do grupo controle receberam a mesma quantidade do isotipo controle (IgG1 de rato – clone RTK2071), diluído da mesma maneira. Após 24 horas, os animais foram inoculados i.p. com PBS ou EGS (5 µg/animal/ dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos e o LCP foi coletado e preparado como descrito no item 3.12.

3.15 Participação dos leucotrienos na eosinofilia induzida pelo EGS de **A. aegypti**

Para avaliar o papel dos leucotrienos na eosinofilia peritoneal induzida pela inoculação do EGS de *A. aegypti*, camundongos da linhagem 129/Sv (selvagens) e camundongos ALOX 5 (deficientes da enzima 5-lipoxigenase) foram inoculados intraperitonealmente com PBS ou EGS (5 µg/animal/ dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos e o LCP foi coletado e preparado como descrito no item 3.12. A concentração de IL-5 no LCP desses animais foi quantificada como descrito no item 3.14.

3.16 Análise estatística

A análise estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada pelo teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey, com significância mínima estabelecida em $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Perfil de anticorpos séricos de animais expostos a picadas do mosquito A. aegypti

Como mencionado na introdução, poucos estudos avaliaram a reação alérgica decorrente das picadas de *A. aegypti* em modelo murino (BARROS et al., 2016; PENG; SIMONS, 1998) e nenhum desses estudos demonstrou que um processo de dessensibilização seria possível de ser observado *in vivo*. Assim, nosso primeiro passo foi tentar padronizar um protocolo de exposições a picadas do mosquito *A. aegypti* em camundongos BALB/c que mimetizasse o contato crônico dos mosquitos com os seres humanos. Para isso, cada camundongo foi individualmente exposto a 30 mosquitos *A. aegypti* fêmeas, com intervalo de 2 semanas entre as exposições, totalizando 10 exposições (Figura 6A). Uma semana após cada exposição, os animais tiveram uma alíquota de sangue coletada (Figura 6A) e o soro foi separado para avaliação dos níveis de IgE total e de IgG1 e IgG2a específicas para os componentes salivares do mosquito.

Utilizando esse protocolo experimental, observamos na Figura 6B que anticorpos IgE totais já são detectados de maneira significativa após a segunda exposição (2x), aumentando a partir daí até a sétima exposição (7x) e estabilizando sua concentração no soro até a última exposição (10x). Concomitantemente, observamos também o aumento significativo na produção de IgG1 específica para os antígenos salivares a partir da terceira exposição (3x) e este aumento foi gradativo até a nona exposição (9x), estabilizando-se em seguida (Figura 6C). Em relação à IgG2a específica, observamos na Figura 6D que seus níveis séricos aumentaram significativamente somente a partir da quinta exposição (5x), sendo que as mesmas continuaram crescendo até a décima exposição (10x). Quando analisamos o perfil das curvas de produção desses anticorpos, percebe-se que tanto a IgE total quanto a IgG1 atingiram um platô na sétima e na nona exposição, respectivamente, enquanto a produção de IgG2a aparentemente seria ainda maior se exposições adicionais fossem realizadas. Assim, ao determinar a relação entre IgG1 e IgG2a específicas para os componentes salivares, observamos que a razão é positiva para IgG1 entre a terceira e a sexta exposição, gradativamente reduzindo-se à partir daí (Figura 6E). Considerando que a IgG1 é um isotipo associado às respostas alérgicas (perfil Th2) e a IgG2a está associada à respostas dependentes de IFN-γ (perfil Th1), sugerimos que um processo de dessensibilização sistêmico deve estar em curso, pelo menos em termos de isotipos de anticorpos presentes no soro.

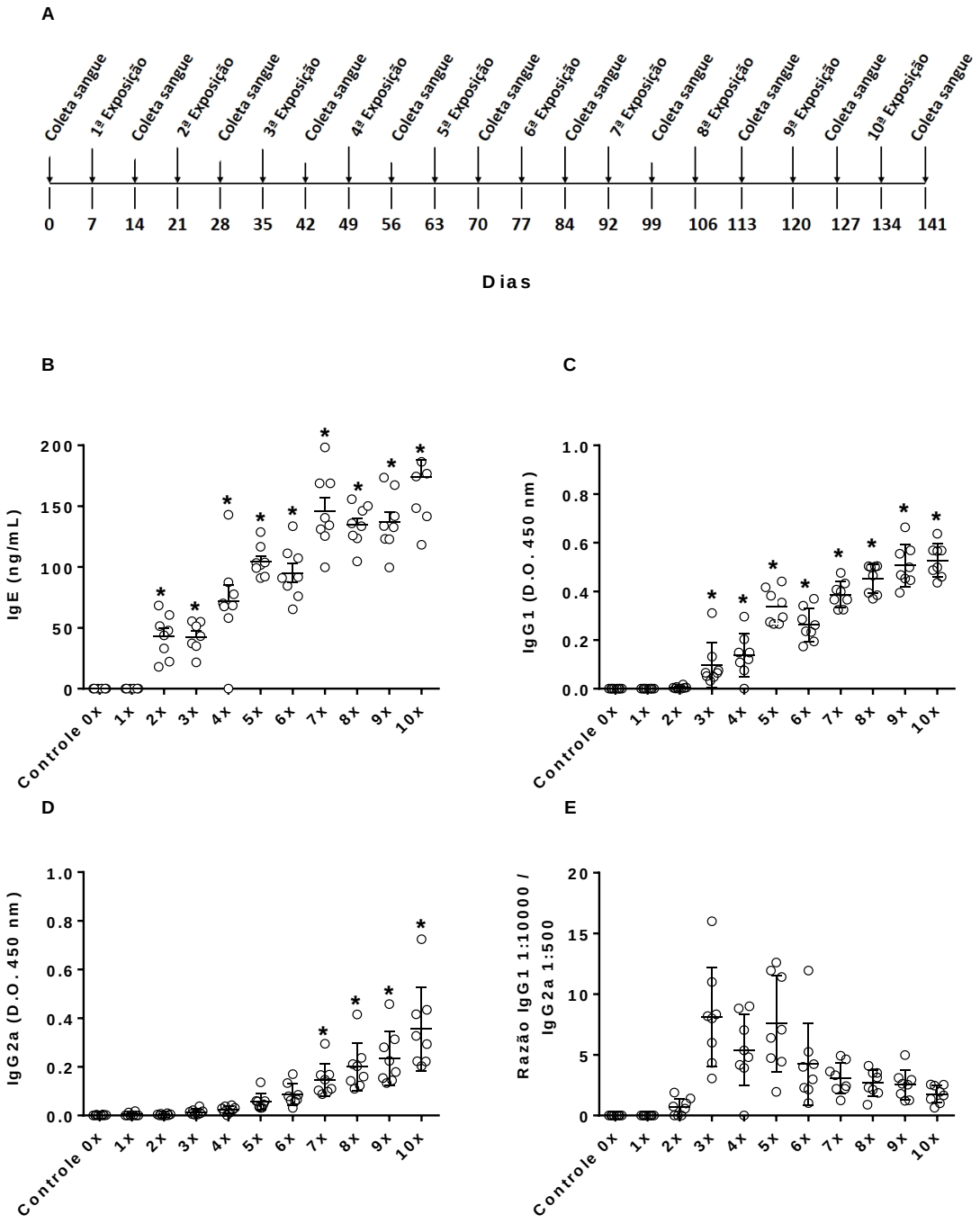

Figura 6. Produção de IgE total, IgG1 e IgG2a específicas para antígenos salivares no soro de camundongos expostos à picadas de *A. aegypti.* (A) Representação esquemática das exposições (1ª à 10ª exposição) à picadas de *A. aegypti* e coleta do sangue para obtenção do soro. Concentração de IgE total (B). Densidade óptica de IgG1 (C) e IgG2a (D) específicos para antígenos salivares. Razão das leituras de densidade óptica de IgG1 por IgG2a (E). A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $*p \leq 0.05$ em relação ao Controle (0x).

4.2 Ensaio de PCA

Com base nos resultados apresentados na Figura 6, observamos 2 momentos distintos da produção de anticorpos decorrentes da exposição prolongada aos mosquitos *A. aegypti* em camundongos. Um primeiro momento que se estende da terceira (3x) à quinta (5x) exposição, onde os animais possuem níveis significativos de IgE total e IgG1 específica, mas os níveis de IgG2a estão ausentes ou muito baixos. Nesse período, a razão IgG1:IgG2a varia entre 5:1 e 8:1, sugerindo o desenvolvimento de uma resposta alérgica de perfil Th2. Em um segundo momento, que se inicia à partir da sexta exposição (6x) e segue até o final do experimento, os níveis de IgE total e IgG1 específica começam a se estabilizar, enquanto os níveis de IgG2a aumentam progressivamente. De forma inversa, a razão IgG1:IgG2a diminui gradativamente chegando a menos de 2:1 na décima exposição (10x), mostrando o desenvolvimento de uma resposta mista Th1/Th2 e sugerindo que um processo de dessensibilização está ocorrendo. Com base nesses dois momentos representativos das dinâmicas observadas em relação à produção de anticorpos, nosso próximo passo foi avaliar se haveria alguma diferença funcional dessas moléculas em termos de função biológica. Para isso, comparamos a atividade imunológica dos anticorpos presentes no soro desses animais, realizando um ensaio de avaliação da PCA. Camundongos *naive* foram inoculados com o soro de animais também *naive* (0x) ou de animais sensibilizados pelas picadas de *A. aegypti* nos dois momentos descritos acima (grupos 4x e 10x), e em seguida, foram desafiados com EGS. O extravasamento de líquido para o local do desafio foi avaliado pela presença da coloração azul no local do desafio foi considerada positiva para reação anafilática, conforme descrito em Material e Métodos e de acordo com trabalhos anteriores (BORTOLATTO et al., 2008). A Figura 7A representa a medida de azul de Evans no tecido dos animais que receberam o soro e 2 horas após a inoculação foram desafiados com EGS, que avalia a PCA decorrente da atividade de IgG1 e 70h depois foi realizado o desafio para avaliar a atividade de IgE (BRAGA, MOTA, 1976). Os animais que receberam o soro de camundongos expostos 4x e 10x apresentaram maior extravasamento 2 horas após desafio com EGS, quando comparados àqueles que receberam o soro de animais *naive* (0x), mostrando atividades anafiláticas semelhantes de suas IgG1. Entretanto não houve diferença estatística entre os grupos 4x e 10x. A Figura 7B representa a medida de azul de Evans no tecido dos animais que receberam o soro e 70 horas após a inoculação foram desafiados com EGS, para avaliar a PCA decorrente da atividade de anticorpos IgE. Neste caso, o grupo que recebeu o soro de animais 4x apresentaram maior extravasamento para o local quando comparado com

aqueles que receberam o soro do grupo 0x. Além disso, animais que receberam o soro de animais 10x apresentaram uma reação de PCA estatisticamente menor do que o grupo 4x e semelhante ao grupo 0x (Figura 7B).

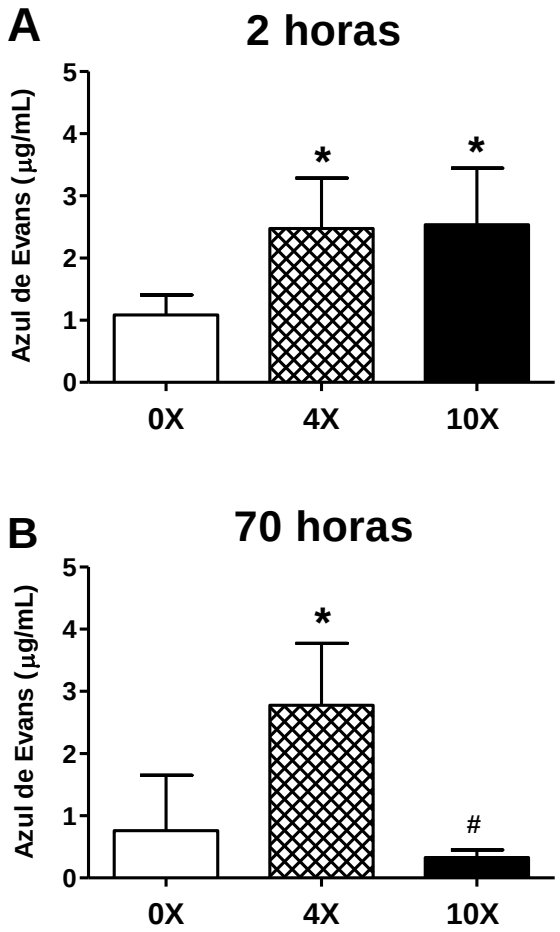

Figura 7. PCA induzida em animais que receberam soro de animais *naive* e animais expostos 4 e 10 vezes a picadas do mosquito *A. aegypti*. Soros de animais *naive* (0x) e expostos 4 e 10 vezes ao *A. aegypti* (4x e 10x), foram transferidos para animais *naive* por via intradérmica e posteriormente desafiados com EGS na concentração de 40 µg/mL. A seguir, os animais receberam intravenosamente o corante vital azul de Evans (5 mg/kg em 200 µL). (A) Representa os valores indiretos do azul de Evans retido no tecido 2 h após a inoculação do soro. (B) Representa os valores indiretos do azul de Evans retido no tecido 70 h após a inoculação do soro. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. *$p < 0,05$ em relação ao grupo 0x. #$p < 0,05$ em relação ao grupo 4x.

4.3 Perfil de citocinas na cultura de esplenócitos de animais naive *e expostos 4 e 10 vezes às picadas de* A. aegypti

Conforme apresentado na Figura 6, os animais expostos 4 vezes (grupo 4x) a picadas do mosquito *A. aegypti* apresentam altos níveis séricos de anticorpos IgE total e IgG1 específica. Animais expostos 10 vezes (grupo 10x) apresentam quantidades ainda maiores desses dois isotipos, mas apresentou concomitantemente altos níveis de IgG2a específica. Para avaliar possíveis correlações desse fenótipo humoral com o perfil da resposta celular sistêmica (diferenciação de linfócitos T), avaliamos a proliferação e a produção de citocinas dos padrões Th1 (IFN-γ), Th2 (IL-4 e IL-5) e regulador (IL-10) por células totais de baço de animais expostos quatro vezes (4x) ou 10 vezes (10x) a picadas do mosquito, em resposta ao estímulo policlonal (Con A) ou antígeno-específico (EGS do *A. aegypti*), comparando-as com a resposta de animais *naive* a esses mesmos estímulos.

O perfil de resposta observado para todos os parâmetros analisados foi bastante semelhante, com pequenas exceções. Os níveis basais de proliferação e das citocinas em todos os grupos “controle” (células incubadas com meio apenas) foram bastante baixos em todos casos e sem diferenças significativas entre os grupos 0x, 4x e 10x (Figura 8). A estimulação com Con A induziu uma proliferação vigorosa nas células dos 3 grupos em comparação aos seus respectivos grupos controles, mas sem diferenças entre os grupos 0x, 4x e 10x. Como esperado, o estímulo específico (EGS do *A. aegypti*) não induziu proliferação no grupo 0x; entretanto, induziu proliferação pequena, mas significativa nas células dos grupos 4x e 10x, quando comparado aos seus respectivos controles (Figura 8A). Da mesma maneira, quando incubadas com Con A, as células de todos os grupos produziram níveis significativos de IL-4 (Figura 8B), IL-5 (Figura 8C), IFN-γ (Figura 8D) e IL-10 (Figura 8E). Porém, quando comparados entre si, somente a produção de IFN-γ do grupo 10x apresentou diferença significativa em relação ao grupo 0x, quando as células foram incubadas nas mesmas condições (Figura 8D). Em todos os outros casos, a produção das citocinas induzida por Con A foi semelhante nos 3 grupos experimentais. Como esperado, o estímulo com EGS não induziu a produção de nenhuma das citocinas nas células do grupo 0x em comparação com seus respectivos grupos controle. Por outro lado, níveis significativos de IL-4 (Figura 8B), IL-5 (Figura 8C) e IL-10 (Figura 8E) foram produzidos pelas células dos grupos 4x e 10x sob as mesmas condições, tanto em comparação com seus respectivos controles (células incubadas com meio) quando em comparação com as células do grupo 0x incubadas com EGS. Novamente, a exceção foi o IFN-γ, cuja produção pelas células dos grupos 4x e 10x

induzida pelo EGS foi maior do que a dos seus respectivos controles e do que a do grupo 0x também incubado com EGS, embora nenhuma dessas diferenças tenha sido estatisticamente significativa (Figura 8D).

Vale ressaltar que apesar de termos utilizados concentrações de Con A e de EGS consideradas ótimas (com base em experimentos preliminares do laboratório), o perfil da resposta proliferativa e da produção de citocinas foi diferente quando comparados ambos os estímulos. Enquanto a resposta proliferativa (Figura 8A) e a produção de IFN-γ (Figura 8D) foram bem maiores sob estímulo de policlonal (Con A) quando comparadas com o estímulo antígeno-específico (EGS), os níveis de IL-5 (Figura 8C), apresentaram um fenótipo inverso, sendo maiores sob o estímulo antígeno-específico em comparação ao estímulo policlonal. No caso da IL-4 (Figura 8B) e da IL-10 (Figura 8E), seus níveis foram semelhantes nos grupos 4x e 10x na presença de ambos os estímulos.

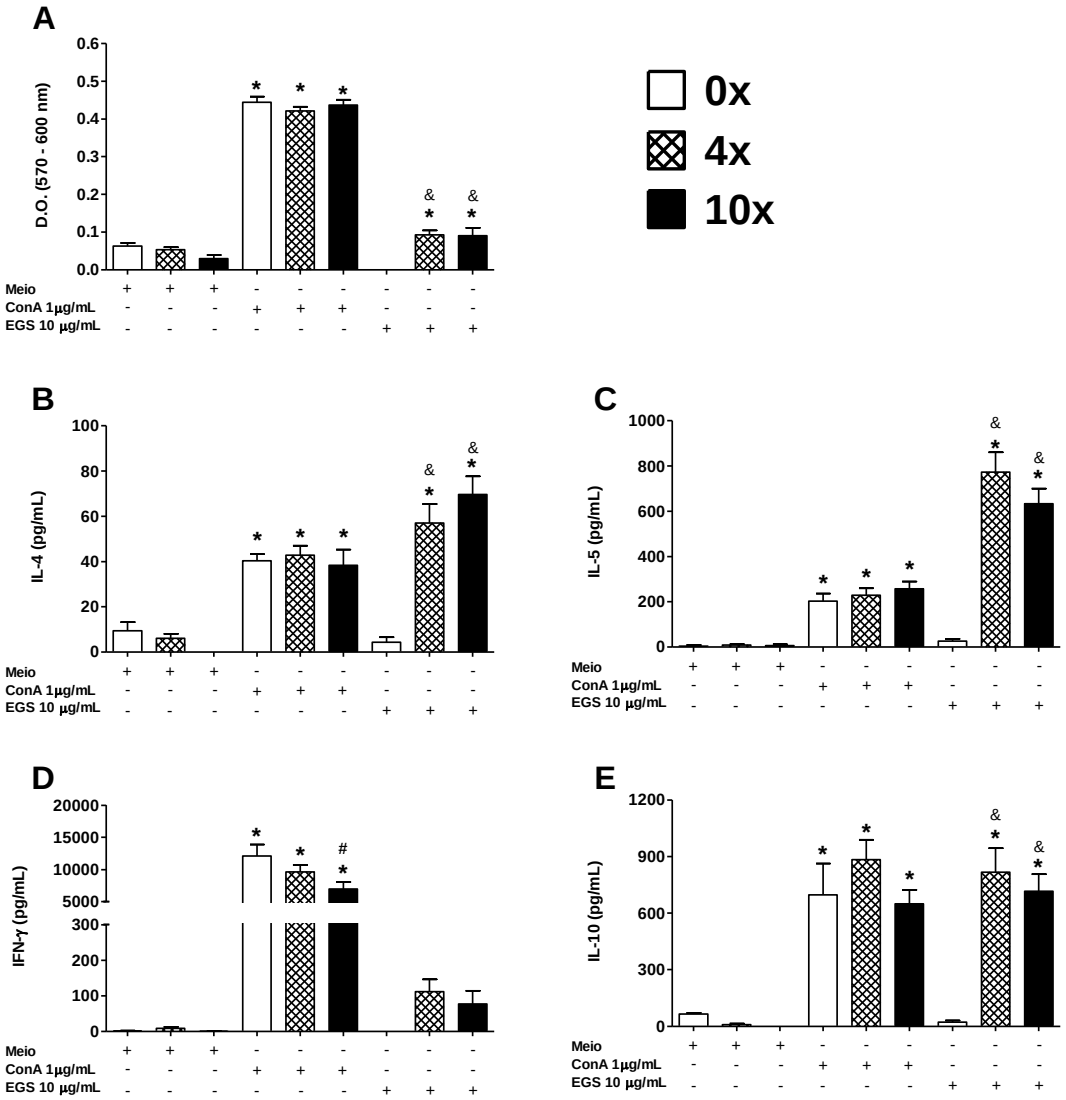

Figura 8. Proliferação e citocinas produzidas por células totais de baço de camundongos *naive* e expostos a picadas do mosquito *A. aegypti.* As células totais do baço de camundongos *naive* (0x) e expostos 4 ou 10 vezes (4x e 10x, respectivamente) a picadas foram cultivadas com meio somente ou estimuladas com Con A (1 µg/mL) ou EGS de *A. aegypti* (10 µg/mL). Para a proliferação, foi adicionado resazurina após 48 horas de cultura e após mais 24 h, foi feita leitura das placas em espectrofotômetro a 570 e 600 nm (A). Para as citocinas, foi realizada a coleta do sobrenadante e os níveis de IL-4 (B), IL–5 (C), IFN-γ (D) e IL-10 (E) foram avaliados por ELISA. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós teste de Tukey. $^{*}p \leq 0{,}05$ em relação aos respectivos grupos "Meio"; $^{\#}p \leq 0{,}05$ em relação ao grupo 0x estimulado com "Con A" e $^{\&}p \leq 0{,}05$ em relação ao grupo 0x estimulado com "EGS".

4.4 Avaliação do edema e da migração celular na orelha de animais naive *e expostos 4 e 10 vezes à picadas de* A. aegypti

Como a resposta sistêmica avaliada nas culturas de células totais do baço não indicou diferenças significativas que explicassem o fenótipo observado quanto ao perfil de anticorpos no soro, decidimos avaliar um parâmetro local decorrente da exposição ao *A. aegypti* nos animais sensibilizados pelas picadas do mosquito. Assim, avaliamos a migração celular induzida pela picada de *A. aegypti* na orelha de animais previamente sensibilizados, também nos dois momentos distintos da resposta humoral (grupos 4x e 10x), comparando-a com as células residentes de um animal *naive* (grupo 0x). Primeiramente, a fim de se obter uma medida do edema no local da picada dos mosquitos e assim definir o melhor período para avaliar a migração local, a espessura das orelhas foi determinada 2, 6, 12 e 24 horas após o desafio com a picada de *A. aegypti* nos animais sensibilizados dos grupos descritos acima (Figura 9).

A cinética de formação do edema na orelha seguiu um padrão parecido, mas com algumas especificidades em cada grupo (Figura 9A). Em ambos os grupos, já foi possível observar um aumento da espessura da orelha 2 horas após a exposição aos mosquitos. Porém, enquanto no grupo 4x aparentemente o pico do edema ocorreu 12 horas após a exposição e manteve-se estável após 24 horas, no grupo 10x o aumento foi progressivo nos tempos avaliados e a espessura da orelha foi sempre maior do que no tempo imediatamente anterior, sugerindo que o pico pode ainda não ter sido alcançado em 24 horas (embora avaliações posteriores não tenham sido realizadas). Observamos diferenças significativas entre os grupos nos tempos de 6 e 24 horas após a exposição (Figura 9A). O isolamento das células das orelhas dos grupos após 24 horas da exposição aos mosquitos mostrou um infiltrado celular significativo na orelha de animais dos grupos 4x e 10x quando comparados às células residentes de animais *naive* não expostos aos mosquitos (0x). Entretanto, não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos 4x e 10x (Figura 9B).

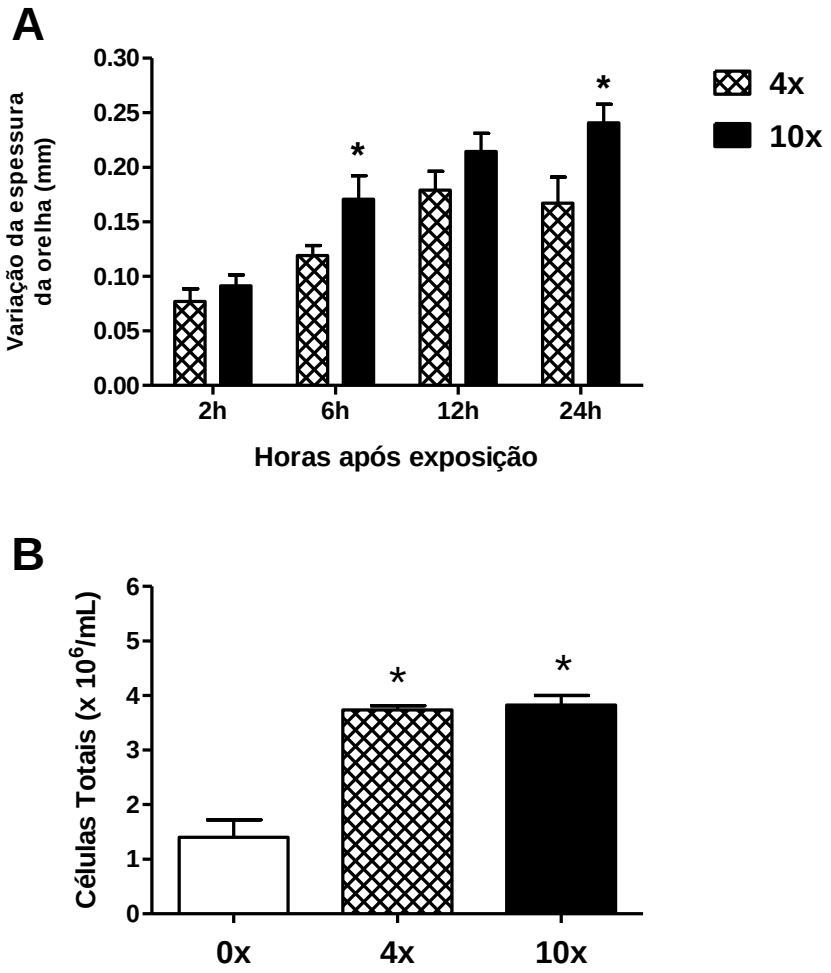

Figura 9. Cinética do edema e migração celular para a orelha induzidas pela picada do mosquito *A. aegypti*. Camundongos BALB/c foram expostos quinzenalmente 4 e 10 vezes (4x e 10x, respectivamente) a picadas de *A. aegypti* conforme descrito em Material e Métodos. Sete dias após a última exposição os animais foram desafiados *in vivo* na orelha com 10 mosquitos fêmeas de *A. aegypti* (5 mosquitos em cada orelha). (A) A cinética do edema foi determinada por meio da diferença entre a medida da espessura da orelha antes da exposição e 2, 6, 12 e 24 horas após o desafio. A análise estatística foi realizada pelo teste *t* de Student. $*p \leq 0{,}05$ em relação ao grupo 4x. (B) Vinte e quatro horas após o desafio as células da orelha foram isoladas e contadas. Resultados representativos de dois experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $*p \leq 0.05$ em relação ao Controle (0x).

Com base nesses resultados, determinamos quantitativa e qualitativamente o infiltrado celular no tecido epitelial da orelha nesses três grupos, utilizando a técnica de citometria de fluxo. Iniciamos pela avaliação de populações de origem mielóide e observamos que 24 horas após a exposição, houve um aumento do número total de macrófagos (Figura 10A), neutrófilos (Figura 10B) e eosinófilos (Figura 10C) nas orelhas em ambos os grupos sensibilizados (4x e 10x) quando comparados com o grupo *naive* (0x). Quando comparados os grupos 4x e 10x, não foram observadas diferenças significativas na população de macrófagos (Figura 10A), porém a população de neutrófilos se mostrou aumentada no grupo 10x em comparação com o grupo 4x (Figura 10B) e o inverso foi observado com relação aos eosinófilos (Figura 10C). No caso dos mastócitos, apesar de ter sido observado um aumento numérico dessas células nos grupos 4x e 10x em comparação com o grupo 0x, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Tampouco a aparente diminuição de mastócitos do grupo 10x quando comparado ao grupo 4x alcançou significância estatística (Figura 10D).

A seguir avaliamos as principais populações linfoides e observamos um aumento significativo do número total de linfócitos B (Figura 11A), linfócitos T $CD4^+$ (Figura 11B) e linfócitos T $CD8^+$ (Figura 11C) nas orelhas em ambos os grupos sensibilizados (4x e 10x) quando comparados com o grupo *naive* (0x). Quando comparados os grupos 4x e 10x, observamos que a população de linfócitos B se mostrou aumentada no grupo 4x em comparação com o grupo 10x (Figura 11A). Já no caso dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$, além dos números detectados terem sido bastante baixos, não foram diferentes entre os dois grupos experimentais (Figura 11B e 11C, respectivamente).

Para visualizar as alterações observadas de um ponto de vista comparativo, fizemos uma quantificação relativa de cada uma dessas populações celulares (Tabela 4). Atribuindo o valor 1 ao número absoluto de cada população celular residente na orelha de animais *naive* (0x), calculamos qual seria o valor proporcional dessas mesmas populações encontradas nas orelhas dos animais dos grupos 4x e 10x após a exposição a picadas do mosquito *A. aegypti*. Neste sentido notamos que há um aumento de todas a populações celulares nos grupos 4x e 10x em relação ao grupo 0x, conforme já observado nas Figuras 10 e 11. Entretanto, no caso dos linfócitos T e B, não foi possível calcular a proporção relativa de aumento porque nos animais do grupo 0x, essas células não foram numericamente detectadas. Por outro lado, é interessante notar que enquanto o aumento de mastócitos, macrófagos e neutrófilos não excedeu 300 vezes (na maioria dos casos, bem abaixo desse valor), os eosinófilos foram as células que apresentaram maior aumento relativo, tendo aumentado mais de 2000 vezes nas orelhas dos animais

do grupo 4x e mais de 1000 vezes nas orelhas dos animais do grupo 10x, quando comparados aos valores das orelhas dos animais *naive* (0x).

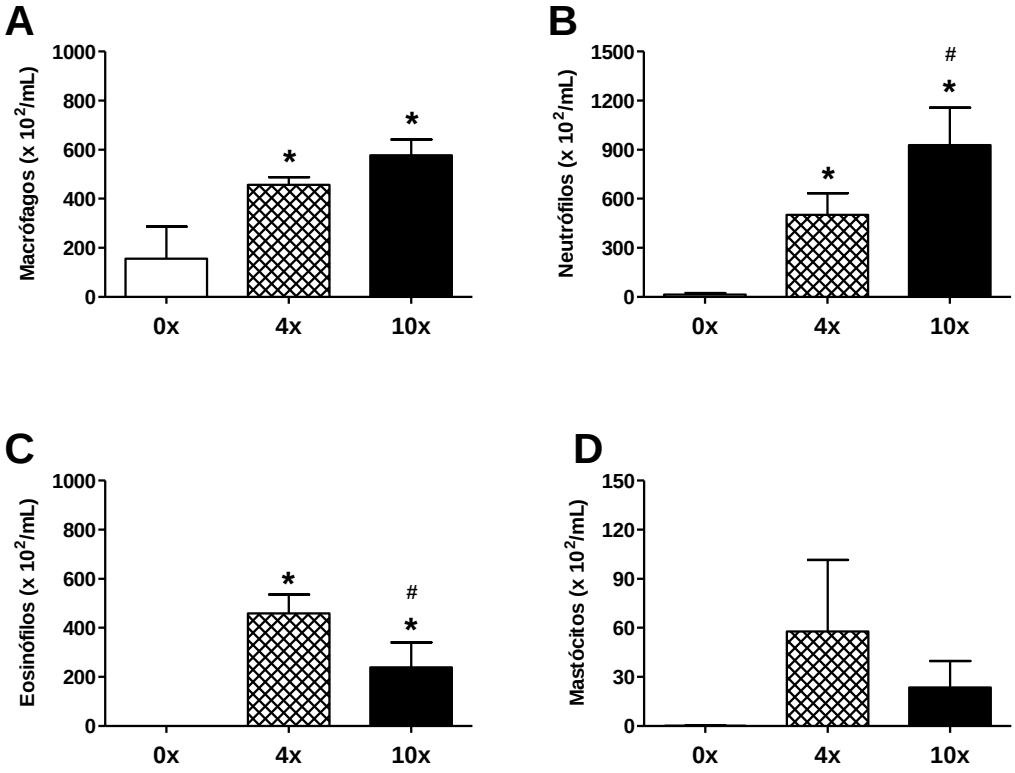

Figura 10. Migração de células mieloides para a orelha de camundongos expostos ou não a picadas de *A. aegypti*. Camundongos BALB/c foram expostos a picadas de *A. aegypti* quinzenalmente quatro (4x) e dez (10x) vezes. Sete dias após a última exposição, os animais foram desafiados *in vivo* na orelha pela picada de 10 fêmeas de A. aegypti (5 mosquitos em cada orelha). Vinte e quatro horas após o desafio as células da orelha foram marcadas e analisadas para os anticorpos específicos: (A) macrófagos; (B) neutrófilos; (C) eosinófilos; (D) Mastócitos. Resultados representativos de dois experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $^{*}p \leq 0.05$ em relação grupo 0x; $^{\#}p \leq 0.05$ em relação ao grupo 4x.

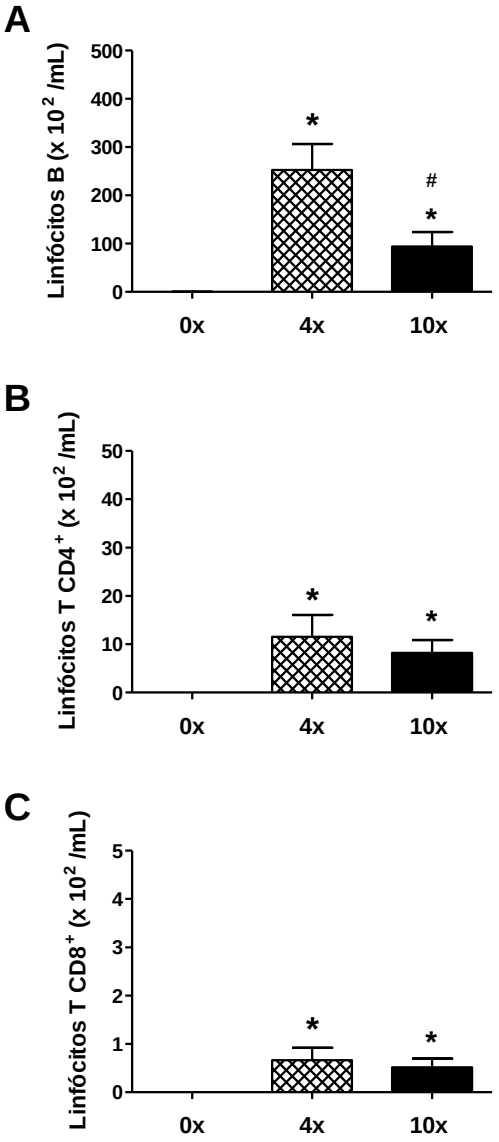

Figura 11. Migração de células linfoides para a orelha de camundongos expostos ou não a picadas de *A. aegypti*. Camundongos BALB/c foram expostos a picadas de *A. aegypti* quinzenalmente quatro (4x) e dez (10x) vezes. Sete dias após a última exposição, os animais foram desafiados *in vivo* na orelha pela picada de 10 fêmeas de A. aegypti (5 mosquitos em cada orelha). Vinte e quatro horas após o desafio as células da orelha foram marcadas e analisadas para os anticorpos específicos: (A) linfócitos B; (B) linfócitos T $CD4^+$; (C) linfócitos T $CD8^+$. Resultados representativos de dois experimentos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $^*p \leq 0.05$ em relação grupo 0x; $^{\#}p \leq 0.05$ em relação ao grupo 4x.

Tabela 4 – Quantificação relativa das populações de leucócitos da orelha de animais *naive* (0x) e de animais sensibilizados (4x e 10x) e posteriormente desafiados com a picada de mosquitos *A. aegypti*.

População	0x	4x	10x
Células B	0	ND	ND
Células T	0	ND	ND
Mastócitos	1	258,6	105,8
Macrófagos	1	2,93	3,71
Neutrófilos	1	38,5	71,4
Eosinófilos	1	2086,2	1083,4

Camundongos BALB/c foram sensibilizados 0x (controle), 4 e 10 vezes, conforme descrito no item 3.3 em Material e Métodos. Após este processo os animais foram desafiados *in vivo* na orelha com 10 mosquitos fêmeas *A. aegypti* (5 em cada orelha) conforme descrito no item 3.6 em material e métodos. O valor de animais 0x (*naive*) foi normalizado para 1. A relação do número total das células de cada grupo para cada tipo celular foi dividida pela quantidade presente no grupo 0x (controle) e o número absoluto foi obtido e considerado a razão entre os grupos 4x e 10x com o grupo 0x (controle). ND: não definido.

4.5. Avaliação do volume de sangue ingerido pelos mosquitos A. aegypti ao longo das exposições

Além de avaliar o processo de sensibilização e dessensibilização que ocorre no hospedeiro vertebrado em resposta a exposição às picadas do mosquito *A. aegypti*, também avaliamos como essa resposta afeta o *fitness* biológico do mosquito ao longo do experimento. O primeiro parâmetro de *fitness* avaliado foi a ingestão sanguínea dos mosquitos *A. aegypti* durante o repasto realizado nos camundongos apresentando níveis progressivos de exposição. Os dados apresentados na Figura 12 indicam a ingestão sanguínea avaliada individualmente em cada um dos mosquitos aos quais os animais foram expostos ao longo do protocolo de sensibilização/dessensibilização padronizado no presente trabalho. Este parâmetro foi avaliado pela determinação da D.O. a 540 nm do homogenato individual dos mosquitos, como um parâmetro indireto da presença de hemoglobina, conforme metodologia desenvolvida pelo nosso grupo (MACIEL et al., 2014). Os resultados individuais obtidos à partir da exposição de cada camundongo mostram uma grande variação biológica (Figura 12). Neste experimento, observamos um aumento significativo no volume de sangue ingerido pelos mosquitos que realizaram o repasto sanguíneo em apenas dois dos dez camundongos do grupo 4x quando comparados ao grupo 1x (Figuras 12C e 12H). Em outros três camundongos, o volume de sangue obtido no repasto em animais do grupo 4x foi menor do que aquele do grupo 1x (Figuras 12D, 12E e 12F). Já para os mosquitos que se alimentaram nos animais do grupo 7x, o volume de sangue obtido em 6 animais foi significativamente maior do que o obtido nos animais do grupo 1x (Figuras 12A, 12B, 12C, 12H, 12I e 12J). Finalmente, para os mosquitos que se alimentaram nos animais do grupo 10x, observamos que o volume médio obtido dos mosquitos que se alimentaram em um dos animais foi maior do que a média do volume obtido na primeira exposição a esse mesmo animal, enquanto em outro animal, o fenótipo foi o inverso (Figura 12G e 12J, respectivamente).

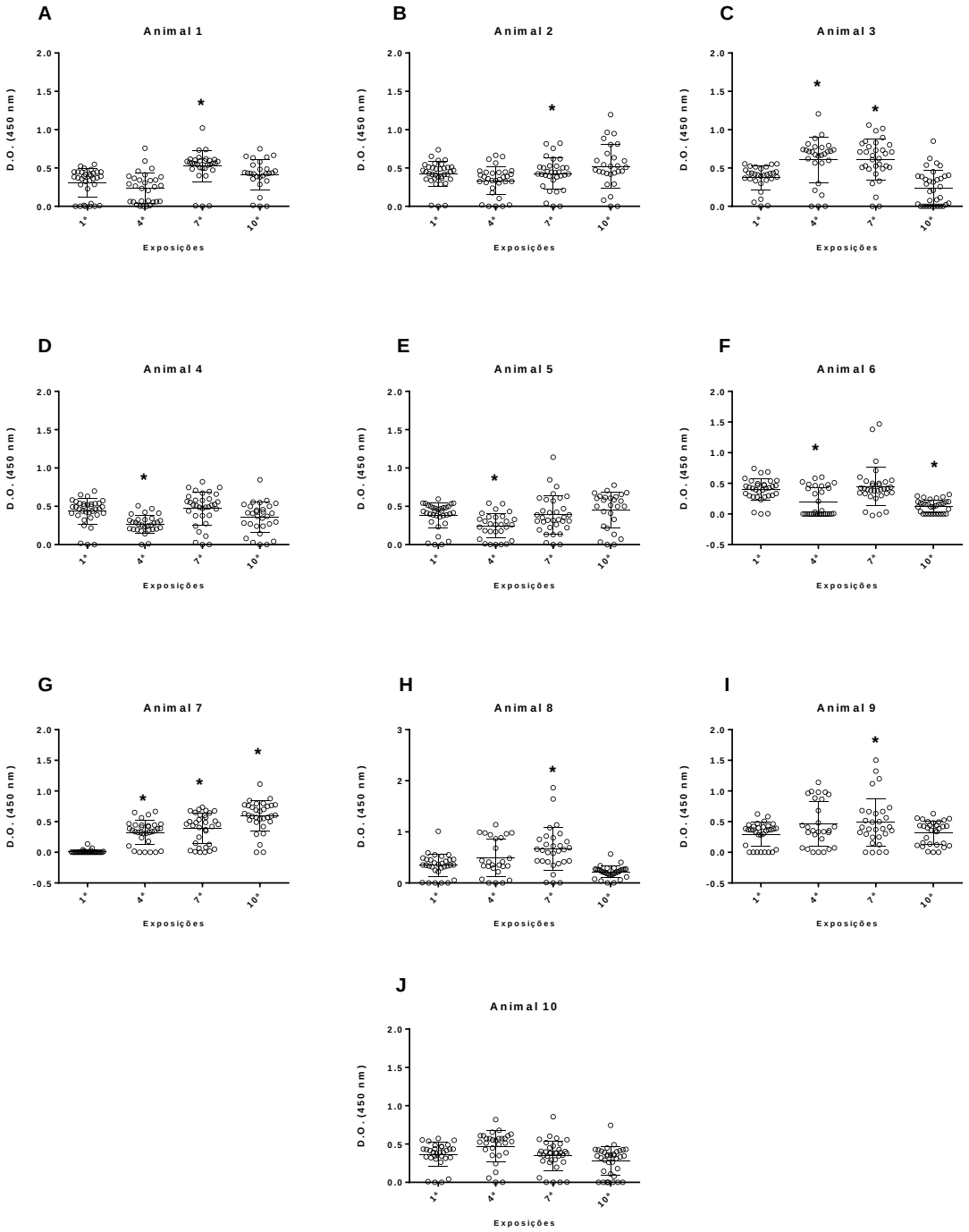

Figura 12. Ingestão de sangue por mosquitos *A. aegypti* em camundongos com diferentes níveis de exposição. Camundongos foram expostos (1, 4, 7 e 10 vezes) a cerca de 30 mosquitos *A. aegypti* fêmeas. Ao término desse período, os animais foram eutanasiados e os mosquitos utilizados em cada uma das etapas de exposição foram processados para análise de hemoglobina presente no macerado bruto corporal de cada mosquito, conforme descrito em Material e Métodos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. *$p \leq 0.05$ em relação ao grupo 1x.

4.6 Ensaio de Oviposição

Além de determinar o volume de sangue ingerido pelos mosquitos, também avaliamos a oviposição, como um de seus parâmetros de performance reprodutiva. Não se sabe ainda como o sistema imune do hospedeiro vertebrado pode interferir na reprodução do mosquito, por isso em nosso protocolo de exposição natural a picadas (Figura 6A) nós também avaliamos a oviposição dos mosquitos que picaram estes animais. Após o repasto, os mosquitos foram anestesiados e acondicionados em placas de propileno na proporção de 1 mosquito por poço (vide material e métodos) e com forragem de papel úmido. Após a postura, foi realizada a contagem de ovos utilizando estereomicroscópio. A Figura 12 representa o número de ovos por fêmea por exposições. No momento da primeira exposição, quando os camundongos BALB/c ainda são *naive,* observamos uma elevada oviposição com cerca de 100 ovos por mosquito fêmea *A. aegypti*. A partir da 2ª exposição observamos um declínio deste fenômeno, que permanece até a 7ª exposição, onde novamente há um aumento no número de ovos por fêmea do mosquito (Figura 13).

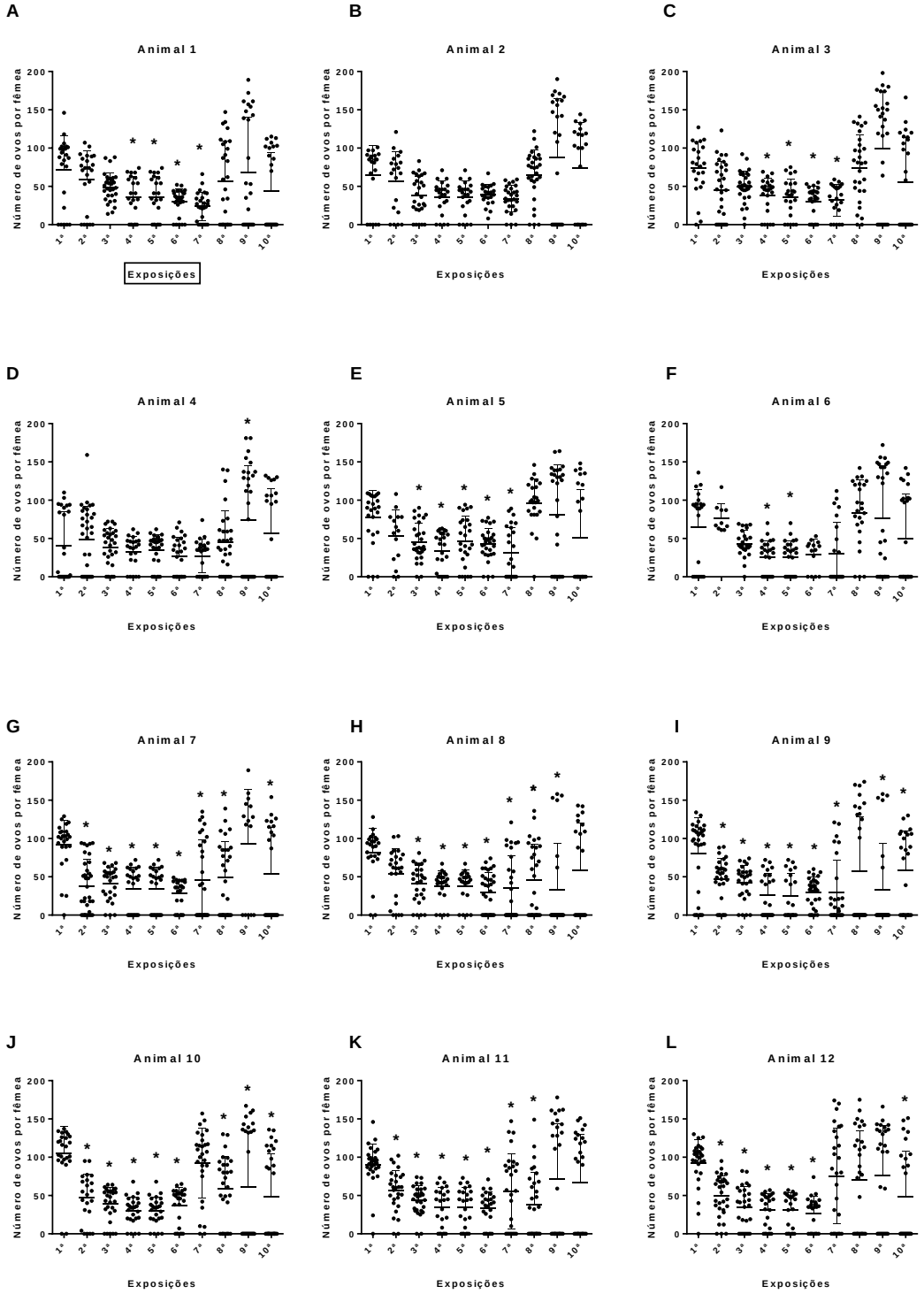

Figura 13. Oviposição de mosquitos *A. aegypti* após o repasto em camundongos. Avaliamos a postura de ovos por fonte de alimentação (camundongos BAlb/c), exposições e ovos por fêmea. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $^{*}p \leq 0.05\%$ em relação a 1ª exposição.

4.7. Escolha da fonte do repasto sanguíneo por mosquitos A. aegypti em camundongos naive *e previamente expostos a picadas*

A influência que o sistema imune do hospedeiro vertebrado exerce sobre o artrópode vetor e as possíveis interferências em suas atividades biológicas como a escolha dos hospedeiros e o volume de sangue ingerido, por exemplo, foram pouco estudadas até o momento. Com base na escassez de dados a este respeito, decidimos avaliar o perfil de escolha e o volume sanguíneo ingerido por mosquitos alimentados em camundongos previamente expostos às picadas de *A. aegypti* e comparar estes dados com o de animais *naive* que nunca foram expostos aos mosquitos. A fim de avaliar qualitativamente e quantitativamente o volume de sangue ingerido pelos mosquitos, primeiramente, injetamos um corante vital nos animais do grupo 10x (animais expostos 10 vezes às picadas de *A. aegypti*) e injetamos PBS nos animais *naive*, conforme descrito em Material e Métodos (item 3.10). O corante escolhido para ser utilizado neste ensaio foi o azul de Evans, um corante vital polar que realiza ligações covalentes com a albumina sérica e, portanto, confere uma instantânea e forte coloração azul ao animal. Os animais foram pareados e dispostos sobre um recipiente contendo 50 mosquitos fêmeas por 30 minutos (Figura 4 – vide material e métodos). Em seguida, como contraprova, injetamos azul de Evans em camundongos *naive* e PBS nos animais expostos 10x. O volume de sangue ingerido pelos mosquitos não foi significativamente diferente quando comparamos os grupos *naive* (PBS) e expostos 10x (azul de Evans) (Figura 14A). Embora não tenha sido significativo, observa-se, neste ensaio, uma tendência crescente no número de mosquitos que preferiram os animais expostos 10x que receberam o corante azul de Evans (Figura 14C). Porém, este fenômeno não foi observado na contraprova e a diferença entre o número de mosquitos que preferiram o animal *naive* que recebeu o corante azul de Evans ou o animal exposto 10x que recebeu PBS não foi estatisticamente significativa, embora aqui também tenha sido observada uma tendência crescente na escolha do animal injetado com azul de Evans que, nesse caso, foi o grupo *naive* (Figura 14B e 14D).

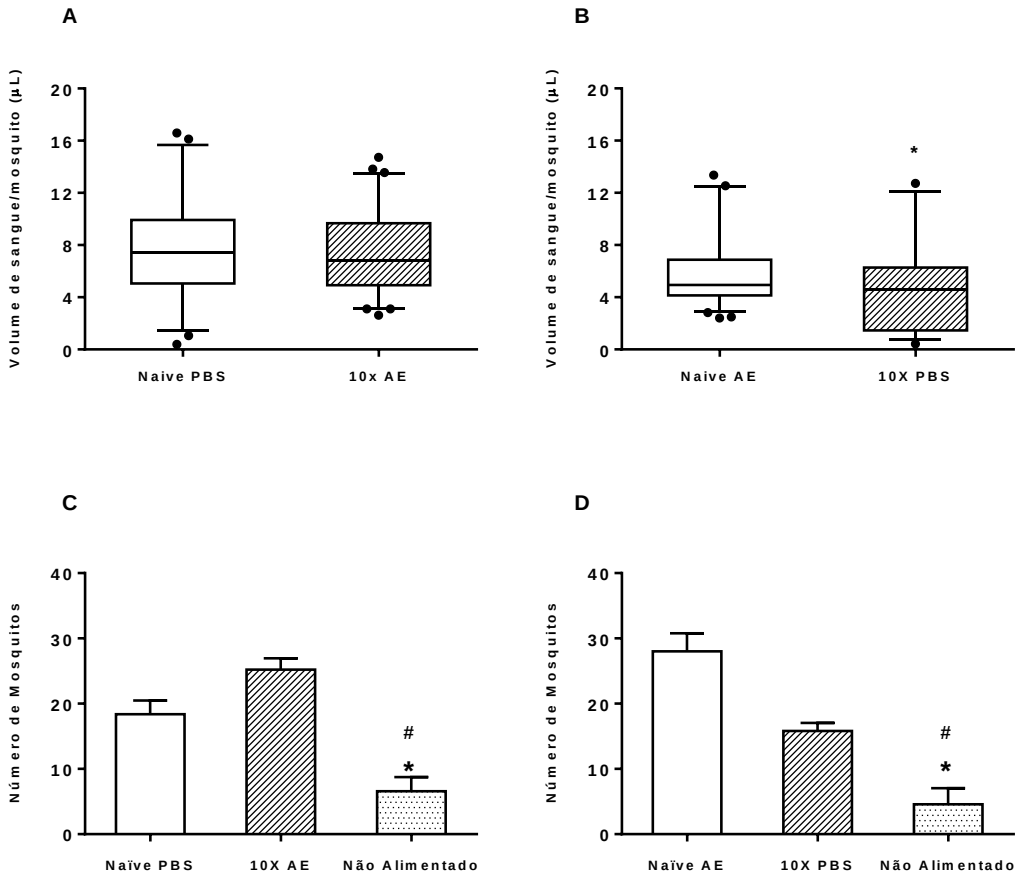

Figura 14. Atratividade de camundongos *naive* e sensibilizados pelas picadas de *A. aegypti*. Camundongos sensibilizados 10x receberam azul de Evans pela veia caudal e camundongos *naive* receberam PBS pela mesma via. Em seguida, estes camundongos foram dispostos em pares (1 animal de cada grupo) e expostos às picadas de, aproximadamente, 50 mosquitos *A. aegypti* fêmea. Foi realizada uma contra-prova na qual camundongos *naive* receberam azul de Evans e camundongos 10x receberam PBS pela veia caudal. (A) e (B) Boxplots do volume de sangue ingerido por mosquitos alimentados em camundongos que receberam PBS ou azul de Evans (2,5-97,5 percentuais). Os pontos indicam valores atípicos. (C) e (D) Proporção de mosquitos que escolheram o animal o qual foi injetado o azul de Evans. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. $^{*}p \leq 0.05$ em relação ao grupo *naive*. $^{\#}p \leq 0.05$ em relação ao grupo 10X.

4.8 Modelo de inflamação aguda induzida pelos componentes salivares de A. aegypti na cavidade peritoneal

Apesar dos dados interessantes obtidos com o modelo de exposição prolongada aos mosquitos *A. aegypti*, o protocolo experimental usado para obter animais expostos 10 vezes ao mosquito demorava em torno de 5 meses para ser realizado. Consideramos esse um tempo longo para a avaliação dos mecanismos de ação de possíveis mediadores envolvidos nos fenótipos observados. Dentro desse contexto e considerando que o infiltrado celular da orelha em resposta à picada do *A. aegypti* foi algo bastante marcante nos animais sensibilizados, buscamos padronizar um modelo de inflamação aguda induzida na cavidade peritoneal de camundongos em resposta à inoculação do EGS de *A. aegypti*, para o estudo dos mediadores envolvidos.

Para isso, inoculamos o EGS do mosquito intraperitonealmente durante 1 a 5 dias consecutivos e realizamos o LCP 24 horas após a última inoculação (Figura 15A), conforme explicado em Material e Métodos. Observamos que o número total de células recrutadas foi crescente e proporcional ao número de inoculações com EGS, tendo sido significativamente maior a partir de 3 inoculações quando comparado ao grupo controle (animais inoculados com PBS somente – Figura 15B). Em termos das populações específicas, observamos um aumento da população de células mononucleares proporcional ao número de inoculações com EGS, mas somente no grupo inoculado 5 vezes (grupo EGS 5X) essa diferença foi estatisticamente significativa em relação ao controle (grupo PBS 5X) (Figura 16A). Fenótipo semelhante foi observado com relação aos eosinófilos (Figura 16B), também com significância estatística somente quando comparados os grupos PBS 5X e EGS 5X. No caso dos neutrófilos, não foram observadas diferenças estatísticas entre o grupo controle (PBS 5X) e os grupos experimentais (Figura 16C).

É importante ressaltar que, em termos quantitativos, o número total de neutrófilos não sofreu um aumento significativo em nenhuma das condições experimentais, enquanto o número total de células mononucleares aumentou aproximadamente 160% no grupo EGS 5X em comparação com o grupo PBS 5X e o número total de eosinófilos aumentou mais de 2500% nas mesmas condições. Esses dados foram confirmados por citometria de fluxo (Figura Suplementar 1 - APÊNDICE). Portanto, de maneira semelhante ao observado na reação inflamatória na orelha, a população de eosinófilos foi a que apresentou maior aumento relativo dentre as populações avaliadas, após o contato com os componentes salivares do mosquito *A. aegypti*.

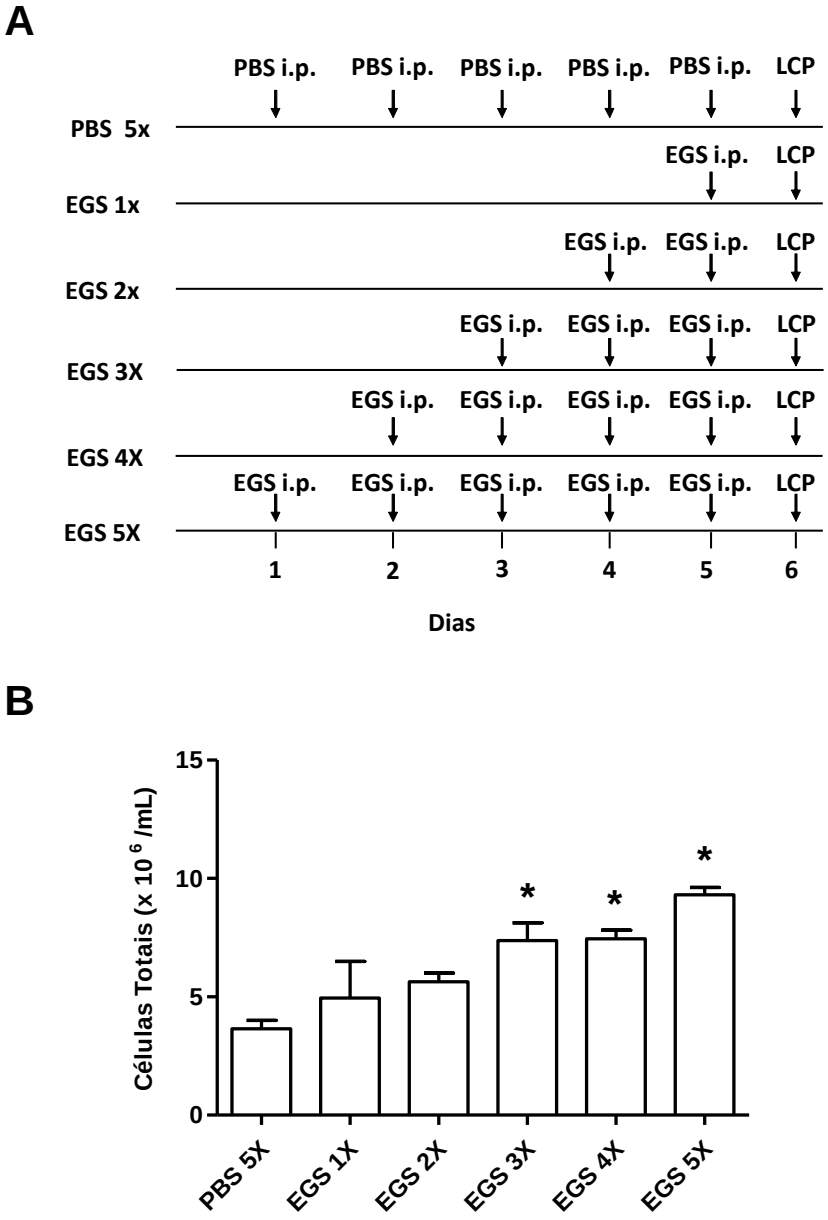

Figura 15. Células totais do LCP de camundongos inoculados com EGS de *A. aegypti*. (A) Camundongos BALB/c receberam 10 µg EGS intraperitonealmente, por 1 a 5 dias (EGS 1X a 5X). Camundongos do grupo controle foram inoculados por 5 dias com PBS (PBS 5X). Vinte e quatro horas após a última inoculação, os animais foram eutanasiados e o LCP foi coletado para realização das contagens. Dados representativos de pelo menos 3 experimentos (n = 4-5). (B) A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. *$p \leq 0{,}05$ em relação ao controle (PBS 5x).

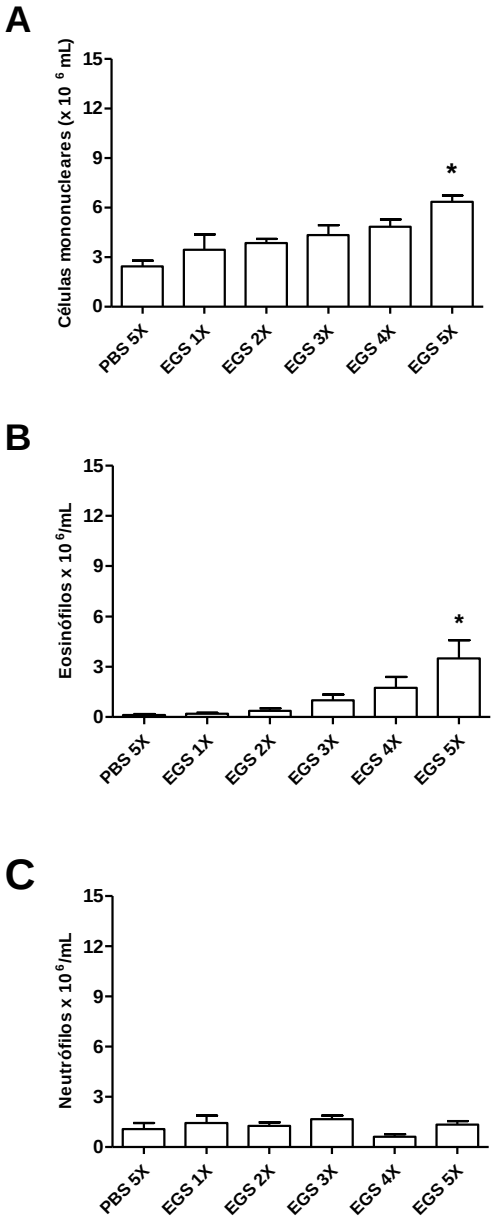

Figura 16. Células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos no LCP de camundongos inoculados com EGS de *A. aegypti*. Camundongos BALB/c receberam 5 µg EGS intraperitonealmente, por 5 dias (5x), quatro dias (4x), três dias (3x), dois dias (2x) e 1 dia (1x). Camundongos do grupo controle (PBS 5x) foram inoculados durante 5 dias seguidos. Vinte e quatro horas após a última inoculação, os animais foram eutanasiados e o LCP foi coletado para a confecção de lâminas conforme descrito em Material e Métodos. (A) Células mononucleares, (B) Eosinófilos e (C) Neutrófilos. A análise estatística foi realizada por ANOVA seguida do pós-teste de Tukey. *$p \leq 0,05$ em relação ao controle (PBS 5x). Leitura com aumento de 1000x.

Como já mencionado, o infiltrado eosinofílico esteve presente de maneira evidente tanto no modelo de migração celular para a orelha (crônico) quanto no modelo de migração celular para a cavidade peritoneal (agudo). Além disso, no modelo crônico, observamos que o infiltrado e que esse infiltrado eosinofílico foi menos robusto nos animais expostos 10 vezes ao mosquito (10x), sugerindo que o processo de sensibilização está associado à migração dessas células enquanto durante a dessensibilização, ocorre menor migração dessas células. Com base nessas evidências sobre o papel dos eosinófilos como possíveis marcadores do processo de sensibilização e dessensibilização aos componentes salivares do mosquito, decidimos determinar quais mediadores estariam envolvidos na migração dessas células, utilizando o modelo agudo de migração para a cavidade peritoneal induzido pelo EGS do *A. aegypti*.

Dentre os mediadores envolvidos na biologia do eosinófilo, foi demonstrado que a citocina IL-5 tem um papel fundamental no recrutamento, proliferação, diferenciação e ativação dessas células (FACCIOLI et al., 1996; ROGERIO et. al., 2010). Sendo assim, para determinar se essa citocina está associada com a presença de eosinófilos na cavidade peritoneal induzida pelo EGS, realizamos sua determinação no LCP dos animais que receberam EGS ou PBS. A Figura 17A demonstra um aumento significativo de IL-5 no sobrenadante do LCP de animais que receberam EGS em comparação com os animais que receberam PBS. Para determinar seu papel no recrutamento dessas células, realizamos um pré-tratamento dos animais com anticorpo anti-IL-5 (50 μg/animal) ou com isotipo controle (IgG1 de rato), 24 horas antes da inoculação com o EGS por 5 dias consecutivos. A Figura 17B mostra que camundongos que receberam o anticorpo anti-IL-5 apresentaram menor migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal em resposta ao EGS de *A. aegypti*, quando comparados aos camundongos que receberam apenas PBS ou o isotipo controle antes da inoculação com EGS.

Alguns mediadores de natureza lipídica também são capazes de mediar o recrutamento de eosinófilos, dentre eles o fator de ativação plaquetária (PAF) e eicosanoides como o leucotrieno B_4 (LTB_4), cisteinil-leucotrienos (LTC_4, LTD_4 e LTE_4) e a prostaglandina D_2 (CARLOS et al., 2011; LUNA-GOMES; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2013). Para determinar se a presença de leucotrienos também está associada com a migração de eosinófilos nesse mesmo modelo, enviamos amostras do LCP dos animais que receberam EGS ou PBS para o Centro de Excelência em Quantificação e Identificação de Lipídios (CEQIL) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, USP. Porém, até a conclusão da escrita desta tese, não havíamos recebido o resultado dessas dosagens. Paralelamente, realizamos um novo ensaio de migração induzida pelo EGS em camundongos deficientes da enzima 5-lipoxigenase (ALOX 5),

responsável pela síntese de leucotrienos a partir do ácido araquidônico liberado das membranas celulares por ação da fosfolipase A_2, e comparamos com a linhagem selvagem (129/Sv) para determinar se os leucotrienos estariam participando da migração eosinofílica descrita por nós. A Figura 18 mostra que a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti* é bastante reduzida nos animais ALOX 5, sugerindo o papel de leucotrienos nesse processo. Também determinamos a concentração de IL-5 na cavidade peritoneal desses animais e observamos que os camundongos 129/Sv inoculados com EGS também apresentam um aumento de IL-5 no LCP quando comparados com os controles (PBS), embora a concentração detectada tenha sido mais baixa do que observado em camundongos BALB/c (Figura 18B). Por outro lado, camundongos ALOX 5 não apresentaram IL-5 detectável em seu LCP quando inoculados com PBS ou EGS de *A. aegypti* (Figura 18B).

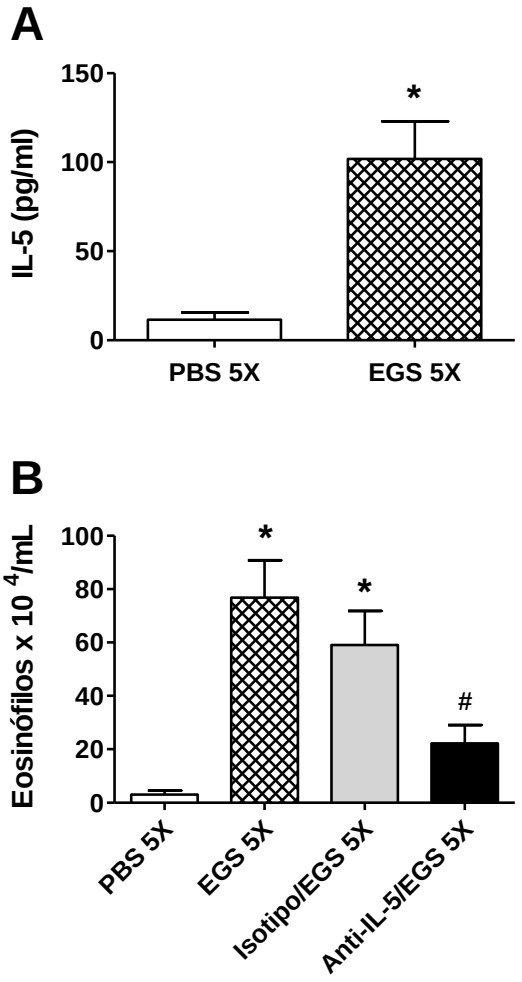

Figura 17. Determinação de IL-5 e papel dessa citocina na migração eosinofílica induzida pelo EGS de *A. aegypti* para a cavidade peritoneal de camundongos. Camundongos BALB/c receberam 5 µg de EGS i.p. por 5 dias. Camundongos do grupo controle (PBS) foram inoculados durante 5 dias seguidos. Vinte e quatro horas após a última inoculação, os animais foram eutanasiados e o LCP foi coletado. (A) O sobrenadante do foi coletado e as amostras foram liofilizadas e ressuspendidas em água deionizada para posterior dosagem de IL-5. (B) As células coletadas foram quantificadas e a contagem diferencial dos eosinófilos foi calculada a partir de lâminas confeccionadas em citocentrifugas. *$p \leq 0,05$ em relação ao grupo “PBS 5X”; #$p \leq 0,05$ em relação ao grupo “EGS 5X”

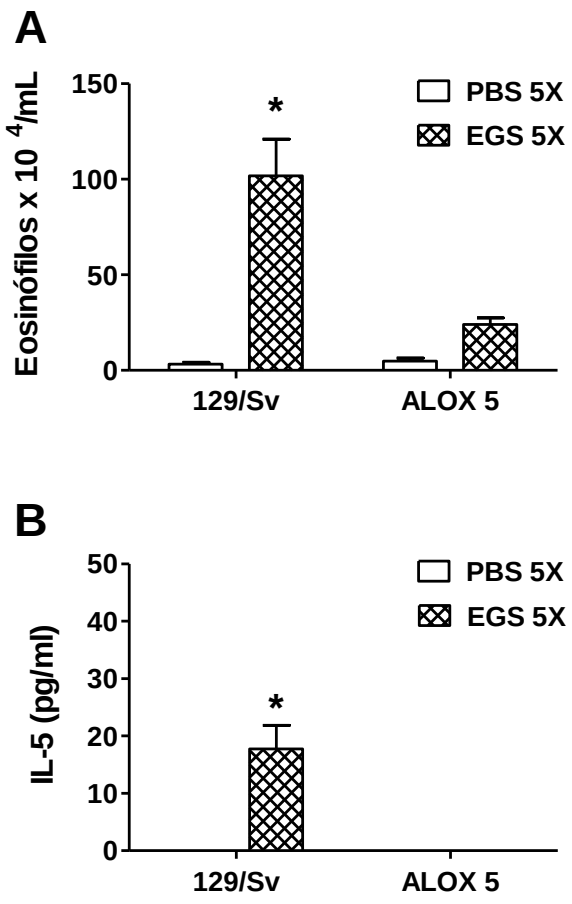

Figura 18. Papel dos leucotrienos na migração eosinofílica induzida pelo EGS de *A. aegypti* para a cavidade peritoneal de camundongos. Camundongos 129/Sv e ALOX 5 receberam 5 µg de EGS i.p. por 5 dias. Camundongos do grupo controle (PBS) foram inoculados durante 5 dias seguidos. Vinte e quatro horas após a última inoculação, os animais foram eutanasiados e o LCP foi coletado. As células coletadas foram quantificadas e a contagem diferencial dos eosinófilos foi calculada a partir de lâminas confeccionadas em citocentrifuga. *$p \leq 0,05$ em relação ao grupo "PBS 5X".

5 DISCUSSÃO

Para a maioria das pessoas, a exposição diária a alérgenos produz pouco ou nenhum sintoma clínico. No entanto, em alguns indivíduos, a exposição a um alérgeno pode induzir o desenvolvimento de uma inflamação alérgica que é mantida por linfócitos T e B (JANEWAY; MEDZHITOV, 2002). Sensibilizações alérgicas podem ser induzidas por antígenos ambientais como ácaros, pólen e proteínas animais, entre outros, podendo desencadear manifestações clínicas como asma, rinite alérgica, dermatite atópica e algumas alergias a alimentos. Algumas pessoas sensibilizadas chegam a desenvolver uma reação alérgica sistêmica potencialmente fatal, denominada anafilaxia, em segundos ou minutos após a exposição a determinados alérgenos (SAMPSON et al., 2005). Dentre todos os potenciais alérgenos, a reação desenvolvida em decorrência das picadas de mosquitos é relativamente comum e possui significado clínico crescente, uma vez que pode afetar a qualidade de vida de muitas pessoas (CANTILLO et al., 2014; PENG & SIMONS, 2007; PENG & SIMONS, 2004).

Modelos animais representam um recurso valioso para investigar os mecanismos das doenças e sua progressão. A maioria dos protocolos experimentais para o estudo de reações alérgicas em modelos murinos envolvem a sensibilização a um dado antígeno na presença de adjuvante, para induzir uma resposta imune do padrão Th2, caracterizada pela presença de células e mediadores solúveis típicos desse perfil de resposta. Nesse sentido, um modelo natural de sensibilização a picada de mosquitos pode ser uma importante ferramenta para estudar múltiplos parâmetros de doenças alérgicas, com a vantagem adicional de ocorrer sem o uso de adjuvantes, de forma a mimetizar o processo alérgico que a população humana desenvolve ao longo da sua vida. Em um estudo anterior de nosso grupo, mostramos que camundongos expostos 4 vezes a picadas de *A. aegypti*, seguido por desafio intranasal com antígenos salivares, desenvolvem uma resposta Th2 típica no microambiente pulmonar, com a presença das citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, aumento de colágeno e muco e de um infiltrado celular fortemente caracterizado pela presença de eosinófilos. Quando avaliamos a resposta humoral sistêmica, observamos que esses animais apresentavam uma resposta mista de padrão Th1/Th2, sugerindo que um processo de dessensibilização poderia estar em curso, mas que não foi possível avaliar completamente, dado o curto período que os animais foram expostos aos mosquitos (BARROS et al., 2016).

O estudo de sensibilização e dessensibilização à picadas de mosquito em seres humanos é dificultado pelo desenvolvimento de reações cruzadas à antígenos salivares de outras espécies de artrópodes hematófagos (CHEN; SIMONS; PENG, 1998). Assim

sendo, um modelo animal de alergia induzida apenas por picadas de *A. aegypti* poderia contribuir de maneira relevante para o estudo de possíveis mecanismos envolvidos neste processo. Alguns estudos sugerem ainda que a dessensibilização à exposição natural à picadas de mosquitos provavelmente ocorre durante a infância e a adolescência, e que lactentes e crianças de primeira infância podem estar em maior risco de apresentarem reações graves à picadas de mosquitos hematófagos (PENG et al., 2002 PENG et al., 2004). Há evidências de que os processos de sensibilização e posterior dessensibilização à picadas de mosquitos hematófagos ocorram num período de muitas semanas (PENG; SIMONS, 1998). Assim, buscamos adaptar um protocolo que mimetizasse este mesmo processo, expondo camundongos quinzenalmente a cerca de 30 mosquitos *A. aegypti* fêmeas por aproximadamente 5 meses (conforme protocolo descrito em Material e Métodos). Além disso, no que se refere ao processo de sensibilização, trabalhos anteriores afirmam existir uma forte correlação entre o grau de exposição à picadas do mosquito *A. aegypti* e a resposta de anticorpos do tipo IgG (NDILLE et al., 2012). Um aumento de anticorpos anafiláticos também foi observado em outros trabalhos em decorrência da picada ou inoculação de componentes salivares de mosquitos hematófagos, entretanto, com protocolos e graus diferentes de exposição daqueles empregados no presente trabalho (ORLANDI-PRADINES et al., 2011; PENG; SIMONS, 1998; PENG et al., 2004)

O processo de sensibilização clássico é caracterizado por reações imediatas e tardias na pele com aumento dos níveis séricos de IgG, IgE e proliferação de células T (PENG; YANG; SIMONS, 1996). Para Peng et. al., (1998) o processo de dessensibilização seria caracterizado como a redução de reações imediatas e com diminuição dos títulos de anticorpos considerados anafiláticos (IgE e, em alguns casos, IgG). Neste estudo animais expostos a picadas de *A. aegypti* apresentaram uma completa dessensibilização com aproximadamente 14 semanas, ao passo que o voluntário humano que concordou em participar do estudo o qual foi exposto a picadas de *C. quinquefasciatus* apresentou dessensibilização apenas após a 21ª semana. Em vista disso, podemos inferir que a administração de doses repetidas de componentes salivares em baixas concentrações poderia atuar como um tipo de imunoterapia e assim prevenir ou minimizar reações de hipersensibilidade à picadas de mosquitos. Este tipo de terapia, entretanto, ainda é inconclusiva e, diante disso, faz-se necessário maiores investigações.

Do ponto de vista de uma resposta adaptativa, sabe-se que células T $CD4^+$ secretam uma variedade de citocinas que estão ligadas à regulação das respostas imunes adaptativas. Em camundongos e em seres humanos, clones de células T $CD4^+$ podem se diferenciar em diferentes subpopulações de acordo com o perfil de citocinas

secretadas naquele microambiente. Neste contexto, a maioria dos estudos sugere que a saliva do mosquito *A. aegypti* possui como característica a indução de uma resposta polarizada para o perfil Th2 (CHEN et al., 1998; ZEIDNER et al., 1999). De fato, uma proteína salivar denominada SAAG-4, foi identificada como sendo responsável pela indução de IL-4 em células T $CD4^+$ (BOPPANA et. al., 2008). Nossos resultados mostraram que o perfil de citocinas produzidas por células totais de baço provenientes de animais expostos aos mosquitos e restimuladas *in vitro*, corroboram com os dados da literatura (Figura 8). A grande produção de IL-4 e IL-5 antígeno-específicas, em comparação com a resposta policlonal, indica que está havendo uma resposta predominantemente polarizada para um perfil Th2. Além disso, também constatamos uma produção significativa da citocina reguladora IL-10 antígeno-induzida, com níveis semelhantes àqueles observados com a estimulação policlonal. Já a produção antígeno-induzida de IFN-γ, embora detectável, foi pelo menos 100 vezes menor do que a induzida pelo estímulo policlonal. Apesar da descrição de todo esse perfil, não fomos capazes de observar diferenças na produção de nenhuma das citocinas avaliadas, quando comparados os grupos 4x e 10x, que representam momentos distintos do processo de sensibilização dos camundongos. Tampouco, o fenótipo encontrado explica as diferenças na produção de anticorpos ou na resposta de PCA observadas em nosso trabalho. Chen e colaboradores em um estudo clássico (1998), também demonstraram em seus resultados que camundongos previamente sensibilizados apresentaram um aumento da produção de IL-4 e diminuição da produção de IFN-γ em cultura de esplenócitos, resultado que também é corroborado por Wasserman e colaboradores (2004). Diante do exposto, especulamos que a modulação de IFN-γ, citocina responsável pela produção de IgG2a, pode estar acontecendo em algum momento não contemplado em nossas análises. Além disso, uma vez que a curva de detecção de IgG2a ainda era ascendente até a décima exposição, um protocolo com maior número de exposições poderia elucidar melhor este processo, o que não foi possível dadas as condições experimentais de desenvolvimento deste trabalho.

Vários trabalhos na literatura demonstraram que quando o soro imune é submetido a altas temperaturas, o anticorpo IgE, por ser termolábil, é degradado, enquanto a porção anafilática da IgG1 presente nesse soro permanece ativa (BRAGA, MOTA, 1976). Em nosso protocolo de PCA decidimos por não inativar o soro para que assim tivéssemos disponíveis tanto IgG1 quanto IgE. Com base nisso, sabemos que o anticorpo IgE é o principal mediador envolvido nos processos alérgicos, além disso, também está envolvido com diversos processos inflamatórios (AMARASEKERA, 2011; JOSEPHS et al., 2014; STARKL et al., 2016). Além disso, há alguns anos foi

demonstrado que a IgG1 compreende uma fração anafilática cuja produção depende de IL-4, e outra fração não anafilática dependente de IL-12 para ser produzido (FAQUIM-MAURO et al., 1999). A exposição aos mosquitos *A. aegypti* conferiu uma alta produção tanto de IgG1 específica quanto de IgE total; assim sendo, realizamos o teste de transferência de anticorpos a fim de compararmos as reações anafiláticas induzida pela presença destes anticorpos no mesmo animal após o desafio. Primeiramente injetamos o soro na região dorsal e após 2 horas desafiamos o local com o EGS para observar o extravasamento vascular na pele da região dorsal provocado pela presença do anticorpo IgG1. Nos mesmos animais, injetamos o soro em outra parte da região dorsal e cerca de 70 horas após este processo, fizemos um novo desafio no local com EGS para avaliarmos a atividade de IgE (BRAGA, MOTA, 1976). Esse processo de transferência de anticorpos se mostrou eficaz, pois observamos um aumento do extravasamento plasmático para o local do desafio tanto 2 e 70 horas após a inoculação soro nos animais *naive* (Figura 7). Este resultado já era esperado, pois, sabemos que o sistema imune do hospedeiro vertebrado é capaz de conferir uma resposta extremamente polarizada para um perfil Th2, o que caracteriza uma resposta alérgica a picadas do vetor. Porém, foi uma surpresa observar que embora a atividade anafilática da IgG1 e da IgE fosse maior no soro dos animais do grupo 10x, não houve diferença na PCA avaliada 2 horas após a inoculação do antígeno com relação a região que recebeu o soro de animais do grupo 4x. Entretanto, uma diferença evidente surgiu na PCA avaliada 70 horas após a inoculação do antígeno, sendo que a reação foi mais intensa na região que recebeu soro dos animais do grupo 4x em relação à região que recebeu o soro dos animais do grupo 10x. Não sabemos a razão dessas diferenças, que deverão ser frutos de investigação mais aprofundada no futuro. Observamos também a constante migração de células alérgicas para o local da picada, em especial a população de eosinófilos com importante aumento de citocinas pró-inflamatórias como as que medeiam essa resposta de perfil Th2, como IL-4 e IL-5. Outros resultados se fazem necessários para esclarecer como esta transferência de imunidade para um indivíduo nunca antes exposto permanece diante de uma nova exposição a picadas.

Vários modelos experimentais têm sido utilizados para elucidar o mecanismo de migração celular provocada pela saliva de vetores artrópodes, em especial o tecido da orelha. Em um trabalho publicado por Belkaid e colaboradores (1998), por exemplo, foi demonstrado que camundongos BALB/c e C57BL/6 previamente sensibilizados com a saliva de *Phlebotomus papatasi* e posteriormente desafiados intradermicamente no tecido da orelha com o sonicado de glândulas salivares e formas promatigotas metacíclicas de *Leishmania major,* apresentaram um aumento da migração celular de eosinófilos,

fagócitos mononucleares e neutrófilos para o local da inoculação. Schmid e colaboradores (2016) demonstraram recentemente que a administração do vírus DENV-4 juntamente com componentes salivares de *A. aegypti* na derme, aumentou significativamente a migração celular de monócitos e neutrófilos para o local e para linfonodos drenantes, além de provocar o aumento da permeabilidade vascular endotelial. Em um trabalho desenvolvido em nosso laboratório, observamos que o pico de migração celular ocorre 24h após a picada em animais previamente sensibilizados (HENRIQUE, 2016). Apesar de não termos avaliado tempos mais longos do que 24 horas após a exposição, nossos resultados mostram que nesse período já há uma reação inflamatória robusta, com edema significativo e aumento do número de células, na orelha de animais sensibilizados (Figura 9).

Quando realizamos a imunofenotipagem das populações celulares na orelha de animais sensibilizados e expostos aos mosquitos, percebemos um aumento de todos os tipos celulares avaliados em comparação com as células residentes presentes na orelha de animais *naive* (Figuras 10 e 11). A comparação quantitativa das populações das orelhas dos animais do grupo 4x e 10x evidenciou números semelhantes de macrófagos, mastócitos e linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$. Por outro lado, observamos um número maior de neutrófilos nas orelhas dos animais do grupo 10x, enquanto eosinófilos e linfócitos B estavam reduzidos nesse grupo, quando comparados às células presentes nas orelhas dos animais do grupo 4x. Diversos trabalhos com saliva de artrópodes descritos na literatura demonstraram a importância da migração celular para que haja de fato a infeção viral e sua replicação em células mononucleares residentes na pele (PINGEN et al., 2016; WASINPIYAMONGKOL et al., 2012). Neste sentido, para Schneider et. al. (2010) as principais populações celulares que migram no momento do repasto sanguíneo são de macrófagos e células dendríticas. Neste mesmo trabalho ao avaliar a cinética de migração, observaram que animais que foram expostos tanto a mosquitos infectados com o vírus do Nilo Ocidental quanto a mosquitos não infectados apresentaram um aumento da migração de neutrófilos 24 horas após a picada na pele e nos linfonodos drenantes. Já 48 horas após a picada observaram um aumento de células T na pele e majoritariamente de neutrófilos nos linfonodos drenantes. Estes dados corroboram com os nossos resultados, pois também observamos um aumento de macrófagos, neutrófilos e eosinófilos nos animais expostos 4 e 10 vezes a picadas do mosquito.

O recrutamento de macrófagos para o local da picada permite uma resposta inata imediata que posteriormente ocasiona na infecção do mesmo e de demais células residentes no local do repasto (PINGEN et al., 2016; SCHNEIDER et al., 2010). No nosso modelo, a migração de neutrófilos para o local da picada foi maior no grupo 10x. Pingen e

colaboradores (2016) demonstraram que a inibição da migração de neutrófilos diminui a eficiência da resposta imune inata do hospedeiro após as picadas e, por consequência, reduz a infeção viral, além de ocasionar maior sobrevivência do hospedeiro. Em nosso estudo, observamos também um aumento da migração de eosinófilos tanto no grupo 4x quanto no grupo 10x (Figura 9D). Os eosinófilos fazem parte das populações celulares associadas aos quadros alérgicos decorrentes das picadas de mosquitos hematófagos, (BARROS et al., 2016; CANTILLO et al., 2014; TATSUNO et al., 2016). De acordo com outros trabalhos utilizando componentes salivares na migração celular (BARROS et al., 2016), em teoria, os animais do grupo 4x teriam uma população de eosinófilos maior em relação ao grupo 10x pois neste contexto, estamos trabalhando com uma hipótese de dessensibilização progressiva, fenômeno este objetivado no presente trabalho e que de fato se confirmou. Especulamos que talvez estes animais estejam em processo de dessensibilização e que por isso o desafio com picadas nas orelhas dos animais induziu menor migração de eosinófilos na orelha dos animais do grupo 10x do que do grupo 4x.

Também avaliamos a presença/migração de mastócitos no tecido epitelial da orelha de animais controles e animais dos grupos 4x e 10x. Os mastócitos estão entre as primeiras células do sistema imune a entrar em contato com antígenos exógenos na derme e, durante o repasto sanguíneo, a saliva injetada na pele promove a migração de outros tipos celulares para o local da picada. Nestas condições, os mastócitos têm um papel fundamental, pois, dentro de poucos minutos de exposição, são capazes de desgranular e liberar aminas vasoativas sintetizadas de seus grânulos. Inicia-se, então, a síntese *de novo* de diversos mediadores inflamatórios e, além disso, os receptores de superfície se ligam especificamente com o anticorpo IgE (CANTILLO et al., 2014; HOPP et al., 2015; PENG et al., 2004). Em nosso protocolo de migração celular no tecido da orelha, observamos um discreto aumento da população de mastócitos do grupo 10x em relação ao grupo controle, mas sem diferença estatisticamente significativa. Também analisamos o grupo 4x, este demonstrou maior população de mastócitos quando comparado ao grupo controle, mas também sem diferença estatisticamente significativa.

No que concerne ao mosquito, os machos e as fêmeas do mosquito *A. aegypti* se alimentam de açúcares, principalmente néctar, que servem como fonte de energia para o voo e metabolismo basal, no entanto, este tipo de alimentação contribui pouco para a fertilidade. A fim de realizar a oogênese, as fêmeas dessa espécie de mosquito necessitam de uma dieta rica em proteínas e lipídeos e, para isto, efetuam o respasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado. Neste contexto, embora o *A. aegypti* seja capaz de se alimentar em outras espécies de mamíferos, o homem é o seu hospedeiro preferido (comportamento antropofílico), pois o meio onde vive oferece condições ideais

de proliferação do vetor (MEDLOCK et al., 2015 TALYULI et al., 2015). No entanto, poucos estudos foram realizados para tentar entender a influência que o sistema imune do hospedeiro vertebrado exerce sobre o mosquito e possíveis interferências em suas atividades biológicas como escolha dos hospedeiros e volume de sangue ingerido. Sendo assim alguns estudos trazem apenas estimativas do volume de sangue ingerido, uma vez que a medida precisa seria de difícil realização. Neste sentido, nossos resultados mostraram que num determinado momento, a sensibilização aos componentes salivares do mosquito pode até ajudar na alimentação sanguínea realizada posteriormente nestes mesmos animais, fato este parcialmente observado nos animais expostos 7 vezes. Por outro lado, estes resultados também sugerem que um número maior de exposição aos mosquitos, como visto no grupo de animais expostos 10 vezes, pode gerar uma resposta capaz de atrapalhar o repasto sanguíneo (Figura 12). Assim, o processo de sensibilização parece ser importante para que ocorra um aumento no volume de sangue ingerido, o que poderia interferir diretamente no ciclo biológico do vetor hematófago.

Alguns trabalhos na literatura com vetores artrópodes mostraram que fatores biológicos e ambientais estão envolvidos no repasto sanguíneo como, por exemplo, temperatura, umidade, visão e, principalmente, suor (HAO; SUN; DAI, 2012; MACIEL et al., 2014). Um trabalho realizado previamente em nosso laboratório utilizando camundongos BALB/c (animais de pelagem branca) e C57BL/6 (animais de pelagem escura) como fonte de alimentação demonstrou que mosquitos *A. aegypti* fêmeas possuem uma tendência a escolher os animais de pelagem escura e que, uma vez que o mosquito inicia o repasto, raramente ele muda de um camundongo para outro. Além disso, também mostramos que a presença de azul de Evans na circulação dos animais não afeta a escolha do hospedeiro (MACIEL et al., 2014). A escolha do hospedeiro vertebrado parece ser influenciada também pelo grau de exposições a picadas. Trabalhos na literatura envolvem a atividade comportamental do vetor, entretanto, ainda não há evidências demonstrando que moradores de áreas endêmicas sejam imunologicamente mais atrativos ao mosquito por estarem, teoricamente, dessensibilizadas. No caso dos nossos experimentos, como os animais pareados para a escolha da fonte do repasto foram sempre da linhagem BALB/c e da mesma idade e tamanho aproximados, a única variável a ser comparada era o grau de exposição aos mosquitos. Apesar de termos verificado algumas tendências, nenhuma delas foi estatisticamente significativa (Figura 14), sugerindo que a história imunológica dos camundongos, pelo menos no que se refere ao grau de exposição aos mosquitos, não afeta sua atratividade durante a realização do repasto sanguíneo. Entretanto, observamos que embora haja uma tendência no aumento da ingestão sanguínea em

mosquitos alimentados nestes mesmos animais, a correlação com a oviposição foi negativa até certo ponto (Figura 13). O controle da reprodução do mosquito é importante para que haja menos casos de transmissão viral e diminuição das epidemias de dengue e outras arboviroses pelo mundo (NAGPAL et al., 2016). Conforme os dados apresentados, inferimos que o sistema imune do hospedeiro pode interferir nos hábitos de vida do mosquito, diminuindo sua taxa de oviposição. Entretanto alguns trabalhos anteriores demostraram que a área disponível para a realização da postura de ovos interfere diretamente neste aspecto (GUNATHILAKA et al., 2017). Em nosso protocolo experimental nós buscamos minimizar ao máximo estas variáveis, nele observamos que houve incialmente uma elevada postura de ovos por fêmea e que a partir da 2ª ou 3ª exposição notamos uma redução na postura de ovos proporcional ao número de exposições aproximadamente até a sétima exposição. A partir daí a postura de ovos por fêmea tende a aumentar novamente. Podemos dizer que o grau de exposição a picadas do hospedeiro vertebrado parece interferir diretamente na reprodução do vetor, entretanto vale ressaltar que este fenômeno ocorreu em ambiente controlado. Não se sabe se em um ambiente externo como na natureza este mesmo fenômeno se repetiria. Portanto outros ensaios que mimetizem ao máximo as condições encontradas na natureza se fazem necessários para comprovar se de fato o sistema imune do hospedeiro interfere na reprodução do vetor.

O modelo de inflamação peritoneal aguda é amplamente utilizado para estudos de migração celular, pois, após um estímulo, um grande número de leucócito migram para esse compartimento (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010) Esse perfil de inflamação aguda é ideal para o estudo dos tipos celulares e potenciais mediadores envolvidos nos estágios iniciais da resposta aos componentes salivares do mosquito *A. aegypti* que influenciam no desenvolvimento das respostas futuras, principalmente considerando que o modelo de sensibilização e dessensibilização leva pelo menos 5 meses para ser realizado. A inoculação intraperitoneal repetida do EGS induziu uma resposta inflamatória local caracterizada influxo celular de células mononucleares e eosinófilos, sendo que esta última população aumenta consideravelmente, da mesma forma que foi observado no modelo de exposição crônica aos mosquitos. Além disso, o influxo de eosinófilos induzido pelo EGS está associado ao aumento da produção da IL-5, avaliado no LCP, e a neutralização dessa citocina reduziu sua migração para esse local (Figura 17). Em circunstâncias normais, a migração de eosinófilos é regulada pela expressão constitutiva de eotaxina-1 (CCL11) (MISHRA et al., 1999). Em condições inflamatórias, porém, a IL-5 coopera com as eotaxinas 1, 2 e 3 (CCL11, CCL24 e CCL26) no recrutamento de eosinófilos. E em situações diversas, a migração de eosinófilos também é dependente de

outros mediadores como RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), MIP-1α (CCL3), LTB_4 e cisteinil leucotrienos (CARLOS et al., 2011; CHAN et al., 1990; JOSE et al., 1994; ROTHENBERG; LUSTER; LEDER, 1995) Dessa maneira, decidimos avaliar o papel dos leucotrienos na migração de eosinófilos no modelo de inflamação peritoneal aguda induzida pelo EGS e observamos que animais deficientes da enzima 5-lipoxigenase apresentaram menor migração de eosinófilos no local comparado com os animais selvagens (Figura 18A). A potencial relação entre a produção de leucotrienos e a secreção de IL-5 foi confirmada pela determinação dessa citocina no LCP dos animais. Camundongos ALOX 5 não produzem níveis detectáveis dessa citocina quando inoculados com EGS de *A. aegypti*, ao contrário dos camundongos selvagens (Figura 18B). Analisados em conjunto, nossos resultados mostram fortes evidências da participação da IL-5 e de leucotrienos no recrutamento dos eosinófilos para a cavidade peritoneal no modelo utilizando o EGS do mosquito *A. aegypti*. Porém, a hierarquia na produção desses mediadores e sua importância relativa no modelo continua um tópico em aberto.

Uma série de ligantes de citocinas e de pequenas moléculas, incluindo aminas vasoativas e lipídeos, já foram descritos na saliva de outros artrópodes hematófagos. Existe na saliva do carrapatos moléculas capazes de se ligar ao TNF-α (GILLESPIE et al., 2001; HAJNICKÁ et al., 2001; KONÍK et al., 2006) e quimiocinas (DÉRUAZ et al., 2008; FRAUENSCHUH et al., 2007). A saliva da espécie de barbeiro *Rhodnius prolixus*, contém uma proteína da família das lipocarpinas que sequestra cisteinil leucotrienos durante a alimentação para inibir a resposta inflamatória (JABLONKA et al., 2016). De modo geral, na saliva dos mosquitos nunca foram encontrados ligantes de citocinas, sendo que nosso grupo já testou essa potencial atividade contra IL-5, IL-6, IL-12p40 e IL-12p70 (dados não mostrados). Por outro lado, na saliva de mosquitos estão presentes proteínas da família D7 que também são capazes de se ligar a cisteinil leucotrienos e antagonizar a resposta inflamatória do hospedeiro (CALVO et al., 2009). Czarnetzki e Mertensmeier (1985) mostraram o papel LTB_4 na quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos na cavidade peritoneal em cobaias. Munoz e colaboradores (1997) já haviam mostrado que a inibição seletiva da 5-LO e o bloqueio do receptor de LTB_4 inibem a migração de eosinófilos. Dessa forma, nossos dados sugerem que, pelo menos com relação a migração de eosinófilos, as potenciais moléculas imunorreguladoras e ligantes de leucotrienos presentes na saliva de *A. aegypti* não são suficientes para bloquear a migração dessas células após exposições repetidas aos componentes salivares ou em hospedeiros sensibilizados.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados neste trabalho confirmam que a saliva do mosquito *A. aegypti* é capaz de sensibilizar camundongos, produzindo uma resposta de perfil Th2 forte e persistente. O protocolo de exposição natural mostrou que a picada do mosquito *A. aegypti* provoca um aumento de anticorpos anafiláticos o que é corroborado pelo perfil de citocinas encontrado na cultura de células totais de baços destes animais restimuladas com antígeno. Entretanto, a partir da quinta exposição ocorre um aumento gradual de anticorpos IgG2a, sugerindo uma mudança de perfil de resposta. A migração celular no tecido na orelha destes animais sensibilizados, induzida pela picada do mosquito, revela o acúmulo principalmente da população de células mielóides, com destaque para macrófagos, neutrófilos e eosinófilos. Apesar de os eosinófilos representarem o tipo celular que mais aumenta no tecido durante a fase de sensibilização, houve uma redução dessas células durante a exposição crônica, funcionando como uma espécie de marcador da dessensibilização em conjunto com a IgG2a. Apesar de algumas mudanças no repasto e na oviposição ao longo do tempo, os parâmetros de *fitness* biológicos alimentação e escolha do hospedeiro foram pouco ou não afetados a longo prazo pela resposta do hospedeiro, enquanto a oviposição sofreu interferência negativa nas primeiras exposições, mas em exposições mais tardias teve seus níveis de volta à normalidade. O modelo de inflamação peritoneal aguda induzido pelos componentes salivares também revelou que os eosinófilos são as células que mais migram para esse compartimento e estudos envolvendo bloqueio por anticorpos e camundongos nocautes revelaram a participação da IL-5 e de produtos derivados da 5-lipoxigenase (possivelmente leucotrienos) nessa reação inflamatória.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, D. B. et al. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. **Viral immunol.** v. 17, n. 2, p. 252–265, 2004.

AGARWAL MK et al.,. Etiologic significance of mosquito (*Anopheles stephensi*) in respiratory allergy in India. **Ann. Allergy**, v. 67, p. 598–602, 1991.

AMARASEKERA, M. Immunoglobulin E in health and disease. **Asia Pac. Allergy**, v. 1, p. 12–15, 2011.

ARAÚJO-SANTOS, T. et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E2 production in murine macrophages. **PLoS Negl. Trop Dis.**, v. 4, n. 11, p. 1–9, 2010.

ASSIS, J. B. Imunomodulação da hepatite experimental aguda pela saliva do mosquito *Aedes aegypti*. 2017, Dissertação em andamento – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

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.

BARROS, M. S. Efeitos dos Componentes salivares do mosquito *Aedes aegypti* na biologia de macrófagos e potenciais aplicações terapêuticas. 2017. 105 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2017. p. 2017, 2017.

BELKAID, B. Y. et al. Development of a Natural Model of Cutaneous Leishmaniasis : Powerful Effects of Vector Saliva and Saliva Preexposure on the Long-Term Outcome of Leishmania major Infection in the Mouse Ear Dermis. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 10, p. 1941–1953, 1998.

BENJAMINI, E., FEINGOLD, B. F., KART-MAN, L. Skin reactivity in guinea pigs sensitized to flea bites. The sequence of reactions. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 108, p. 700–702, 1961.

BEZERRA, J. M. T. et al. *Aedes (Stegomyia)* albopictus dynamics influenced by spatiotemporal characteristics in a Brazilian dengue-endemic risk city. **Acta Trop.**, v. 164, p. 431–437, 2016.

BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, D. A. Extracts of mosquito salivary

gland inhibit tumor necrosis factor alpha. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. July, p. 27–33, 1993.

BIZZARRO, B. et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasit Vectors**, v. 6, p. 329, 2013.

BOGOCH, I. I. et al. Potential for Zika virus introduction and transmission in resource limited countries in Africa and Asia-Pacific. **Lancet Infect. Dis.**, v. 3099, n. 16, p. in press, 2016.

BOPPANA, V. D. et al. SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 + T cells to express IL-4. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 6, p. 287–295, 2009.

BORTOLATTO, J. et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: Role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-γ axis. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 10, p. 1668–1679, 2008.

BOYCOTT A E. Sensitisation to insect bites. **Univ. Coll. Hosp. Mag.**, v. 13, p. 200-202, 1928.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saude**, v. 16, n. 4, p. 279–293, 2007.

BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; LAPPALAINEN, P. Clinical aspects of allergic disease Detection of mosquito saliva-specific lgE and IgG4 antibodies by immunoblotting. **J. Allergy Clin. Immunol.,** v. 93, p. 551–555, 1994.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin α2β1,, and von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 26928–26938, 2007.

CALVO, E. et al. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 106, n. 10, p. 3–8, 2009.

CANTILLO, J. F.; FERNANDEZ-CALDAS, E.; PUERTA, L. Immunological aspects of the immune response induced by mosquito allergens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 165, n. 4, p. 271–282, 2014.

CANTOR, A. B. et al. Antagonism of FOG-1 and GATA factors in fate choice for the mast cell lineage. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 3, p. 611–624, 2008.

CARLOS, D. et al. Evidence for eosinophil recruitment, leukotriene B4 production and mast cell hyperplasia following *Toxocara canis* infection in rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 44, n. 4, p. 319–326, 2011.

CARRINGTON, L. B.; CAMERON, P. Human to mosquito transmission of dengue viruses. **Front. Immunol.**, v. 5, n. June, p. 1–8, 2014.

CHAMPAGNE, D. E. et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 3, p. 694–698, 1995.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiol. Haemost.Thromb.**, v. 34, n. 4-5, p. 221–227, 2006.

CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 91, n. 1, p. 138–142, 1994.

CHAN, C. C. et al. Eosinsphil-eicosanoid interactions : inhibition of eosinophil chemotaxis in vivo by a LTD4-receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 191, p. 273–280, 1990.

CHEN, Y. L.; SIMONS, F. E. R.; PENG, Z. A mouse model of mosquito allergy for study of antigen -specific ige and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and IFN-γ production. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 116, n. 4, p. 269–277, 1998.

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti* (L.). The Yellow Fever Mosquito , **Cambridge University Press**, London, v. 739, p. 739, 1960.

CROSS, M. L.; CUPP, E. W.; ENRIQUEZ, F. J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, n. 5, p. 690–696, 1994.

CZARNETZKI, B. M.; MERTENSMEIER, R. *In vitro* and *in vivo* chemotaxis of guinea pig leukocytes toward Leucotriene B4 and its w-oxidtion products. **Prostaglandins**, v. 30, n. 1, p. 5–11, 1985.

DÉRUAZ, M. et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 9, p. 2019–2031, 2008.

DOUCOURE, S. et al. Human antibody response to *Aedes aegypti* saliva in an urban population in Bolivia : A new biomarker of exposure to Dengue Vector Bites. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 87, n. 3, p. 504–510, 2012.

ENGLER RJ. Mosquito bite pathogenesis in necrotic skin reactors; **Curr Opin Allergy Clin Immunol**, p. 349 – 352, 2001.

FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L. Marrow To Blood and Tissues in a. **Mediators of Inflamm.**, v. 31, p. 24–31, 1996.

FAQUIM-MAURO, E. L. et al. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572–3576, 1999.

FEINGOLD, B. E. N. F.; BENJAMIN, E.; MICHAELI, D. The allergic responses to insect bites. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 13, p. 137–158, 1968.

FLORSHEIM, E. et al. Integrated innate mechanisms involved in airway allergic inflammation to the serine protease subtilisin. **J. Immunol.**, v. 194, n. 10, p. 4621–30, 2015.

FONTAINE, A. et al. Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. **Parasit. Vectors**, v. 4, n. 1, p. 187, 2011a.

FONTAINE, A. et al. Mosquito salivary gland protein preservation in the field for immunological and biochemical analysis. **Parasit. Vectors**, v. 4, n. 1, p. 33, 2011b.

FORATTINI, O. P. Culicidologia medica. São Paulo: **EDUSP**. v. 2, p. 548, 2002.

FRAUENSCHUH, A. et al. Molecular cloning and characterization of a highly selective chemokine-binding protein from the tick rhipicephalus sanguineus. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 27250–27258, 2007.

GILLESPIE, R. D. et al. Identification of an IL-2 Binding protein in the saliva of the lyme disease vector tick, *Ixodes scapularis*. **J. Immunol.**, v. 166, n. 7, p. 4319–4326, 2001.

GONZALEZ DIAZ SN, et al. Prevalence of reactions secondary to the mosquito bites of Aedes aegypti at The Regional Center of Allergy and Clinical Immunology, University Hospital, de Monterrey, Nuevo Leon. **Rev Alerg Mex**, v. 57, p. 37–43, 2010.

GORDON RM. The susceptibility of the individual to the bites of *Stegomyia calopus*. **Annu. Trop. Med. Parasitol**, v. 16, p. 229 – 234, 1922.

GUBLER, D. J. The global emergence / resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch. Med. Res.,** v. 33, p. 330–342, 2002.

GUNATHILAKA, N. et al. Oviposition preferences of dengue vectors ; *Aedes aegypti* and

Aedes albopictus in Sri Lanka under laboratory settings. **Bull. Entomol. Res.,** p. 1-9, 2017.

HAJNICKÁ, V. et al. Anti-interleukin-8 activity of tick salivary gland extracts. **Parasite Immunol.**, v. 23, n. 9, p. 483–489, 2001.

HAO, H.; SUN, J.; DAI, J. Preliminary analysis of several attractants and spatial repellents for the mosquito, *Aedes albopictus* using an olfactometer. **J. Insect Sci.**, v. 12, n. 76, p. 76, 2012.

HEILESEN, B. Studies on Mosquito Bites. **Acta Allergol.**, v. 2, n. 3, p. 245–267, 1949.

HENRIQUE, M. O. Reação eosinofílica cutânea decorrente dos componentes salivares do mosquito Aedes aegypti: caracterização do infiltrado inflamatório**.**, 2016. 92f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

HOPP, C. S.; SINNIS, P. The innate and adaptive response to mosquito saliva and Plasmodium sporozoites in the skin. **Ann. NY Acad. Sci.**, v. 1342, n. 1, p. 37–43, 2015.

HUDSON, A. BOWMAN, L. O. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. **Science**, n. 1730–1731, p. 3415, 1960.

JABLONKA, W. et al. Structure and ligand-binding mechanism of a cysteinyl leukotriene-binding protein from a blood-feeding disease vector. **ACS Chem Biol.**, v. 11, n. 7, p. 1934–1944, 2016.

JOSE, P. J. et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 179, n. 3, p. 881–7, 1994.

JOSEPHS, D. H. et al. IgE immunotherapy: a novel concept with promise for the treatment of cancer. **mAbs**, v. 6, n. 1, p. 54–72, 2014.

KONÍK, P. et al. Anti-tumour necrosis factor-α activity in *Ixodes ricinus* saliva. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 12, p. 649–656, 2006.

KULTHANAN, K.; WONGKAMCHAI, S. Mosquito allergy : Clinical features and natural course. **J. Dermatol.** , v. 37, p. 1025–1031, 2010.

LARA, P. G. AeMOPE – 1: um novo peptídeo imunomodulador salivar de Aedes aegypti com potencial terapêutico na colite experimental. 2017. 121 f. Tese (Doutorado em

Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017. p. 2017, 2017.

LARRIVEE, D. H., BENJAMINI, E., FEINGOLD, B.F., SHIMIZU, M. Histologic studies of guinea pig skin: diferent stages of allergic reactivity to flea bites. **Exptl. Parasitol**, v. 15, p. 491 – 502, 1964.

LINO, C. N. R. Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de Aedes aegypti . 2013.79f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013. p. 79, 2013.

LONDONO-RENTERIA, B. et al. Use of anti-*Aedes aegypti* salivary extract antibody concentration to correlate risk of vector exposure and dengue transmission risk in Colombia. **PloS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81211, 2013.

LÓPEZ, M. C.; PALMER, B. E.; LAWRENCE, D. A. Phenotypic differences between cord blood and adult peripheral blood. **Cytometry B - Clin. Cytom.**, v. 76, n. 1, p. 37–46, 2009.

LUNA-GOMES, T.; BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Eosinophil recruitment and activation: The role of lipid mediators. **Front. Pharmacol.**, v. 4, p. 1–8, 2013.

MACIEL, C. et al. Evans Blue as a Simple Method to Discriminate Mosquitoes' Feeding Choice on Small Laboratory Animals. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110551, 2014.

MCKIEL, J. A. Reactions to mosquito bites. Studies of causation and remedial measures. **(Doctoral thesis, Queen´s Univ. Kingston, Ontario)**, 1955.

MCKIEL, J. A. Sensitization to mosquito bites. **Can. J. Zool**, v. 37, p. 341–351, 1959.

MEDLOCK, J. M. et al. An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. **Bull. Entomol. Res.**, p. 1–27, 2015.

MELLANBY, K. Man's reaction to mosquito bites. **Nature**, v. 158, n. 4016, p. 554, 1946.

MISHRA, A. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 12, p. 1719–27, 1999.

MUNOZ, N. M. et al. Eosinophil Chemotaxis Inhibited by 5-Lipoxy ~ enase Blockade and Leukotriene Receptor Antagonism. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, p. 1398–1403, 1997.

NAGPAL, B. N. et al. Control of *Aedes aegypti* breeding: A novel intervention for

prevention and control of dengue in an endemic zone of Delhi, India. **PLoS ONE**, v. 11, n. 12, p. 1–11, 2016.

NDILLE, E. E. et al. First attempt to validate human IgG antibody response to nterm-34k Da salivary peptide as biomarker for evaluating exposure to *Aedes aegypti* Bites. **PLoS Negl. Trop. Dis.,** v. 6, n. 11, p. 2–8, 2012.

ORLANDI-PRADINES, E. et al. Relationship between exposure to vector bites and antibody responses to mosquito salivary gland extracts. **PLoS One,** v. 6, n. 12, 2011.

PENG, Z. et al. Expression, purification, characterization and clinical relevance of rAed a 1--a 68-kDa recombinant mosquito *Aedes aegypti* salivary allergen. **Int. Immunol.**, v. 13, n. 12, p. 1445–52, 2001.

PENG, Z. et al. Mosquito saliva-specific IgE and IgG antibodies in 1059 blood donors . **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 110, n. 5, p. 816–817, 2002.

PENG, Z. et al. Evidence for natural desensitization to mosquito salivary allergens: mosquito saliva specific IgE and IgG levels in children. **Ann Allergy Asthma Immunol**, v. 93, n. 6, p. 553–556, 2004.

PENG, Z. et al. A new recombinant mosquito salivary allergen, rAed a 2: allergenicity, clinical relevance, and cross-reactivity. **Allergy**, v. 61, n. 4, p. 485–90, abr. 2006.

PENG, Z. et al. Mosquito salivary allergen Aed a 3: Cloning, comprehensive molecular analysis, and clinical evaluation. **Eur. J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 71, n. 5, p. 621–628, 2016.

PENG, Z.; SIMONS, F. E. R. A prospective study of naturally acquired sensitization and subsequent desensitization to mosquito bites and concurrent antibody responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101, n. 2 I, p. 284–286, 1998.

PENG, Z.; SIMONS, F. E. R. Mosquito Allergy: Immune Mechanisms and Recombinant Salivary Allergens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, n. 2, p. 198–209, 2004.

PENG, Z.; YANG, M.; SIMONS, F. E. Immunologic mechanisms in mosquito allergy: correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 77, n. 3, p. 238–44, 1996.

PINGEN, M. et al. Host inflammatory response to mosquito bites enhances the severity of arbovirus infection. **Immunity**, v. 44, n. 6, p. 1455–1469, 2016.

PRIESNER, C. et al. Comparative analysis of clinical-scale IFN-γ-Positive T-Cell enrichment using partially and fully integrated platforms. **Front. Immunol.**, v. 7, p. 1–12, 2016.

RAMOS, A. D. Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato da glândula salivar de Aedes aegypti . 103f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo – São Paulo, 2014. p. 103, [s.d.].

REDINGTON, B. C.; HOCKMEYER, W. T. A method for estimating blood meal volume in Aedes aegypti using a radioisotope. **J. Insect Physiol.**, v. 22, n. 7, p. 961–966, 1976.

REMOUE, F. et al. Evaluation of the antibody response to *Anopheles* salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 100, n. 4, p. 363–70, 2006.

RENO, H. E.; NOVAK, R. J. Characterization of apyrase-like activity in Ochlerotatus triseriatus, Ochlerotatus hendersoni, and Aedes aegypti. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 3, p. 541–545, 2005.

RIBEIRO, J. M. C. et al. Salivary apyrase of *Aedes Aegypti*: Characterization and secretory fate. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry and**, v. 79, n. 1, p. 81–86, 1984.

RIBEIRO, J. M. C. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Ann. Rev. Entomol.,** v. 32, n. 92, p. 463- 478, 1987.

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. Blood-feeding in mosquitoes : probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes, Anopheles, Culex*). **Med. Vet. Entomol.**, v. 2, p. 142–148, 2000.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. Role of arthropods saliva in blood feeding : Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 48, n. 1, p. 73–88, 2003.

ROGERIO, A. P.; SA-NUNES, A.; FACCIOLI, L. H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. **Pharmacol. Res.**, v. 62, n. 4, p. 298–307, 2010.

ROTHENBERG, M. E.; LUSTER, A D.; LEDER, P. Murine eotaxin: an eosinophil

chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, n. 19, p. 8960–4, 1995.

SALES-CAMPOS, H. et al. Aedes aegypti salivary gland extract ameliorates experimental inflammatory bowel disease. **Inter. Immunopharmacol.**, v. 26, n. 1, p. 13–22, 2015.

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, 2016.

SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* Salivary Gland Extracts Modulate Anti-Viral and TH1/TH2 Cytokine Responses to Sindbis Virus Infection. **Viral Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 565–573, 2004.

SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **PLoS One**, v. 5, n. 7, 2010.

SIMONS, F. E. R.; PENG, Z. Skeeter syndrome. **J. Allergy Clin. Immunol.,** v. 104, n. 3, p. 705–707, 1999.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti.* **Exp. Parasitol.**, n. 81, p. 321-331, 1995.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 33, p. 20802–20809, 1998.

STARKL P., et al.,. IgE Antibodies, FceRI and IgE - mediated local anaphylaxis can limit snake venom toxicity. **J. Allergy Clin Immunol**, v. 137, n. 2, p. 246–257, 2016.

TALYULI, O. A. C. et al. The use of a chemically defined artificial diet as a tool to study Aedes aegypti physiology. **J. Insect Physiol.**, v. 83, p. 1–7, 2015.

TATSUNO, K. et al. Clinical categories of exaggerated skin reactions to mosquito bites and their pathophysiology. **J. Dermatol. Sci.**, v. 82, n. 3, p. 145–152, 2016.

TITUS, R. G.; BISHOP, J. V.; MEJIA, J. S. The immunomodulatory factors of arthropod saliva and the potential for these factors to serve as vaccine targets to prevent pathogen transmission. **Parasite Immunol.**, v. 28, n. 4, p. 131–141, 2006.

WAITAYAKUL, A. et al. Natural human humoral response to salivary gland proteins of

Anopheles mosquitoes in Thailand. **Acta Trop.**, v. 98, n. 1, p. 66–73, abr. 2006.

WANASEN, N. et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes Aedes aegypti and Culex quinquefasciatus. **Med. Vet. Entomol.**, p. 191–199, 2004.

WASINPIYAMONGKOL, L.; PATRAMOOL, S.; THONGRUNGKIAT, S. Dengue-infected *Aedes aegypti* mosquitoes and blood-feeding success. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health.,** v. 43, n. 6, 2012.

WASSERMAN, H. A; SINGH, S.; CHAMPAGNE, D. E. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti,* modulates murine lymphocyte function. **Parasite Immunol,** v. 26, n. September, p. 295–306, 2004.

WATANABE, R. M. O. et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypt*i with thrombin coagulant inhibitory activity. **Biochimie**, v. 92, n. 8, p. 933–939, 2010.

WATANABE, R. M. O. et al. Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 618–623, 2011.

ZEIDNER, N. S. et al. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: An effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. **Parasite Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 35–44, 1999.

8. APÊNDICE

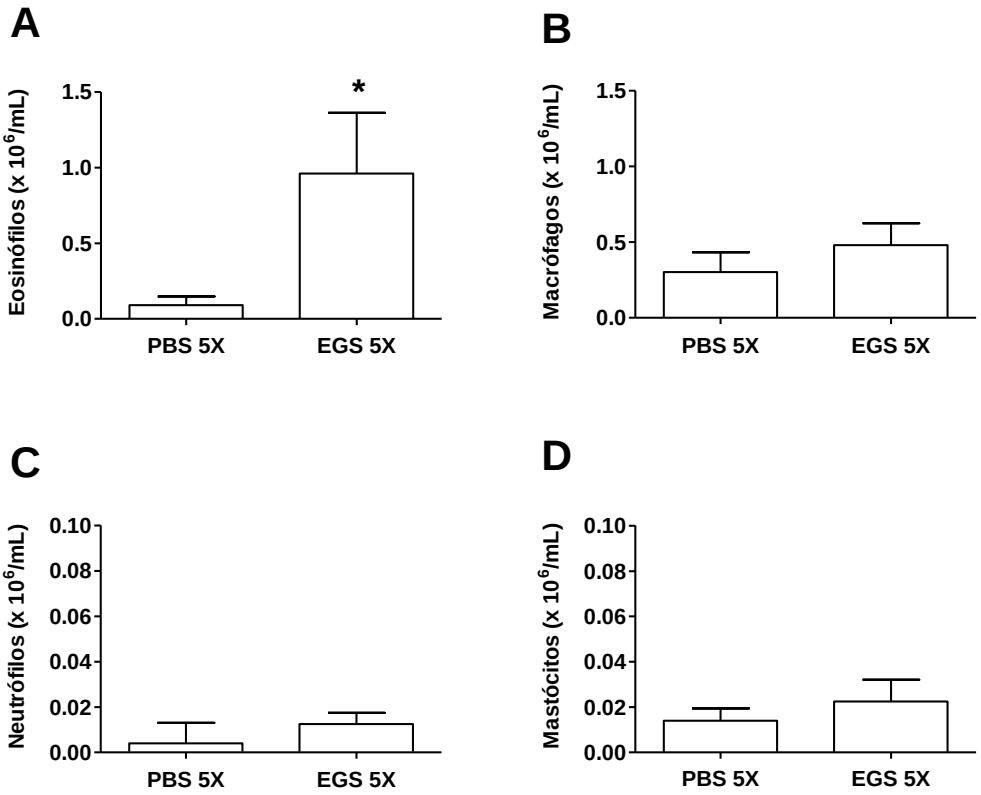

Figura Suplementar 1. Imunofenotipagem de populações mieloides da cavidade peritoneal de camundongos inoculados com PBS ou EGS de *A. aegypti*. Camundongos BALB/c receberam PBS e EGS (10 µg) intraperitonealmente, por 5 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última inoculação, os animais foram eutanasiados e as células do LCP foram incubadas com os anticorpos anti-F4/80, anti-Siglec-F, anti-CD11b, anti-CD117 e anti-FcεRI (conforme Material e Métodos). Em seguida as amostras foram analisadas por citometria de fluxo para identificação das populações celulares indicadas. *$p \leq 0,05$ em relação ao controle (grupo "PBS 5X").