BRUNA BIZZARRO

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFUNCIONAL DE UM INIBIDOR DE LINFÓCITOS PRESENTE NA SALIVA DE *Aedes aegypti*

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

São Paulo
2016

BRUNA BIZZARRO

CARACTERIZAÇÃO IMUNOFUNCIONAL DE UM INIBIDOR DE LINFÓCITOS PRESENTE NA SALIVA DE *Aedes aegypti*

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Versão Corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na biblioteca do ICB quanto na Bioblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

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)

Bizzarro, Bruna
Caracterização imunofuncional de um inibidor de linfócitos presente na saliva de Aedes aegypti / Bruna Bizzarro; orientador Anderson Sá-Nunes. -- São Paulo, 2016.
102 p.

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

1. Aedes aegypti. 2. Extrato da glândula salivar. 3. Linfócitos. 4. Morte celular. 5. Imunomodulação. I. Sá-Nunes, Anderson , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Bizzarro

Título da Tese: Caracterização imunofuncional de um inibidor de linfócitos presente na saliva de *Aedes aegypti*

Orientador(a): Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

Decl. CEUA.028/10

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 091/09/CEUA, datado de 01.07.09 e por solicitação da Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, responsável pela linha de Pesquisa, autorizo a inclusão da aluna **Bruna Bizzarro** ao projeto de pesquisa *"Imunoma funcional da saliva de Aedes aegypti"*, uma vez que se trata de utilização da mesma espécie animal e de métodos experimentais similares ao referido certificado.

São Paulo, 08 de junho de 2010.

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que a solicitação de licença de uso de animais intitulada "***Imunoma funcional das moléculas salivares e intestinais de artrópodes hematófagos.***", registrada sob **nº 55**, nas fls. 32, do livro 3, foi analisada e aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-ICB/USP) em 01/06/2015.

Por esta licença, estão autorizados a manipular animais dentro dos limites do projeto proposto e no âmbito da Lei Federal nº 11.794, o Dr.(Dra.) ***Anderson de Sá Nunes*** (Investigador Principal) e os membros da equipe *Bruna Bizzarro, Michele da Silva Barros, Priscila Guirão Lara, Leila Santos Neto, Maressa de Oliveira Henrique, Mariana Hayashi Garcia, Eliane Virginia da Silvia Esteves,* ***Estagiário*** *Josiane Betim de Assis.* Esta licença de uso de animais expira em 01 / 06 / 2019.

Havendo interesse na renovação da proposta, a solicitação deverá ser protocolada pela secretaria da CEUA-ICB/USP *até o último dia de validade da atual proposta*. Após essa data, uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that permission for the use of animals was granted to the research proposal "***Functional immunome of salivary and intestinal molecules from hematophagous arthropods.***", registered as **Number 55**, in pages 32, of book 3, by the local ETHICS COMMITTEE ON THE USE OF ANIMALS (CEUA-ICB/USP) in 6/1/2015.

Under this license, ***Anderson de Sá Nunes*** (Principal Investigator) and team members Bruna Bizzarro, Michele da Silva Barros, Priscila Guirão Lara, Leila Santos Neto, Maressa de Oliveira Henrique, Mariana Hayashi Garcia, Eliane Virginia da Silvia Esteves, **Estagiário** Josiane Betim de Assis are authorized to make use of animals within the limits of the research proposal presented to this committee and of the Brazilian Federal Law nº 11.794.

This license expires in 06 / 01 / 2019. In case the investigators wish to renew this license, this must be presented to CEUA-ICB/USP before the last day of validity of the present license. After such date, a new research proposal must be presented.

São Paulo, 19 de junho de 2015.

Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Profa. Dra. Ana Paula Lepique
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedico este trabalho ao meu orientador Dr. Anderson de Sá Nunes, responsável pela minha formação científica. Aos meus pais Antonio e Lia pelo constante incentivo. Ao André pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço ao Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes pela oportunidade de realizar o Doutorado em seu laboratório, por permitir que eu desenvolvesse um projeto sob sua orientação e por compartilhar seus conhecimentos, conselhos e experiência, sempre se preocupando e me orientando não apenas nos projetos e experimentos mas também me preparando para a vida profissional. Obrigada pelo incentivo constante e por me conceder inúmeras oportunidades e desafios durante todos esses anos no Laboratório de Imunologia Experimental, que foram essenciais para o meu desenvolvimento e formação. Entrei no LIE sem saber nada, nem pipetar, e posso garantir que aprendi e amadureci muito após todos esses anos sob sua orientação. Espero que um dia eu seja para alguém o exemplo de profissional que você foi e ainda é para mim.

Agradeço aos meus pais pelo incentivo, confiança e apoio em todos os momentos. Pelo aprendizado diário de como ser uma pessoa melhor e pelo exemplo de pessoas batalhadoras que me inspiraram a vida inteira.

Ao André por sempre apoiar as minhas decisões e me incentivar a buscar o melhor para minha carreira, mesmo quando minhas escolhas profissionais exigiam que eu me afastasse em datas especiais ou por longos períodos de tempo. Obrigada por continuar sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso. Obrigada pelas conversas, pela paciência e por ouvir meus desabafos. Seu companheirismo é o meu pilar de sustentação e é o que me faz crescer cada vez mais.

À minha avó Alzira por todo amor e por todas as orações em meu favor e ao meu avô Nino (*in memoriam)*, por sempre iluminar o meu caminho. Ao meu avô Cardoso e sua esposa Elza pelo carinho e apoio. Aos meus irmãos Marcus e Paulo e minhas cunhadas Camilla e Marcela por me apoiarem sempre e por vibrarem com as minhas conquistas. Agradeço aos meus sogros Gelson e Fátima pelo carinho, por todos os conselhos, por me acolherem em suas vidas como parte de sua família e por sempre torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço a Karen e a Jubs, duas irmãs que a vida me deu para alegrar os meus dias e pra ter sempre com quem contar.

Aos membros do Laboratório de Imunologia Experimental Eliane, Priscila, Michele, Maressa, Leila, Mariana, Josiane e Marcelo pela ajuda nos experimentos e

pelo aprendizado compartilhado. O nosso convívio diário me trouxe muita maturidade e crescimento pessoal e profissional.

Agradeço em especial aos amigos que marcaram essa fase com muita risada, companheirismo e diversão: Sócia, Caio, Elaine, Rafa, Eliane, Priscila, Marcelo, Ciro e todos aqueles que tive a oportunidade de compartilhar um pouco das alegrias, tristezas, frustrações, perrengues, e todas as experiências vividas na Pós-Graduação, como as “sofridas” disciplinas, encontros da Pós, PAEs, congressos, organização do curso de férias, happy hours no manequinho, casa do Norte, Dueto, C.A. da Bio, churrascos e outros eventos que com certeza foram muito mais interessantes na companhia de vocês.

À técnica Sandra Alexandre Alves, por toda a ajuda na preparação dos materiais para os experimentos e por manter sempre a ordem no laboratório. A sua ajuda foi de grande importância no desenvolvimento desse trabalho.

Aos professores Dr. Momtchilo Russo, Dra. Sônia Jancar e Dra. Ana Paula Lepique do Departamento de Imunologia do ICB/USP por muitas vezes compartilhar materiais, reagentes e equipamentos de seus laboratórios. À todos os professores do Programa Pós-graduação em Imunologia do ICB/USP que eu tive a oportunidade e o prazer de discutir imunologia e assistir as aulas ministradas que foram essenciais para o meu desenvolvimento intelectual.

Ao Prof. João Gustavo Pessini Amarante-Mendes e suas alunas Júlia Campopiano, Luciana Medina e Nathalia Cruz de Victo, do Departamento de Imunologia do ICB/USP, por toda a ajuda com os experimentos de apoptose.

À Dra. Ana Paula Lepique, Dr. Rafael Ribeiro Almeida e à Dra. Andrea Cristina Fogaça pelas excelentes discussões e sugestões durante meu exame de qualificação.

Aos secretários do Departamento de Imunologia, Maria Eni do Sacramento Santos e João Pinheiro por toda a ajuda e paciência na resolução das questões burocráticas. À Jotelma Leite Ribeiro, secretária do Departamento de Imunologia e à Amanda de Souza, Gerente de projetos do mesmo departamento pelo suporte institucional. Aos funcionários do Biotério, em especial à Silvia Maria Gomes Massironi, Rosalia Regina de Luca, Márcio Augusto C. R. de Carvalho e todos os outros que foram fundamentais para realização desse trabalho.

À Prof. Dra. Maria Regina D'Imperio Lima do Departamento de Imunologia do ICB, por nos ceder células nocautes para P2x7 e seus alunos Renan Siqueira e Erika Salles pela ajuda com os experimentos de influxo de cálcio e poro celular.

Aos professores do Departamento de Parasitologia do ICB/USP: Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro por gentilmente ceder os mosquitos *Aedes aegypti;* Dra. Andrea Fogaça pelo auxílio nos experimentos de RNA de interferência; Dr. Mauro Cortez pela ajuda com os experimentos de microscopia de fluorescência; Dra. Silvia Beatriz Boscardin e o técnico Marcio Massao Yamamoto pela ajuda com a purificação dos anticorpos monoclonais.

Ao Dr. Pedro Ismael do Laboratório Especial de Toxicologia Aplicada do Instituto Butantan pelo auxilio com o fracionamento do EGS bruto por HPLC.

Ao Dr. Juliano Bordignon e Dr. Diogo Kucsera pela produção dos hibridomas para obtenção de anticorpos monoclonais.

Ao Dr. José Marcos Ribeiro e Dr. Eric Calvo do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health por me receberem no Laboratory of Malaria and Vector Research, por me auxiliar nos experimentos de biologia molecular e pelas discussões dos resultados que foram essenciais para o fechamento do meu trabalho. Aos amigos que fiz durante esse estágio e que foram essenciais para minha adaptação: Lais, Willy, Antonio, Jose, Regiane, Fernanda, Salvo, Vesna, Gordana, Lidja, Tania e Alber. Vocês foram minha segunda família e estarão para sempre em meu coração. *(I would like to acknowledge all the friends I made during this internship and were essential to my adaptation: Lais Willy, Antonio, Jose, Regiane, Fernanda, Salvo, Vesna, Gordana, Lidja, Tania and Alber. You were my second family and I will keep you forever in my hearth).*

Muitas outras pessoas participaram desse trabalho direta ou indiretamente, portanto, agradeço a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para mais essa conquista.

Obrigado a todos!

Este trabalho foi realizado com o apoio da

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

BIZZARRO, B. **Caracterização imunofuncional de um inibidor de linfócitos presente na saliva de *Aedes aegypti*.** 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Artrópodes hematófagos utilizam o sangue de hospedeiros vertebrados como a sua principal fonte de alimentação, uma vez que o repasto sanguíneo é necessário para a maturação dos ovários das fêmeas dessas espécies. Para obter a ingestão adequada de sangue, esses organismos precisam enfrentar o sistema hemostático e o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Como a saliva desses artrópodes é o elemento de interação entre o vetor e o hospedeiro vertebrado, a elucidação de sua composição e de suas atividades biológicas é essencial para entender as interações envolvidas no processo de hematofagia. No presente trabalho, descrevemos a indução de morte celular seletiva para linfócitos causada pela saliva do mosquito *Aedes aegypti*. Essa atividade é caracterizada pela rápida exposição de fosfatidilserina, incorporação de iodeto de propídio, diminuição do tamanho celular, perda da expressão de CD62L e seletividade para linfócitos *naïve*, não afetando linfócitos ativados/memória e nem células dendríticas. Além disso, essa atividade é mais potente em linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ do que em linfócitos B. Para identificar a molécula responsável por essa atividade, fracionamos o extrato da glândula salivar (EGS) do mosquito por HPLC e analisamos as frações ativas por espectrometria de massas. A análise diferencial das frações por bioinformática identificou como possível candidato, o transcrito AAEL003655 cujo produto tem massa molecular esperada de 338.16 kDa. Mostramos que esse transcrito está abundantemente expresso em glândulas salivares de *A. aegypti* fêmeas mas não de machos, sugerindo sua participação no repasto sanguíneo. RNA de interferência foi utilizado para silenciar o gene responsável por essa atividade em fêmeas de *A. aegypti* e o EGS desses mosquitos perdeu a capacidade de induzir a morte de linfócitos, confirmando que essa é a molécula responsável pela atividade inibidora observada na saliva desse vetor. Em conclusão, esse trabalho identifica uma nova molécula presente na saliva de *A. aegypti* com atividade seletiva sobre linfócitos e potenciais implicações para o entendimento da biologia do mosquito e em sua interação com o hospedeiro vertebrado.

Palavras-chave: *Aedes aegypti.* Extrato da glândula salivar. Linfócitos. Morte celular. Imunomodulação.

ABSTRACT

BIZZARRO, B. **Immunofunctional characterization of a lymphocyte inhibitor from *Aedes aegypti* saliva.** 2016. 102 p. Ph. D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Hematophagous arthropods use blood from vertebrate hosts as their main source of nutrition, since the blood meal is necessary for ovary maturation of this species' females. In order to nourish themselves, these organisms need to counteract the hemostatic system and the immune system of their vertebrate hosts. Because saliva of these arthropods is the key element of interaction between the vector and the vertebrate host, the elucidation of its composition and its biological activities is essential to understand the interactions involved in the process of hematophagy. In the present work, we described the induction of cell death selective for lymphocytes caused by the saliva of *Aedes aegypti* mosquito. This activity is characterized by fast exposure of phosphatydilserine, incorporation of propidium iodide, cell shrinkage, loss of CD62L expression, and selectivity for *naïve* lymphocytes, but no effect on activated/memory lymphocytes or dendritic cells. Moreover, this activity is more potent in $CD4^+$ and $CD8^+$ T cells than in B lymphocytes. To identify the molecule responsible for this activity, we fractionated the mosquito's salivary gland extract (SGE) by HPLC and analyzed the active fractions by mass spectrometry. Differential bioinformatics analyses of the fractions identified as the putative candidate, the transcript AAEL003655 that presents a molecular mass of 338.16 kDa. We demonstrated that this transcript is abundantly expressed in salivary glands of *A. aegypti* females but not of males, suggesting a role in blood-feeding. RNA interference was employed to silence the gene responsible for this activity in *A. aegypti* females and the SGE of these mosquitoes lost the ability to induce lymphocyte death, confirming that this is the molecule responsible for the inhibitory activity observed in the saliva of the vector. In conclusion, this work identifies a new molecule from *A. aegypti* saliva with selective activity on lymphocytes and potential implications for the understanding of mosquito biology and its interaction with vertebrate host.

Keywords: *Aedes aegypti.* Salivary gland extract. Lymphocytes. Cell death. Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Morte celular de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*..... 40

Figura 2 - Morte celular da populações P1 e P2 provenientes de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*..... 42

Figura 3 - Frequência das populações $CD3^+$ e $CD19^+$ provenientes de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*..... 44

Figura 4 - Efeito diferencial do EGS de *A. aegypti* nas diferentes populações de linfócitos de baço..... 45

Figura 5 - Indução diferencial de morte em células de baço não ativadas e ativadas pelo EGS de *A. aegypti* 46

Figura 6 - Expressão de CD62L e CD44 após incubação com EGS de *A. aegypti*..... 47

Figura 7 - Efeito diferencial do EGS de *A. aegypti* nas diferentes células do sistema imune..... 49

Figura 8 - Avaliação da ativação de caspases nas células incubadas com EGS de *A. aedgypi*..... 51

Figura 9 - Controle do inibidor de caspases..... 52

Figura 10 - Fracionamento do EGS de *A. aegypti* por HPLC e avaliação da proliferação de linfócitos induzida por Con A na presença de cada fração..... 55

Figura 11 - Abundância relativa das proteínas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 mostradas em vermelho na Figura 10, determinadas por espectrometria de massas..... 56

Figura 12 - Abundância relativa das proteínas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 mostradas em azul na Figura 10, determinadas por espectrometria de massas..... 57

Figura 13 - Organização genômica do transcrito AAEL003655..... 60

Figura 14 - Teste de reconhecimento dos anticorpos contra a Proteína Recombinante 1.. 61

Figura 15 - Teste de reconhecimento dos anticorpos contra a Proteína Recombinante 2.. 62

Figura 16 - Teste de proliferação de linfócitos com a PR2..... 63

Figura 17 - Determinação dos anticorpos no soro de camundongos imunizados e neutralização da atividade utilizando o soro imune..... 66

Figura 18 - Reconhecimento do EGS pelos anticorpos monoclonais..... 67

Figura 19 - Ensaio de neutralização da atividade..... 68

Figura 20 - Avaliação da expressão gênica dos mosquitos injetados com dsRNA..... 70

Figura 21 - Bloqueio da atividade citotóxica contra linfócitos T $CD4^+$ no EGS de *A. aegypti* por RNAi 71

Figura 22 - Expressão do transcrito AAEL003655..... 73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ac1, Ac2, Ac5 – Anticorpo monoclonal 1, ...2, ...5

ADP – Adenosina Difosfato

AeTI – "A. aegypti *trombin inhibitor"*

AFXa – *"Anticoagulant-Factor Xa"*

APC – Células apresentadoras de antígenos

ATP – Adenosina Trifosfato

CD4, CD8, CD19 – Grupo de diferenciação 4,... 8,... 19

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Con A – Concanavalina A

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

D.O. – Densidade Ótica

DAPI – 4', 6-diamino-2phenylidole

DEPC – H_2O tratada com dietilpirocarbonato

DNA – ácido desoxirribonucleico

dsRNA – "*double stranded RNA"*

ECL – *"Enhanced chemiluminescence"*

EGS – Extrato da glândula salivar

ELISA – "*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*"

FACS – *"Fluorescence Activated Cell Sorter"*

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FSC – *"Forward Scatter"*

GM-CSF – Fator estimulador de colônias para granulócitos e macrófagos

HPLC – *"High Performance/Pressure Liquid Chromatography*"

HRP – *"Horseradish Peroxidase"*

ICB/USP – Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo

ICC – Instituto Carlos Chagas

IFN-α/ IFN-β/ IFN-γ – Interferon-alfa, ...-beta. ...gama

IL-2, IL-4, IL5 - Interleucina-2,...-4,...-5

MHC – Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II

NCBI – *"National center for Biotechnology Information"*

NIAD/NIH – *"National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institutes of Health"*

PBS – Salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia de polimerase

PI – Iodeto de Propídeo

PR1, PR2 – Proteína Recombinante 1, ...2

qPCR – Reação em cadeia de polimerase quantificativa

RACE – *"Rapid Amplification cDNA Ends"*

RNA – Ácido ribonucleico

RNAi – RNA de interferência

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório

SDS-PAGE – dodecil-sulfato de sódio (SDS) de poliacrilamida (PAGE)

SFB – Soro Fetal Bovino

SSC- *"Side Scatter"*

TBST – Tampão salino Tris contendo Tween-20

TCR – Receptor de Células T

TGF-β – *"Transforming growth fator-beta"*

Th1, Th2, Th17 – Linfócitos T "helper" 1, ...2, ...17

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF-α – Fator de necrose tumoral-alfa

Treg – Células T reguladoras

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 18
1.1 *Aedes aegypti* 18
1.2 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos na hemostasia do hospedeiro 19
1.3 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos no sistema imune do hospedeiro 20
1.4 Efeito da saliva do *A. aegypti* em linfócitos e a importância dessas células no sistema imune do hospedeiro 22

2 OBJETIVOS 25

3 MATERIAL E MÉTODOS 26
3.1 Animais 26
3.2 Extrato da glândula salivar (EGS) 26
3.3 Preparação das células do baço 27
3.4 Avaliação da morte celular em linfócitos do baço 27
3.5 Enriquecimento das populações celulares $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$ 28
3.6 Avaliação da morte celular em linfócitos ativados 28
3.7 Preparação das células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC) 29
3.8 Fracionamento do EGS por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) 29
3.9 Extensão da sequência de interesse e análise de bioinformática 30
3.10 Expressão das proteínas recombinantes 31
3.11 Produção dos anticorpos policlonais contra PR1 e PR2 32
3.12 Western Blot 32
3.13 Imunoensaio enzimático (ELISA) 33
3.14 Proliferação de linfócitos 33
3.15 Imunização de camundongos com frações do EGS 34
3.16 Determinação dos anticorpos específicos presentes no soro dos camundongos imunizados, utilizando a técnica de ELISA 34
3.17 Produção de anticorpos monoclonais 35
3.18 Ensaio de neutralização da atividade 35
3.19 RNA de interferência (RNAi) 36
3.20 Reação em cadeia da polimerase (PCR) 37
3.21 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR) 37
3.22 Análise estatística dos resultados 38

4 RESULTADOS 39
4.1 EGS de *A. aegypti* induz morte celular em linfócitos 39
4.2 Efeito citotóxico do EGS nas diferentes populações de linfócitos 43
4.3 O efeito citotóxico do EGS de *A. aegypti* é seletivo para linfócitos *naïve* 47
4.4 Identificação da molécula responsável pela atividade citotóxica através de fracionamento por HPLC e espectrometria de massas 54
4.5 Produção de proteínas recombinantes e avaliação de suas atividades biológicas 61
4.6 Produção de anticorpos monoclonais contra frações ativas do EGS e avaliação de sua atividade 65
4.7 RNA de interferência 70
4.8 Expressão do transcrito AAEL003655 73

5 DISCUSSÃO 75

6 CONCLUSÃO **82**

REFERÊNCIAS* **83**

Apêndice 1 – Relatório da análise da fração F1 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas. **93**

Apêndice 2 – Relatório da análise da fração F2 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas. **94**

Apêndice 3 – Relatório da análise da fração F3 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas. **95**

Apêndice 4 – Relatório da análise da fração F4 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas. **96**

Apêndice 5 – Relatório da análise da fração F1 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massas. **98**

Apêndice 6 – Relatório da análise da fração F2 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massa. **100**

Apêndice 7 – Relatório da análise da fração F3 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massas. **101**

Apêndice 8 – Sequência completa do transcrito AAEL003655. ..... **103**

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é um artrópode hematófago pertencente à família Culicidae e o principal vetor de arbovírus causadores da Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika, doenças que geram um grande impacto social e econômico em muitos países do mundo. Algumas caraterísticas desse vetor contribuem para sua importância epidemiológica e grande capacidade vetorial, como o fato de se alimentar preferencialmente em humanos, realizar os repastos sanguíneos durante o dia, sua picada quase imperceptível, capacidade de procriar em pequenas quantidades de água parada e os ovos resistentes a dessecação (BARRETT; HIGGS, 2007; GUBLER, 2002; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Esse conjunto de fatores, somado a falta de vacinas eficazes para combater muitos desses vírus, resultam em epidemias recorrentes que se alastram por grande parte do planeta, principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde esses mosquitos estão distribuídos.

Atualmente, as arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* estão criando um cenário preocupante, devido ao grande aumento no número de casos e a velocidade de sua distribuição geográfica. Algumas razões que explicam essa rápida distribuição pelo mundo são: o aumento das viagens internacionais, migrações ilegais através das fronteiras, moradias inadequadas, saneamento básico precário e pouca ou nenhuma estratégia de controle dos vetores (TILAK et al., 2016; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Mudanças nas condições climáticas, como as oscilações causadas pelo *El Niño*, podem acarretar a prática da coleta e armazenamento de água nas residências em recipientes muitas vezes inadequados, gerando um aumento dos focos para reprodução desses vetores (TILAK et al., 2016; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Em algumas regiões do Brasil, temos observado uma redução na disponibilidade de água das represas nos últimos anos, o que também estimula a prática de armazenar água em casa, refletindo no aumento da população de vetores e consequentemente na transmissão de doenças. Além disso, outra preocupação é o aumento da severidade de doenças previamente tidas como brandas, como por exemplo a infecção pelo vírus Zika. Esse vírus foi recentemente introduzido no Brasil e inicialmente diagnosticado com sintomas semelhantes à infecção pelo vírus da Dengue, porém mais amenos. Entretanto, evidências mostram

que infecções pelo vírus estão associadas a quadros graves envolvendo malformações congênitas, síndrome de Guillain-Barré e problemas neurológicos como microcefalia, dentre outras complicações (CUGOLA et al., 2016; TILAK et al., 2016).

A importância desse vetor no cenário atual tem elevado o número de cientistas trabalhando em pesquisas envolvendo o mosquito. Como consequência, o número de publicações contendo a palavra-chave "*Aedes aegypti*" nos últimos 10 anos quase dobrou (2005 = 248 artigos / 2015 = 497 artigos), segundo dados da US National Library of Medicine, National Institutes of Health (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed).

1.2 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos na hemostasia do hospedeiro

Assim como outras espécies de artrópodes hematófagos, o *A. aegypti* utiliza o sangue de seus hospedeiros como a principal fonte de nutrientes para a maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos nas fêmeas. Para realizar um repasto sanguíneo adequado, esses mosquitos necessitam de mecanismos que impeçam a ativação do sistema hemostático e do sistema imunológico do seu hospedeiro vertebrado. Neste contexto, a saliva desses organismos desempenha um papel essencial, atuando como principal elemento de interação entre o vetor e o hospedeiro.

Além das funções fisiológicas da saliva, como quebra de açúcares e lubrificação das peças bucais, a saliva possui outras funções importantes para a hematofagia (RIBEIRO, 1987). A saliva é composta por uma grande variedade de moléculas com atividades anticoagulante, anti-agregante de plaquetas e vasodilatadora, que facilitam a obtenção de sangue durante o repasto sanguíneo (CHAMPAGNE, 2004; CHMELAR et al., 2012; FRANCISCHETTI et al., 2009; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA, 2013; RIBEIRO, 1987). Por exemplo, a aegyptina é uma proteína que por se ligar aos colágenos do tipo I ao IV, bloqueia completamente a adesão de plaquetas ao colágeno e afeta a interação do fator de von Willebrand ao colágeno tipo III (CALVO et al., 2007). Outro exemplo de proteína com atividade anti-agregante de plaquetas presente na saliva do *A. aegypti* é a apirase, que é capaz de hidrolisar ADP e ATP e assim reduzir a ativação e o recrutamento de plaquetas (CHAMPAGNE et al., 1995; RENO; NOVAK, 2005; RIBEIRO et al., 1984). A saliva desse vetor possui também as sialocininas I e II que são peptídeos que fazem parte

da família das taquicininas e possuem atividade vasodilatadora (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992). Outro composto dessa saliva é um inibidor de serino-proteases com atividade anticoagulante específica para o Fator Xa (AFXa, do inglês ‘’*Anticoagulant-factor Xa*’’) (STARK; JAMES, 1995, 1998). Além disso, outro inibidor de serino-protease foi descrito, o AaTI (do inglês ‘’*A. aegypti trypsin inhibitor*”), capaz de se ligar a trombina e atuar como anticoagulante (WATANABE et al., 2010; WATANABE et al., 2011).

A importância da presença de fatores anti-hemostáticos na saliva desses vetores pode ser observada pelo fato de que mosquitos transgênicos com níveis reduzidos de aegyptina, gerados por silenciamento gênico, levaram mais tempo para conseguir se alimentar e apresentam quantidades reduzidas de sangue ingerido comparado com mosquitos controle colocados para se alimentar em camundongos anestesiados (CHAGAS et al., 2014).

1.3 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos no sistema imune do hospedeiro

Muitos componentes do sistema hemostático também são capazes de influenciar o sistema imune. Por exemplo, a serotonina e a histamina liberadas por plaquetas e mastócitos são indutores de dor, o que pode fazer com que o mosquito seja percebido pelo hospedeiro e tenha sua alimentação comprometida (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Dessa forma, é de se esperar que os componentes salivares do mosquito também tenham efeito sobre o sistema imune do hospedeiro. Sabe-se que o extrato de glândula salivar (EGS) do *A. aegypti* pode inibir a proliferação de linfócitos (BIZZARRO et al., 2013; CROSS et al., 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN et al., 2004), através da indução de apoptose nestas células (BIZZARRO et al., 2013). O EGS de *A. aegypti* também afeta o perfil de citocinas em cultura de esplenócitos estimulados, suprimindo citocinas do tipo Th1 como IL-2 e IFN-γ e pró-inflamatórias como GM-CSF e TNF-α, enquanto citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-5) são pouco afetadas (CROSS et al., 1994; WASSERMAN et al., 2004). O EGS desse mosquito também é capaz de inibir a liberação de TNF-α em mastócitos de rato (BISSONNETTE et al., 1993). Além disso, a exposição de camundongos infectados com o vírus do Nilo Ocidental às picadas do mosquito altera a migração e sinalização de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, e afeta o recrutamento de leucócitos para o tecido, assim como aumenta a expressão de IL-10 e diminui a expressão de iNOS e

IFN-β prejudicando a resposta antiviral (SCHNEIDER et al., 2010). Outros trabalhos mostram que os componentes salivares desse vetor não afetam a diferenciação, maturação e a função de células dendríticas (DCs) (BIZZARRO et al., 2013), além de não alterar a expressão de moléculas como CD40, CD83, MHC I e MHC II e a produção de citocinas como IFN-α e TNF-α em DCs humanas (ADER et al., 2004). Entretanto, a produção de IL12p70 por essas células parecem aumentar após contato com a saliva desse vetor (ADER et al., 2004). Uma das moléculas identificadas e caracterizadas na saliva do *A. aegypti* com atividade imunomoduladora é a SAAG-4, responsável pela programação de células T $CD4^+$ para expressar IL-4 (BOPPANA et al., 2009). Outra molécula presente na saliva do *A. aegypti,* a sialocinina I, inicialmente descrita como um vasodilatador, também é capaz de inibir citocinas do tipo Th1 e aumentar a produção de citocinas do tipo Th2 quando inoculada em camundongos (ZEIDNER et al., 1999).

Patógenos capazes de infectar esses mosquitos podem ser transmitidos pela saliva no momento da picada, e as atividades acima descritas podem ser utilizadas por esses patógenos, que se beneficiam do efeito imunomodulador da saliva para facilitar sua transmissão (ARGENTINE; JAMES, 1995). De fato, foi demostrado que a saliva de *A. aegypti* gera um aumento da infeção pelo vírus do Nilo Ocidental na pele de camundongos, associado com a inibição do recrutamento de linfócitos T e das atividades antivirais em APCs (SCHNEIDER et al., 2010). Outras evidências mostram que a infecção de queratinócitos humanos pelo vírus da dengue é exacerbada na presença da saliva devido à supressão de fatores da resposta imune inata (SURASOMBATPATTANA et al., 2014; SURASOMBATPATTANA et al., 2012). Um trabalho recente mostra que a saliva do *A. aegypti* pode aumentar a permeabilidade endotelial, estimular o extravasamento de plasma, aumentar a carga viral em macrófagos e células dendríticas da derme em um modelo murino de infecção secundária pelo vírus da dengue e ajudar a espalhar esse patógeno mais rapidamente na pele, aumentando a severidade da doença (SCHMID et al., 2016). Esses trabalhos demonstram que a saliva exerce um papel crucial na transmissão desses patógenos e que o entendimento dos aspectos fisiológicos da saliva no repasto sanguíneo e seus efeitos no sistema imune do hospedeiro tem uma importância significativa e inclusive pode ser usado como alvo para novas vacinas e desenvolvimento de outros métodos profiláticos para essas doenças.

1.4 Efeito da saliva do *A. aegypti* em linfócitos e a importância dessas células no sistema imune do hospedeiro

Nosso grupo mostrou recentemente que, ao contrário do que já foi descrito para algumas espécies de artrópodes hematófagos, os componentes salivares de *A. aegypti* não exercem efeito na diferenciação, maturação e função das células dendríticas. Por outro lado, atuam diretamente nos linfócitos T, induzindo uma potente atividade citotóxica seletiva para linfócitos *naïve* (BIZZARRO et al., 2013).

Os linfócitos T têm papel fundamental na proteção contra patógenos, pois são responsáveis por orquestrar a resposta imune adaptativa. O desenvolvimento dessas células ocorre no timo e, em condições normais, células funcionais e não autorreativas sobrevivem e migram para compartimentos linfóides periféricos, em especial órgãos linfóides secundários (DAVIS, 1990; KLEIN et al., 2009; ZINKERNAGEL et al., 1978). Os receptores das células T (TCR) reconhecem peptídeos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em APCs como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Moléculas coestimuladoras geram o segundo sinal para a ativação, enquanto integrinas como LFA-1 e ICAM-1 auxiliam na formação da sinapse imunológica que é fundamental para a completa ativação dessas células (DUSTIN et al., 2006; SIMS; DUSTIN, 2002; VAN SEVENTER et al., 1990). Em seguida ocorre uma expansão clonal dessas células que se diferenciam em células T efetoras por ação do microambiente de citocinas produzidas no local. A maior parte dessas células morre por apoptose ao final de uma resposta para que a homeostase do organismo seja mantida. As células que sobrevivem, cerca de 10-20%, se tornam células de memória e são responsáveis por uma resposta mais rápida, potente e eficaz ao reconhecer o mesmo antígeno em um contato subsequente (SALLUSTO et al., 2004; SPRENT et al., 2008).

As células T que apresentam TCR α/β são divididas em três subpopulações principais: células T $CD4^+$ ou auxiliares (Th, do inglês "*T helper*"), células T $CD8^+$ ou citotóxicas (Tc) e células T reguladoras (Treg) (LEWINSOHN et al., 2011). As células T $CD4^+$ secretam citocinas e quimiocinas que auxiliam a produção e troca de classe de anticorpos pelas células B, aumentam a capacidade microbicida de macrófagos e são capazes de recrutar neutrófilos, eosinófilos e basófilos para os locais de inflamação (ZHU; PAUL, 2008). Uma série de revisões tem atualizado o conhecimento sobre as subpopulações de células T $CD4^+$, identificadas e

classificadas até o momento de acordo com o padrão de citocinas secretadas e suas funções (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; ZHOU et al., 2009; ZHU; PAUL, 2008; ZHU et al., 2010). As células Th1 secretam principalmente IFN-γ e atuam na proteção contra patógenos intracelulares. O subtipo de células Th2 secreta as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, dentre outras, e tem papel importante contra alguns parasitas extracelulares. Células Th9 também exercem proteção contra parasitas e secretam citocinas como IL-9 e IL-10. Já as células Th17 são eficientes contra bactérias extracelulares e fungos, e secretam as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 principalmente (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; ZHOU et al., 2009; ZHU; PAUL, 2008; ZHU et al., 2010). As células T auxiliares foliculares (T_{FH}, do inglês "*follicular helper T cells*") estão presentes nos centros germinativos e são essenciais para a produção de anticorpos pelos linfócitos B e mudança de classe dessas imunoglobulinas (KING, 2009). Já as células T $CD8^+$ são responsáveis por destruir células infectadas e possuem mecanismos efetores eficientes no combate a vírus, bactérias intracelulares e tumores. Além disso, a geração e expansão de células T $CD8^+$ são aumentadas pelas citocinas produzidas por células T $CD4^+$ (BOURGEOIS; TANCHOT, 2003; WILLIAMS et al., 2006). Finalmente, as células Treg foram descritas por sua capacidade em suprimir a proliferação de células T *naïve,* sua diferenciação em células T efetoras e as funções das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ diferenciadas. São ainda capazes de suprimir as funções de células B, NK, NKT, macrófagos, osteoclastos e células dendríticas (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SAKAGUCHI et al., 2008; SHEVACH, 2006; TANG; BLUESTONE, 2008; VON BOEHMER, 2005). Os mecanismos supressores das células Treg envolvem secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF-β, modulação das funções das células apresentadoras de antígenos ou supressão dependente de contato celular (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SAKAGUCHI et al., 2008). Caracterizadas pela presença do fator de transcrição FoxP3, essas células foram descritas inicialmente como sendo $CD4^+CD25^+$; entretanto outros subtipos de células Treg também foram descritos posteriormente, como as células $CD8^+$ Treg, Tr1, Th3 e células NKT reguladoras (BATTAGLIA et al., 2006; BELIZARIO et al., 2016; GOL-ARA et al., 2012; KIM et al., 2010).

Os linfócitos T são essenciais para o estabelecimento de uma resposta imune apropriada para a eliminação de agentes patogênicos. A ausência dessas células, observada em diversos tipos de imunodeficiências severas e combinadas

(BUCKLEY, 2004; COSSU, 2010) é incompatível com a vida, exceto em ambientes extremamente controlados. Além disso, disfunções de linfócitos T podem resultar em diversas doenças autoimunes como diabetes melitus tipo 1, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, entre outras (MILLS, 2011). Reações de hipersensibilidade, rejeição a transplantes e linfomas também têm os linfócitos T como as principais células envolvidas.

Decifrar o que acontece com as células T durante a picada de um artrópode hematófago envolve uma série de variáveis e um complexo sistema de interação entre o vetor e o hospedeiro vertebrado, por vezes envolvendo um terceiro elemento, o patógeno (LEITNER et al., 2012). Além do intricado conjunto de subtipos de linfócitos T e suas diferentes condições dependendo de cada situação em que se encontram, o conteúdo da saliva de vetores também pode variar de acordo com cada espécie e sua necessidade de alimentação, complicando ainda mais o entendimento dessa interação. A composição da saliva pode mudar drasticamente em resposta a sinais ambientais como co-infecções com patógenos, presença de microrganismos comensais/microbiota, alimentação prévia com sangue, oscilação circadiana dos níveis de algumas proteínas e diferenças na saliva entre linhagens criadas em laboratório e coletadas no campo (LEITNER et al., 2012). Entretanto, todas as espécies de artrópodes hematófagos e também os microorganismos potencialmente transmitidos, desde vírus até parasitas, tem um objetivo em comum que é sobreviver, resistindo aos mecanismos de defesa de seus hospedeiros.

2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

Entender como a complexa interação entre o vetor e o hospedeiro funciona é essencial para desvendar a relevância biológica das moléculas presentes na saliva e então gerar ferramentas capazes de controlar ou impedir o repasto sanguíneo, a transmissão de patógenos e também as reações alérgicas causadas por esses vetores. No presente trabalho nos propomos realizar a caracterização imunofuncional de um componente da saliva do vetor *A. aegypti* com atividade citotóxica seletiva para linfócitos. Para isso, tivemos como objetivos específicos:

A - Avaliar o mecanismo de indução da morte celular causada pelo EGS de fêmeas de *A. aegypti* e quais células são afetadas ou resistentes a essa atividade;

B - Identificar a molécula responsável pelo cc gc efeito citotóxico;

C - Neutralizar o efeito da proteína para avaliar a relevância biológica;

D - Silenciar a molécula de interesse no mosquito.

Dessa forma, esperamos contribuir para o esclarecimento dos mecanismos utilizados pelo *A. aegypti* para conseguir realizar o repasto sanguíneo adequado e entender como a saliva desse vetor modula o sistema imune do hospedeiro.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou na Lei Federal nº. 11.794 (Lei Arouca), no Decreto 6.899 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 do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP), cujos certificados foram registrados sob os números 91/2009 e 55/2015 para uso de animais em experimentação.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c, entre 6 e 12 semanas, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos do ICB/USP. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Imunologia com água e alimento *ad libitum*. Camundongos BALB/c utilizados nos experimentos realizados no National Institutes of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health (NIAID/NIH) foram adquiridos pela Taconic Biosciences, Inc. (Germantown, NY, EUA).

3.2 Extrato da glândula salivar (EGS)

Machos e fêmeas de *A. aegypti* foram mantidos no biotério de insetos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, coordenado pela Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães, onde foram alimentados e acasalados. Glândulas salivares de fêmeas com 3-5 dias após emergência foram dissecadas em salina tamponada com fosfato (PBS) (Gibco Invitrogen, Grand Island, NY, EUA) e transferidas para um pequeno tubo contendo 50 µL de PBS gelado.

Os tubos contendo as glândulas salivares foram sonicados na potência máxima, por 2-3 minutos com pausas de 15 segundos, utilizando o sonicador Sonic Dismembrator 60 (Fisher Scientific, New Hampshire, EUA) para liberação do material solúvel. Os tubos foram centrifugados a 14.000 *g* por 10 min para remover o material particulado e o sobrenadante resultante, chamado de extrato da glândula salivar (EGS), foi reunido e esterilizado por passagem através de um filtro contendo uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm Millex (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda). A concentração proteica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) e alíquotas foram armazenadas a – 80 ºC até o momento de uso.

3.3 Preparação das células do baço

Após eutanásia realizada por deslocamento cervical, camundongos tiveram o baço retirado em condições assépticas e colocado em 5 mL de RPMI 1640 (Gibco Invitrogen). O órgão foi macerado em peneiras com poros de 40 μm (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) 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, $2,5 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol) (Gibco Invitrogen) para contagem em câmara de Neubauer.

3.4 Avaliação da morte celular em linfócitos do baço

Para avaliar a taxa de morte celular induzida em células incubadas com EGS de *A. aegypti,* esplenócitos foram preparados de acordo com o protocolo descrito no item 3.3. Suspensões celulares contendo 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 200 µL em tubos de cultura. Em seguida, 200 µL de EGS de *A. aegypti* nas concentrações finais indicadas nas figura foram adicionados aos tubos. Após 2 hs de incubação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão de FACS (PBS contendo 1% de soro fetal bovino – SFB). As amostras foram incubadas por 30 min a 4 ºC com os seguintes anticorpo, combinados de acordo com a necessidade de cada experimento: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD19, anti-CD44 e anti-CD62L conjugados com fluorocromos e em diluições apropriadas, protegida da luz. Após lavagem, as células foram ressuspendidas em tampão para anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, 0,25 mM CaCl) e 5 µL de anexina V foram adicionados em cada tubo, como indicado nas instruções do fabricante. Em alguns experimentos foram adicionados 10 µL de Iodeto de Propídeo (PI) ou DAPI (Thermo Fisher Scientific) na concentração final 0,1 µg/mL. As amostras foram adquiridas dentro de 1 h nos citômetros FACSCalibur ou FACSCanto II, do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia do ICB/USP. Os anticorpos utilizados foram tanto da empresa BD Biosciences quando da empresa Biolegend. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star Inc., Ashland, OR, EUA).

Em alguns experimentos as células foram previamente incubadas com Q-VD-OPh (inibidor de caspases 3, 8, 9, 10 e 12), por 1 h à 37 ºC e 5% CO_2, e então incubadas com meio ou EGS e avaliadas por citometria de fluxo para avaliação da ativação de caspases nessas células. Como controle positivo, as células foram incubadas com Actinomicina D (5 µg/mL) "*overnight*" à 37 ºC e 5% CO_2.

3.5 Enriquecimento das populações celulares $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$

As células do baço foram preparadas como descrito no item 3.3, marcadas com DAPI para exclusão das células mortas e com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19. As populações celulares $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$ e $CD3^-/CD19^+$ foram enriquecidas por separação celular (do inglês "*cell sorting*"), lavadas, ressuspendidas em 1 mL de meio completo e contadas. Uma suspensão de cada população celular contendo 10^6 células/mL foi preparada e distribuídas em alíquotas de 200 µL em tubos de cultura. Em seguida, 200 µL de EGS de *A. aegypti* nas concentrações finais indicadas nas figura foram adicionados aos tubos. Após 2 hs de incubação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão de FACS, marcadas com anexina V e avaliadas por citometria de fluxo. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star Inc.).

3.6 Avaliação da morte celular em linfócitos ativados

Células oriundas do baço de camundongos foram preparadas como descrito no item 3.3 e suspensões celulares contendo 10^6 células/mL em 10 mL de meio completo foram estimuladas com uma concentração final de 0,5 µg/mL de Concanavalina A (Con A) por 72 hs à 37 ºC e 5% CO_2. Após esse período, as células foram coletadas, lavadas, ressuspendidas em 1 mL de meio completo e contadas. Suspensões celulares contendo 10^6 células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 200 µL em tubos de cultura. Em seguida, 200 µL de EGS de *A. aegypti* (nas concentrações finais indicadas nas figura) foram adicionados aos tubos. Após 2 hs de incubação, as células foram lavadas, centrifugadas e ressuspendidas em tampão de FACS. As células foram marcadas com DAPI, anexina V e com os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 como descrito no item 3.4 e avaliadas por citometria de fluxo. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star Inc.).

3.7 Preparação das células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDC)

Após eutanásia, os fêmurs de camundongos descritos no item 3.1 foram retirados e isolados do músculo quadríceps adjacente em condições assépticas e tiveram ambas as extremidades cortadas. As células da medula óssea foram coletadas pela inoculação de 3 mL de meio RPMI 1640 no canal central do osso com a ajuda de uma agulha fina (0,45 x 13 mm – BD Precision Glide, Curitiba, PR, Brasil). As células foram centrifugadas a 300 *g* (5 min/4 ºC), e após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados com tampão de lise. Após nova lavagem, as células foram contadas e ressuspendidas a $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio completo contendo 20 ng/mL de GM-CSF (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), conforme previamente publicado (SA-NUNES et al., 2009; SA-NUNES et al., 2007). As células foram incubadas em alíquotas de 10 mL em placas de petri estéreis a 37 ºC e 5% CO_2. Após 4 dias de incubação metade do volume foi retirado e substituído pelo mesmo volume de meio completo novo, contendo 40 ng/mL de GM-CSF. Aos 7 dias de incubação, as células foram coletadas, contadas e uma suspensão de 2×10^6 células/mL foi preparada. As células foram marcadas com anti-MHC conjugado com FITC e 200 µL dessa suspensão celular foi adicionada aos poços de uma placa de 24 poços contendo uma lamínula redonda com diâmetro de 13 mm. As células foram incubadas por 2 hs à 37 ºC e 5% CO_2 e após lavagem com PBS estéril morno, as células aderidas à lamínula foram incubadas por 2 hs com 500 µL de meio ou EGS nas concentrações indicadas na figura. As células foram lavadas novamente e marcadas com anexina V conjugada com PE. Paralelamente, células do baço de camundongos foram preparadas e incubadas com meio ou EGS nas mesmas condições por 2 hs. Após incubação, as células foram marcadas com anti-CD3 e anexina V, conjugados com FITC e PE, respectivamente. Células dendriticas e linfócitos incubados com meio ou EGS foram analisados por microscopia de fluorescência e tiveram os resultados confirmados por citometria de fluxo.

3.8 Fracionamento do EGS por cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

O EGS foi filtrado utilizando filtros YM-100 (Millipore) e o material retido, enriquecido com moléculas pesando mais de 100 kDa, foi fracionado por HPLC usando a coluna Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ,

EUA). As frações foram eluídas a 0,5 mL/min em PBS (pH 7.4), usando uma bomba CM-4100 (Thermo Scientific) e a absorbância ultravioleta a 280 nm foi monitorada em espectrofotômetro (Thermo Scientific). As frações foram coletadas em intervalos de 1 minuto usando um coletor FC203-B (Gilson Inc., Middleton, WI, EUA). Um volume de 5 μL de cada fração foi utilizado para testar sua atividade em um ensaio de seleção de larga escala (do inglês "*high-throughput screening*") usando cultura de esplenócitos totais de camundongos BALB/c estimulados com Con A. A proliferação celular em presença de cada fração foi realizada em triplicata experimental e a avaliação dos resultados foi feita da mesma maneira descrita no item 3.14.

As frações indicadas na Figura 10 foram coletadas e enviadas ao centro de espectrometria de massas (*core facility*) do NIAID/NIH. Os resultados foram analisados pelo Dr. José Marcos Ribeiro, também do NIAID/NIH, através de ferramentas de bioinformática.

3.9 Extensão da sequência de interesse e análise de bioinformática

Para estender a sequência de interesse que estava truncada no genoma de *A. aegypti,* fizemos a construção de uma nova biblioteca de glândula salivar usando o kit de preparação da amostra TruSeq RNA kit, v. 2 (Illumina Inc., San Diego, CA). O cDNA resultante foi fragmentado usando Covaris E210 (Woburn, MA, USA). A amplificação da biblioteca foi realizada usando 8 ciclos para minimizar o risco de super amplificação. O sequenciamento foi realizado pelo NIH Intramural Sequencing Center usando a plataforma HiSeq 2000 platform (Illumina®). Os dados do sequenciamento foram processados e analisados pelos nossos colaboradores Dr. Eric Calvo e Dr. José Marcos Ribeiro do NIAID/NIH. Os softwares DNA STAR's Lasergene, BLAST tool, ClustalW e Treeview foram usados para comparar, alinhar as sequências e visualizar os alinhamentos.

Realizamos também a técnica RACE *(Rapid amplification of cDNA ends)* utilizando o kit FirstChoice RLM RACE (Thermo Fisher Scientific) para estender as extremidades 5' e 3' do gene de interesse, até obter a sequência completa.

A análise de bioinformática se baseou no uso do software ProP 1.0 Server (disponível publicamente no http://www.cbs.dtu.dk/services/ProP/) para investigar se a proteína contém sítios de clivagem para furina e/ou peptídeo sinal, e também o *Conserved Domains* (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) para avaliar a presença de possíveis domínios conservados na proteína.

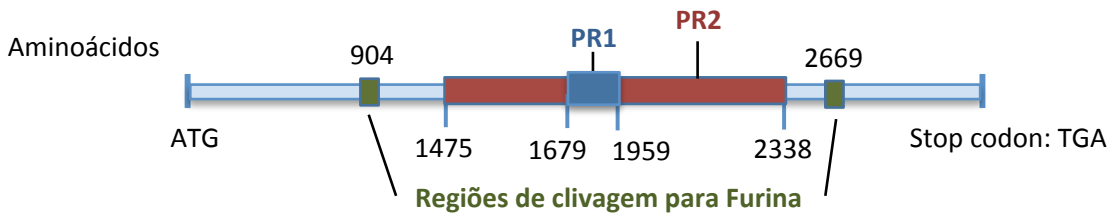
3.10 Expressão das proteínas recombinantes

O RNA total do EGS de fêmeas de *A. aegypti* foi isolado usando reagente Trizol (Thermo Fisher Scientific), como recomendado pelo fabricante. O cDNA foi gerado através da transcrição reversa utilizando o kit QuantiTect Transcrição Reversa (Qiagen, Germatown, MD, EUA). A amplificação dos genes para a síntese da proteína recombinante 1 (PR1) e proteína recombinante 2 (PR2) foi realizada pela técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os oligonucleótidos descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Sequências de oligonucleotídeos usadas para PCR.

Proteína Recombinante 1	Senso - 5' ACATCGTACGCAATCGATTATG Antisenso - 5' AACCGTCCTATTTCCGGGTC
Proteína Recombinante 2	Senso - 5' ACCTTCCACGTGGTGGTGAAC Antisenso - 5' CTGGCCGTCGGGGTCCAC

As sequências foram escolhidas com base em análises de bioinformática. A PR1 foi desenhada entre os sítios de clivagem para furina e compreende os aminoácidos desde a posição 1679 a 1959. A PR2 também foi desenhada entre os sítios de clivagem para furina, porém abrangendo uma região maior, localizada entre os aminoácidos da posição 1475 até 2338, como mostra o esquema ilustrativo abaixo.



As proteínas foram construídas contendo uma repetição de 6 Histidina (6x-His) antes do códon de parada. Os fragmentos amplificados foram clonados no vector pCR-II Topo de clonagem e transformado em células TOP10 quimicamente competentes (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). As colônias positivas foram cultivadas em meio LB com ampicilina e o plasmídeo de DNA foi extraído usando o kit QIAprep Miniprep (Qiagen). O sequenciamento do plasmídeo de DNA foi

realizado pela Eurofins MWG. Foram realizados inúmeros testes com diferentes preparações de tampão para o redobramento da PR1, porém não foi possível obter a proteína redobrada corretamente. A PR2 foi enviada ao Centro de Facilidades *("core facility")* do NIH para a expressão da proteína.

3.11 Produção dos anticorpos policlonais contra PR1 e PR2

Anticorpos policlonais contra as proteínas PR1 e PR2 foram produzidos em camundongos. Os corpos de inclusão da proteína PR1 foram aplicadas no gel de poliacrilamida Bis Tris 4-12% e a banda correspondente a proteína PR1 foi cortada e macerada. A acrilamida presente no gel funcionou como adjuvante para a imunização. Camundongos receberam três inoculações intraperitoneais do material macerado com uma semana de intervalo entre cada injeção. Uma semana após a última imunização, os animais foram eutanasiados e o sangue foi coletado sem anticoagulante e mantido a 4° C por 30 min. Depois desse período, o soro foi coletado e os anticorpos purificados por HPLC usando uma coluna de proteína A (GE Healthcare). A imunização com a proteína PR2 foi realizada através de duas inoculações subcutâneas com 15 dias de intervalo contendo 5 µg/mL de PR2, uma com adjuvante completo de Freund. e outra com adjuvante incompleto. Esses camundongos receberam um reforço intravenoso 15 dias após a última imunização e os anticorpos foram purificados do soro coletado como descrito acima.

3.12 Western Blot

EGS ou proteínas recombinantes foram aplicadas no gel de poliacrilamida Bis-Tris de resolução 4-12% sob uma corrente constante de 20 mA. As proteínas separadas foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose que em seguida foi bloqueada por 1 h com 5% de SFB diluído em Tampão Tris contendo 0,1% de Tween-20 (TBST). As membranas foram lavadas 3 vezes com TBST (10 min por lavagem) e incubadas overnight à 4 ºC com os seguintes anticorpos: mouse anti-PR1 (10 µg/mL), mouse anti-PR2 (10 µg/mL), sobrenadante dos hibridomas (puro), ou anticorpos purificado dos hibridomas (1:100). Após nova lavagem, as membranas foram incubadas por 1 h à temperatura ambiente com anticorpos secundários goat anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina ou com peroxidase (HRP) para detecção. Bandas imunorreativas foram visualizadas utilizando o Kit de detecção quimioluminescente ECL (Thermo Fisher Scientific) ou o substrato para fosfatase

alcalina, Western Blue (Promega, Madison, WI, EUA) e reveladas com um fotodocumentador.

3.13 Imunoensaio enzimático (ELISA)

EGS ou proteína recombinante (PR1 ou PR2) foram diluídos em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5, adicionados em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a 4 ºC. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de PBS/SFB 10% por 1 h à temperatura ambiente. Após nova lavagem, anticorpos anti-PR1 ou anti-PR2 purificados como descrito no item 3.11, ou sobrenadante de hibridomas descritos no item 3.17 foram incubados por 2 hs à temperatura ambiente nos poços da placa (100 uL/poço). Após ciclo de 5 lavagens, o anticorpo secundário conjugado com peroxidase anti-IgG (BD Biosciences, San José, CA, EUA) diluído em PBS/SFB 5% foi adicionado e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 h. Após 7 lavagens, foram então adicionados 100 µL/poço da solução substrato 3,3', 5,5' tetramethylbenzidine (TMB) e incubado por no máximo 30 min a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de ácido fosfórico 1 M (H_3PO_4). A leitura da reação foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm.

3.14 Proliferação de linfócitos

As células do baço foram preparadas como descrito no item 3.3. 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 50 µL do EGS de *A. aegypti* ou 50 µL da proteína recombinante obtida como descrito no item 3.10 (na concentração final indicada nas figuras), ou ainda 5 µL de cada fração obtida pelo fracionamento do EGS por HPLC descrito no item 3.8. Foram adicionados aos poços 50 µL de Con A na concentração final de 0,5 µg/mL, diluído em meio completo e as culturas foram incubadas por 72 hs a 37 ºC e 5% CO_2. Após 48 hs 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 resofurina. 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 hs após a adição da resazurina, a D.O. de cada poço foi medida a 570 e 600 nm e a proliferação foi avaliada indiretamente pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras.

3.15 Imunização de camundongos com frações do EGS

Camundongos foram imunizados subcutaneamente em dois sítios da região dorsal com 100 μL de uma emulsão contendo adjuvante de Freund completo e as frações onde a atividade inibidora da proliferação de linfócitos foi observada (v/v). Esse procedimento foi repetido duas vezes com intervalos de 15 dias entre as imunizações utilizando adjuvante de Freund incompleto. Após 15 dias, as células do baço desses animais foram utilizadas para o desenvolvimento de hibridomas como descrito no item 3.17.

O soro desses animais foi coletado e utilizado para um teste de neutralização da atividade inibidora do EGS. Para isso o soro dos animais imunizados ou animais controles (não imunizados) foram incubados previamente com o EGS e adicionados à cultura de linfócitos após centrifugação de 14000 *g* por 10 min. A proliferação celular foi analisada como descrito no item 3.14.

3.16 Determinação dos anticorpos específicos presentes no soro dos camundongos imunizados, utilizando a técnica de ELISA

Para a determinação dos anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para o EGS de *A. aegypti*, realizamos um ELISA onde alíquotas de 100 µL de EGS (5 µg/mL) preparadas em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5, foram adicionados em placas de 96 poços e incubadas *overnight* a 4 ºC. No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de PBS/SFB 10% por 1 h à temperatura ambiente. Após nova lavagem, as amostras de soro apropriadamente diluídas foram preparadas e adicionadas nos poços apropriados (100 µL/poço) e incubadas por 2 htfds à temperatura ambiente. Após ciclo de 5 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço de solução de detecção (anticorpo secundário biotinilado e estreptoavidina conjugada com peroxidase) anti-IgG1 (BD Biosciences) ou anti-IgG2a (Gibco Invitrogen) diluída em PBS/SFB 10% e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 h. Após 7 lavagens, foram então

adicionados 100 µL/poço da solução substrato TMB e incubado por no máximo 30 min a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de ácido fosfórico 1 M (H_3PO_4). A leitura da reação foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm.

3.17 Produção de anticorpos monoclonais

Anticorpos foram produzidos contra a fração de EGS responsável pela inibição de linfócitos, em colaboração com o Dr. Juliano Bordignon do Laboratório de Virologia Molecular (ICC/FIOCRUZ-PR). Camundongos imunizados com as frações do EGS, como descrito no item 3.15, tiveram o baço retirado e os esplenócitos preparados utilizando meio de cultura sem SFB. Essas células foram fusionadas com células de mieloma murino da linhagem Ag8XP3653 usando Polietilenoglicol (PEG) por 2 min e lavadas com meio de cultura por 5 min. Após a fusão, as células híbridas foram diluídas em meio de cultura contendo 20% de SFB e alíquotas de 100 µL de uma suspensão de 2,5 x 10^6 células/mL foram distribuídas em placas de 96 poços. Após 24 hs de incubação, meio contendo hipoxantina, aminopterina e timidina (HAT) foi adicionado a cultura, sendo renovado a cada 48 hs. Após 12 dias, células híbridas começaram a ser selecionadas e separadas. O meio HAT foi então substituído por meio HT (Hipoxantina e Timidina) por mais 4 dias. Depois da seleção, os hibridomas foram propagados em meio e testados para secreção de anticorpos por ELISA.

Os sobrenadantes de cultura dos hibridomas foram utilizados para ensaios funcionais, onde foram previamente incubados com EGS e adicionados à cultura de linfócitos. A proliferação dessas células foi avaliada de acordo com o procedimento descrito no item 3.14.

3.18 Ensaio de neutralização da atividade

Como uma tentativa de neutralizar a atividade observada, os anticorpos monoclonais purificados dos hibridomas descritos no item 3.17 e os anticorpos policlonais anti-PR2 descritos no item 3.11 foram diluídos em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5 e incubados *overnight* a 4 ºC em placas de 96 poços. A placa foi lavada com PBS/Tween 0,05% e bloqueada com PBS/SFB 5% por 1 h. Após esse período, a placa foi lavada novamente e incubada por 2 hs com EGS (0,5 µg/mL) diluído em PBS. Ao final da incubação, o PBS contendo proteínas do EGS que não

permaneceram ligadas aos anticorpos da placa foi removido e adicionado a tubos contendo células do baço de camundongos preparadas como descrito no item 3.3. Essas células foram incubadas por 2 hs à 37 ºC e a seguir analisadas por citometria de fluxo para a marcação de anexina V e expressão de CD62L.

3.19 RNA de interferência (RNAi)

Um fragmento de aproximadamente 500 pares de base dos transcritos: AAEL003655 (candidato potencial), AAEL009992 (outro transcrito cujo produto tem ~400 kDa, encontrado na glândula salivar de *A. aegypti*) ou o gene β-galactosidase (Lacz; utilizado como um controlo negativo) foram amplificados por PCR com o sítio do promotor T7 polimerase incorporado em ambas as extremidades, como descrito na Tabela 2. O produto do PCR foi utilizado para sintetizar RNA de cadeia dupla (dsRNA) usando MegaScripti RNAi kit (Ambion, EUA). O dsRNA foi concentrado para 3 mg/mL em H_2O tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e 69 nL do dsRNA foram injetados em fêmeas com 1 dia após a eclosão utilizando um nanoinjetor, Nanoject II (Drummond Scientific, Broomall, PA, EUA). Três dias após a injeção de dsRNA, 15 glândulas salivares dos mosquitos injetados foram dissecadas e preparados para avaliação da expressão do gene e 35 para o ensaio de proliferação.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos usados para a síntese de dsRNA com a sequência T7 marcada em vermelho

ds9992 (AAEL009992)	Senso – 5' TAATACGACTCACTATAGGGCGAGGATGGATGGAATCGTT 3' Antisenso – 5' TAATACGACTCACTATAGGGATTGTGCCCGCGTCTTGCAG 3'
ds3655 (AAEL003655)	Senso – 5' TAATACGACTCACTATAGGGCTCTGGGATACATGACGTA 3' Antisenso – 5' TAATACGACTCACTATAGGGTGACGGTGGACCATCCGTAG 3'
dsLacZ (M13)	Senso – 5’ GTA AAA CGA CGC CCA GT 3’ Antisenso – 5’ CAG GAA ACA GCT ATG AC 3’

3.20 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As PCR foram preparadas com uma mistura de 2 µL de tampão para Taq DNA polimerase (Amersham Biosciences) concentrado 10 x, 1 µL de dNTP 10 mM, 1 µL dos oligonucleotídeos senso e antisenso (10 µM) descritos nas Tabela 1, 2 ou 3, de acordo com cada experimento, 2 µL da enzima Taq DNA polimerase (5U/µL), 2 µL de cDNA e 11 µL de água ultrapura. As reações foram realizadas em um termociclador Mastercycler (Eppendorf, EUA) com os programas térmicos apropriados para cada experimento. Os produtos da amplificação foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% (m/v) contendo o marcador SYBR Safe (Thermo Fisher Scientific) diluído 1:10000, com uma voltagem constante de 100 V. Para visualização das bandas dos produtos de PCR, o gel foi analisado sob luz ultravioleta em um transiluminador ImageQuantTM 300 (GE Healthcare).

3.21 Reação em cadeia de polimerase quantitativa (qPCR)

A expressão dos genes AAEL003655 e AAEL009992 após a realização do RNA de interferência foi determinada por qPCR. Assim como, a expressão do gene AAEL003655 nos diferentes estágios do ciclo de vida do mosquito. cDNA das glândulas de mosquitos silenciados e o cDNA dos diversos tecidos coletados (abdome, tórax, cabeça e glândulas de fêmeas e machos adultos; pupas fêmeas e machos; e larvas dos estadios L1, L2, L3 e L4), foram usados como molde para as reações do qPCR utilizando os oligonucleotideos descrito na Tabela 3. As reações foram realizadas com o kit StepOne™ Plus System (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) e SYBR® Green PCR Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, California, EUA), seguindo o programa térmico: 95 ºC por 10 min, 40 ciclos de 95 ºC por 15 segundos, 60 ºC por 60 segundos e 72 ºC por 20 segundos. A normalização das amostras foi realizada de acordo com os níveis de amplificação da sequência da proteína ribossômica S7. A expressão gênica nos diferentes tecidos foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$, como proposto por Livak e colaboradores (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001), considerando a larva no estadio L1 como referência. O ensaio foi realizado em triplicata experimental e é representativo de 3 experimentos distintos.

Tabela 3 - Sequências dos oligonucleotídeos usados para o qPCR.

9992-qPCR (AAEL009992)	Senso - 5' TATGACTCCCAAACAGGTCGA Antisenso - 5' TGACCTCAGCCACCCGTCTGT
3655-qPCR (AAEL003655)	Senso - 5' GCCAGCTGATGTACTGTCGT Antisenso - 5' ATTTGGTTGGTTCCATTGGT

3.22 Análise estatística dos resultados

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

4 RESULTADOS

4.1 EGS de *A. aegypti* induz morte celular em linfócitos

A exposição de fosfatidilserina na porção externa da membrana de uma célula é um dos primeiros sinais de que a célula está em processo de morte celular. Isso ocorre quando a célula entra em apoptose, mas outros tipos de morte celular como necroptose ou piroptose também desencadeiam esse fenômeno. Esse é um sinal para que células fagocíticas, como por exemplo os macrófagos, reconheçam e eliminem essas células, evitando assim o desencadeamento de eventos pró-inflamatórios (KRYSKO et al., 2006; TRITARELLI et al., 2004; WANG et al., 2013). A incorporação de PI no DNA também é um indicador de morte celular, já que não é possível a sua entrada em células vivas. Para avaliar a morte celular causada pelo EGS, uma suspensão de células provenientes do baço de camundongos foi preparada como descrito em Material e Métodos, e incubadas com diferentes concentrações de EGS (0,5; 1 e 5 µg/mL) por 15 minutos ou 2 horas. Essas células foram marcadas com anexina V (que se liga a fosfatidilserina) e PI e então avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado um aumento na porcentagem de células marcadas com anexina V somente, e também duplo positivas (anexina V^+ e PI^+) quando as células são incubadas por apenas 15 minutos com as concentrações mais altas de EGS (1 e 5 µg/mL) em comparação com as células incubadas somente com meio (Figura 1A). Com 2 horas de incubação a marcação duplo positiva se mantem na mesma intensidade comparada com a incubação de 15 minutos, porém a marcação somente com anexina V é muito mais pronunciada, e aumenta de forma concentração-dependente (Figura 1B).

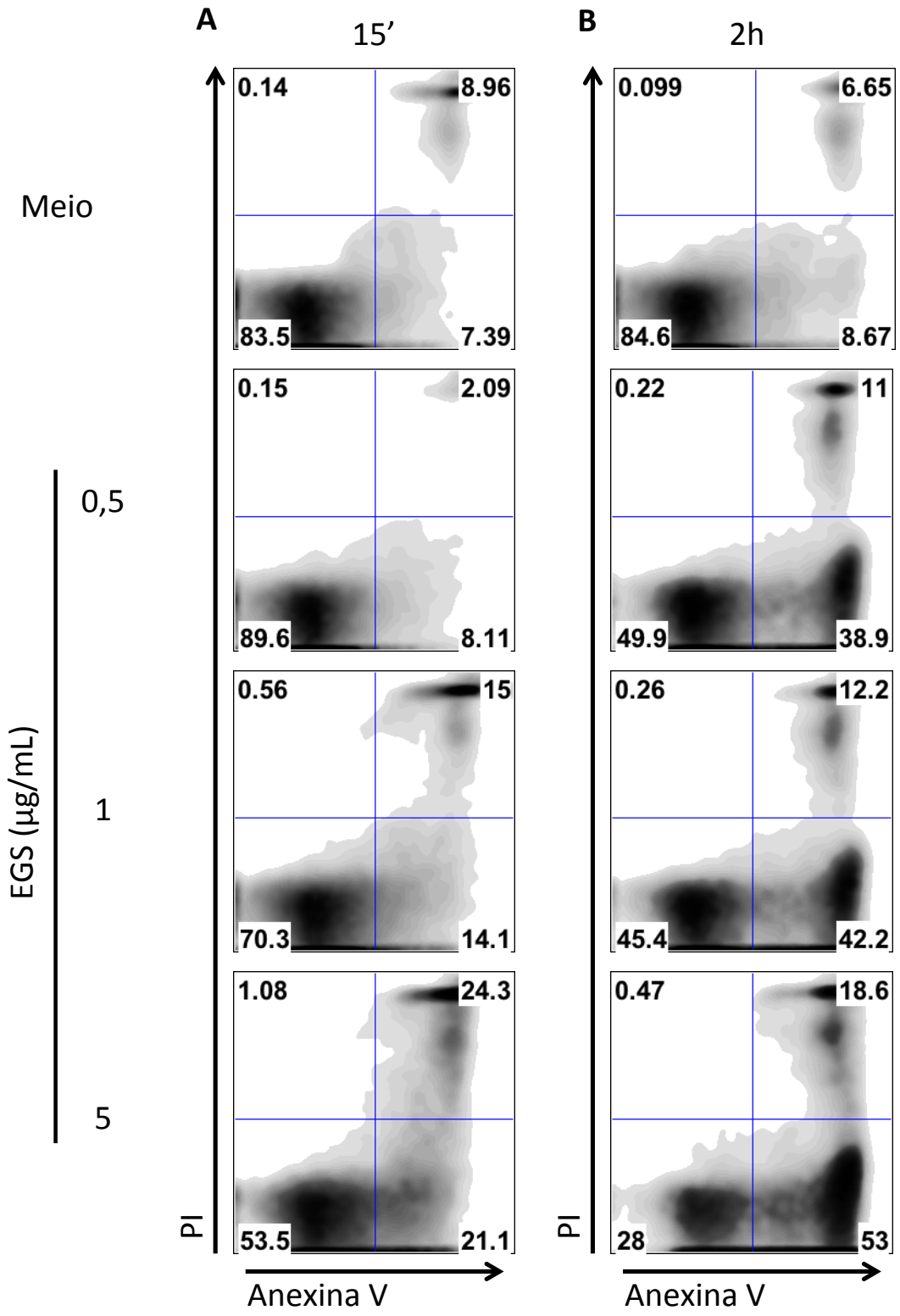


Figura 1 - Morte celular de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*. Células do baço de camundongos BALB/c foram incubadas na presença de meio ou EGS nas concentrações 0,5; 1 ou 5 µg/mL por 15 minutos (A) ou 2 horas (B). Após esse período as células foram lavadas, marcadas com anexina V e PI e analisadas por citometria de fluxo. Figura representativa de 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições.

A morte celular causada pelo EGS é acompanhada de uma redução no tamanho das células, característica da apoptose e não da necrose. Isso foi observado por citometria de fluxo através do parâmetro FSC (do inglês "*Forward Scatter*") que reflete o tamanho celular. Na Figura 2A observamos que as células totais do baço se dividem em duas grandes populações celulares de acordo com a diferença no parâmetro FSC. A região P1 representa uma população com tamanho reduzido e compreende cerca de 7% das células totais. Já a região P2 envolve uma população majoritária de linfócitos de maior tamanho que compreende mais de 50% das células. Quando essas células são incubadas com concentrações crescentes de EGS, ocorre um aumento na porcentagem de células na região P1 (células menores), enquanto uma diminuição na porcentagem de células na região P2 (células maiores) é observada (Figura 2A). Para demonstrar que esse evento está relacionado com a morte celular, após 2 hs de incubação com meio ou EGS, as células foram marcadas com anexina V e avaliadas por citometria de fluxo. Quando avaliamos a porcentagem de células marcadas com anexina V dentro de cada uma das regiões P1 e P2, observamos que em todas as situações (incubadas com meio ou EGS) a maior parte (80-90%) das células na região P1 estão marcadas com anexina V, e portanto, em processo de morte celular (Figura 2B). Em contrapartida, as células na região P2 apresentam aumento da marcação com anexina V somente quando incubadas com EGS e não quando incubadas apenas na presença de meio (Figura 2C).

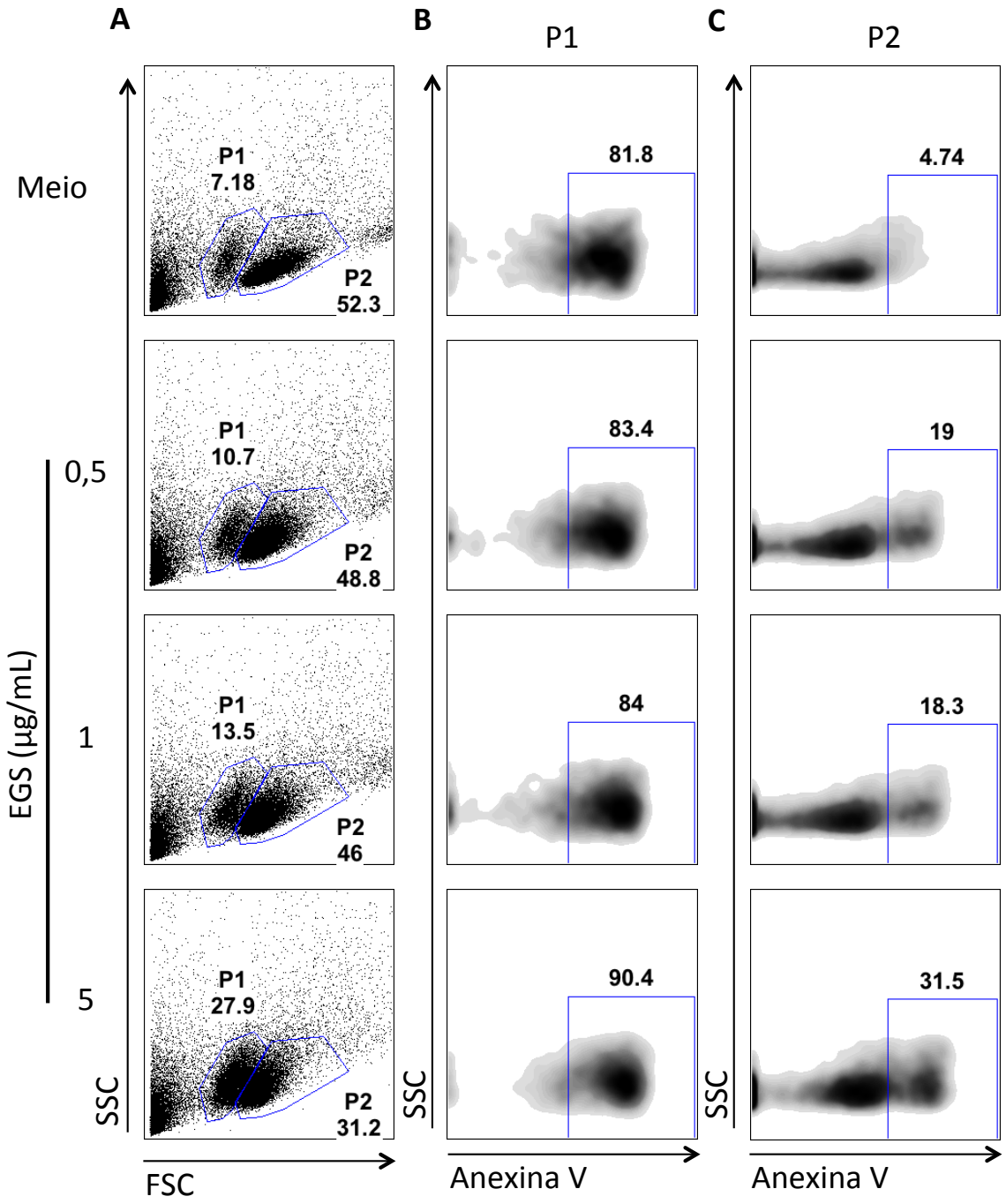


Figura 2 - Morte celular da populações P1 e P2 provenientes de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*. Células do baço de camundongos BALB/c foram incubadas na presença de meio ou EGS nas concentrações 0,5; 1 ou 5 µg/mL por 2 horas. Após esse período as células foram lavadas, marcadas com anexina V e analisadas por citometria de fluxo. As populações P1 e P2 foram separadas de acordo com o tamanho celular observado pelo parâmetro FSC (A) e analisadas para a marcação de anexina V em cada uma das populações P1 (B) e P2 (C). Figura representativa de 4 experimentos independentes realizados nas mesmas condições.

4.2 Efeito citotóxico do EGS nas diferentes populações de linfócitos

Para excluir células em processo avançado de apoptose e avaliar apenas a morte celular induzida pelo EGS, ou seja, no início do processo, utilizamos a marcação com DAPI e realizamos a estratégia de análise da seguinte forma: a) exclusão de células que passam juntas, os chamados *"dublets"* (Figura 3A); b) exclusão de células positivas para a marcação de DAPI (Figura 3B); c) seleção da população de linfócitos e exclusão de debris celulares (Figura 3C); seleção de células $CD3^+$ ou $CD19^+$ por quadrantes (Figura 3D). Com essa estratégia, foi possível observar que a população correspondente a região P1 da Figura 2 foi excluída (Figura 3C). Observamos também que a incubação das células com EGS gera uma diminuição significativa na proporção de células $CD3^+$, que acontece de forma concentração-dependente (Figura 3E e F), e um discreto aumento, não significativo, na proporção de células $CD19^+$ (Figura 3E e G). Esses dados sugerem que o EGS de *A. aegypti* deve afetar diferencialmente as populações de linfócitos do baço, afetando suas proporções nas análises. Para melhor avaliar esse achado, esplenócitos de camundongos foram incubados com EGS por 2 hs e marcados com os seguintes anticorpos conjugados a fluorocromos: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19. Após lavagem, as células foram marcadas com anexina V e avaliadas por citometria de fluxo. Foi observado que todas as populações de linfócitos são afetadas pelo EGS, porém os linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ parecem ser mais sensíveis a esse efeito citotóxico, já que apresentam aumento na porcentagem da marcação com anexina V quando incubadas com EGS muito maior do que a população de linfócitos B ($CD19^+$) (Figura 4A).

Como culturas de células totais de baço possuem número/porcentagem diferente de cada população de linfócitos, a sensibilidade individual observada nas populações poderia ser fruto de um artefato decorrente das condições experimentais. Para avaliar essa possibilidade e o real efeito do EGS em cada uma dessas populações de linfócitos, as células $TCD4^+$, $TCD8^+$ e $CD19^+$ foram separadas por citometria de fluxo (*"cell sorting"*) como descrito em Material e Métodos e o mesmo número de células de cada população foi incubado com EGS e avaliadas por citometria de fluxo após marcação com anexina V. O mesmo fenótipo foi observado nas condições pré- e pós-separação, e novamente as células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ foram mais afetadas pelo EGS do que linfócitos B (Figura 4B), confirmando a seletividade de ação dos componentes salivares de *A. aegypti*.

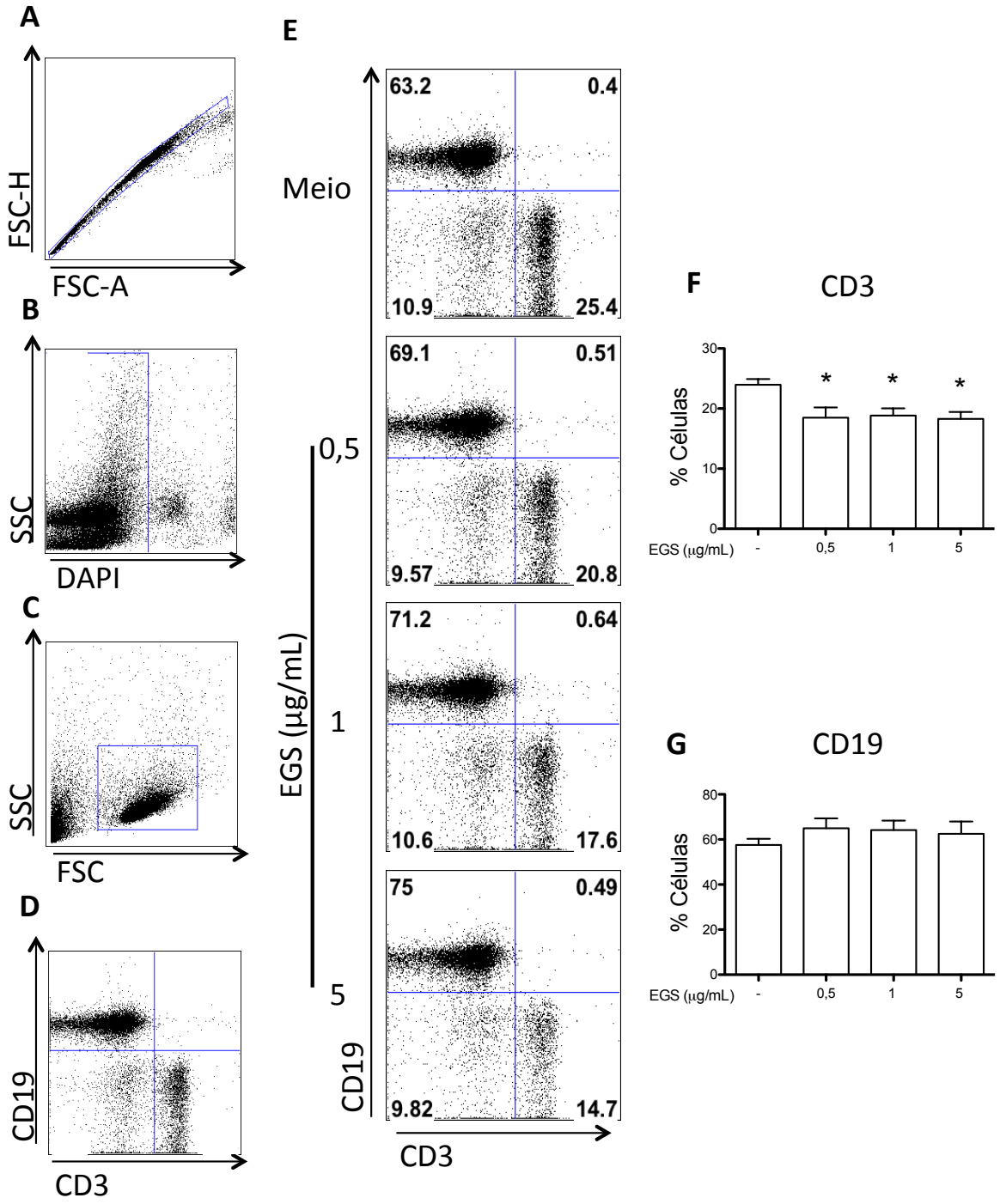


Figura 3 - Frequência das populações CD3⁺ e CD19⁺ provenientes de linfócitos de baço na presença de EGS de *A. aegypti*. Células do baço de camundongos BALB/c foram incubadas na presença de meio ou EGS nas concentrações 0,5; 1 ou 5 µg/mL por 2 horas. Após esse período as células foram lavadas, marcadas com DAPI, anti-CD3 e anti-CD19, e analisadas por citometria de fluxo. A estratégia de análise consistiu na: exclusão de *"dublets"* (A); seleção de células negativas para a marcação com DAPI (B); seleção da população de linfócitos de acordo com FSC e SSC (C); e seleção de células $CD3^+$ ou $CD19^+$ por quadrantes (D). A proporção das populações $CD3^+$ ou $CD19^+$ em células incubadas com meio ou EGS foram analisadas por quadrantes (E) e mostradas em gráficos contendo a média da porcentagem relativa de $CD3^+$ (F) e $CD19^+$ (G). Figura representativa de 4 experimentos independentes realizados nas mesmas condições. * $p \leq 0,05$ *versus* grupo incubado com meio somente.

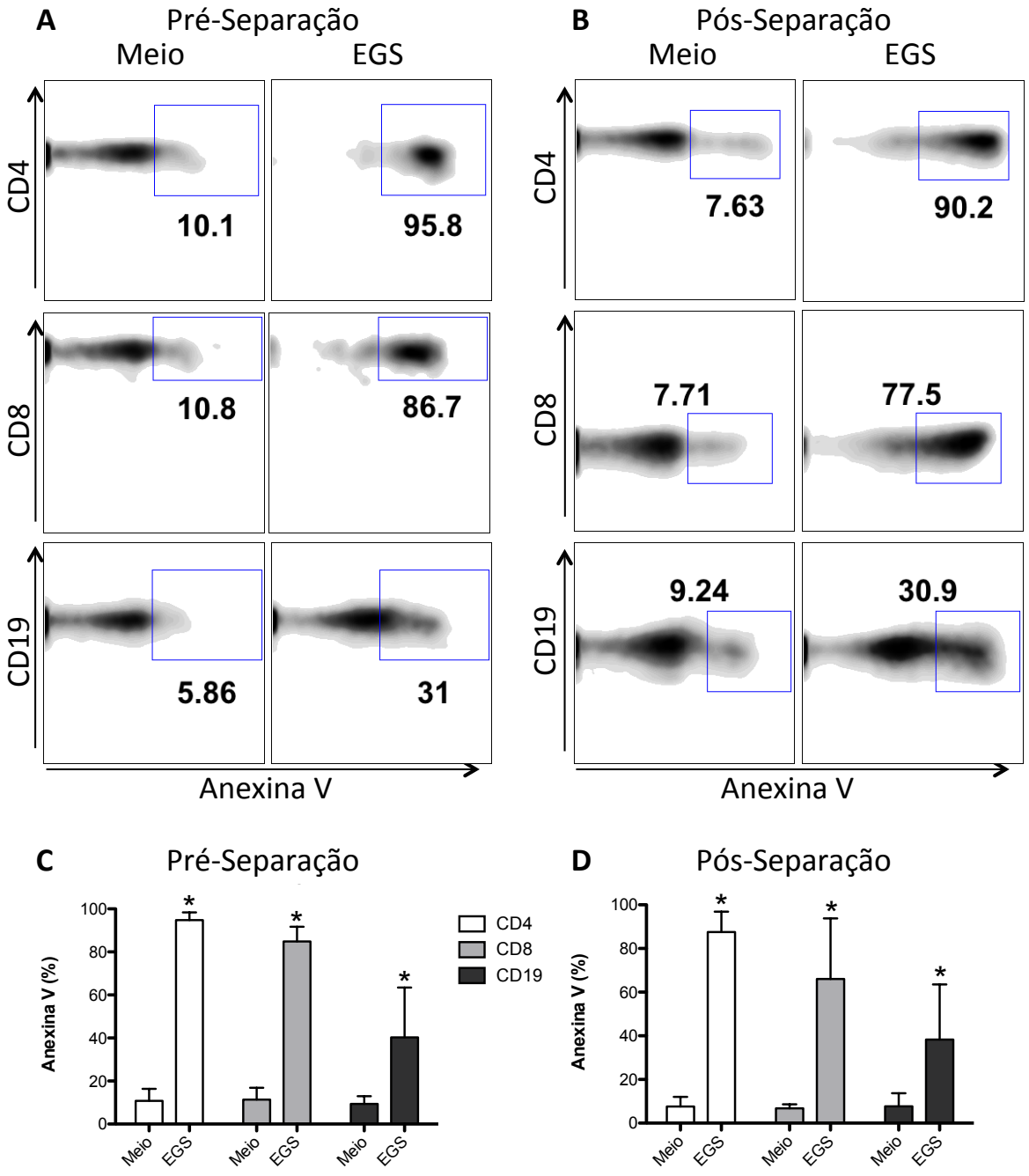


Figura 4 - Efeito diferencial do EGS de *A. aegypti* nas diferentes populações de linfócitos de baço. Esplenócitos de camundongos BALB/c foram preparados e marcados com DAPI, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19. Essas células foram incubadas com meio ou EGS (5 µg/mL) por 2 horas e analisadas por citometria de fluxo. Após a exclusão de "*dublets*" e de células mortas ($DAPI^+$), as populações de células $CD3^+/CD4^+$, $CD3^+/CD8^+$ e $CD3^-/CD19^+$ foram selecionadas e analisadas para a marcação com anexina V (A). Paralelamente, foi realizada a separação das populações $CD4^+$, $CD8^+$ e $CD19^+$ por *"cell sorting",* utilizando a mesma estratégia de análise. A seguir, cada uma dessas populações celulares foram contadas, colocadas em cultura na presença de meio ou EGS e marcadas com anexina V para analise por citometria de fluxo. Média das porcentagens relativas de anexina V^+ nas populações antes da separação (C) e após da separação por *"sorting"* (D). Figuras representativas de 2 experimentos independentes realizados nas mesmas condições. * $p \leq 0,05$ *versus* grupo incubado com meio somente.

4.3 O efeito citotóxico do EGS de *A. aegypti* é seletivo para linfócitos *naïve*

Em um trabalho anterior de nosso grupo, mostramos que células de memória são resistentes à atividade do EGS de *A. aegypti* (BIZZARRO et al., 2013). Assim, nos questionamos em que momento da transição *naïve*-ativação-memória essas células se tornam refratárias a ação do EGS. Para isso, células do baço de camundongos foram estimuladas por 72 horas com Con A e depois incubadas com EGS por 2 horas. Foi observado que as células T $CD4^+$ (Figura 5A) e T $CD8^+$ (Figura 5B) ativadas pela Con A são mais resistentes aos efeitos do EGS em comparação com células não ativadas (recém-preparadas) incubadas na presença de meio, como observado pela diminuição significativa da porcentagem de células marcadas com anexina V no grupo de células ativadas (Figura 5).

Além disso, células incubadas com meio ou EGS, foram marcadas com anticorpos anti-CD44 e anti-CD62L, que são moléculas importantes na discriminação de células *naïve*, ativadas e de memória murinas, e foram avaliadas por citometria de fluxo. Na Figura 6B é possível observar que ocorre a perda completa da expressão de CD62L na superfície das células incubadas com o EGS em comparação com células incubadas com meio somente (Figura 6A).

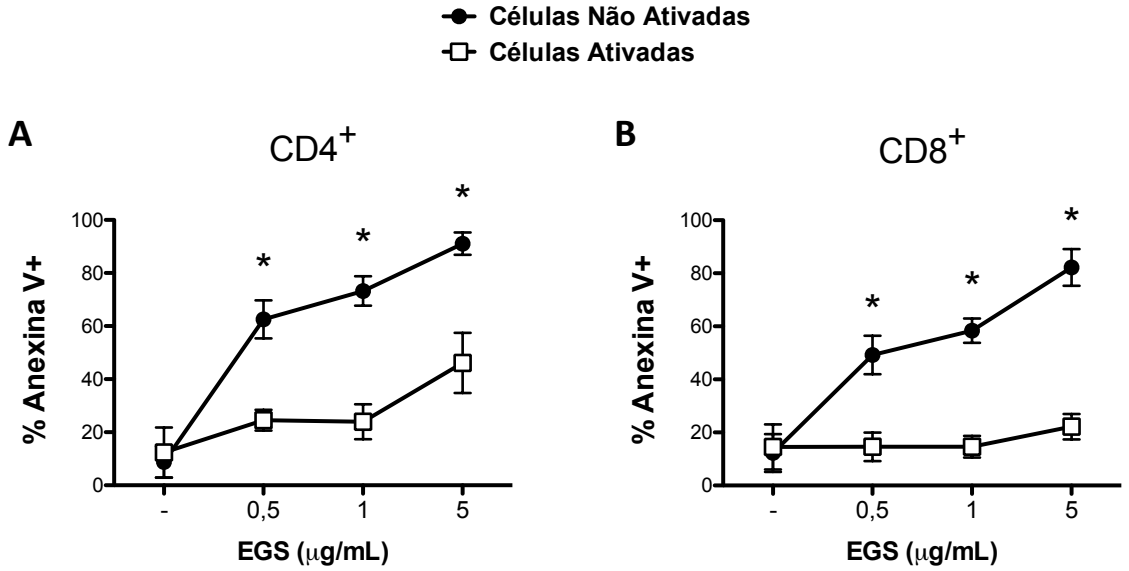


Figura 5 - Indução diferencial de morte em células de baço não ativadas e ativadas, pelo EGS de *A. aegypti*. As células do baço de camundongos BALB/c foram estimuladas por 72 horas com Con A, lavadas e incubadas na presença de meio ou EGS nas concentrações 0,5; 1 e 5 µg/mL (-□-). Paralelamente células não ativadas foram preparadas e incubadas com meio ou EGS nas mesmas concentrações (-●-). As células $CD4^+$ (A) $CD8^+$ (B) e CD19 (C) foram marcadas com anexina V e avaliadas por citometria de fluxo. Figura representativa de 3 experimentos independentes realizados nas mesmas condições. * $p \leq 0,05$ *versus* grupos de células não ativadas.

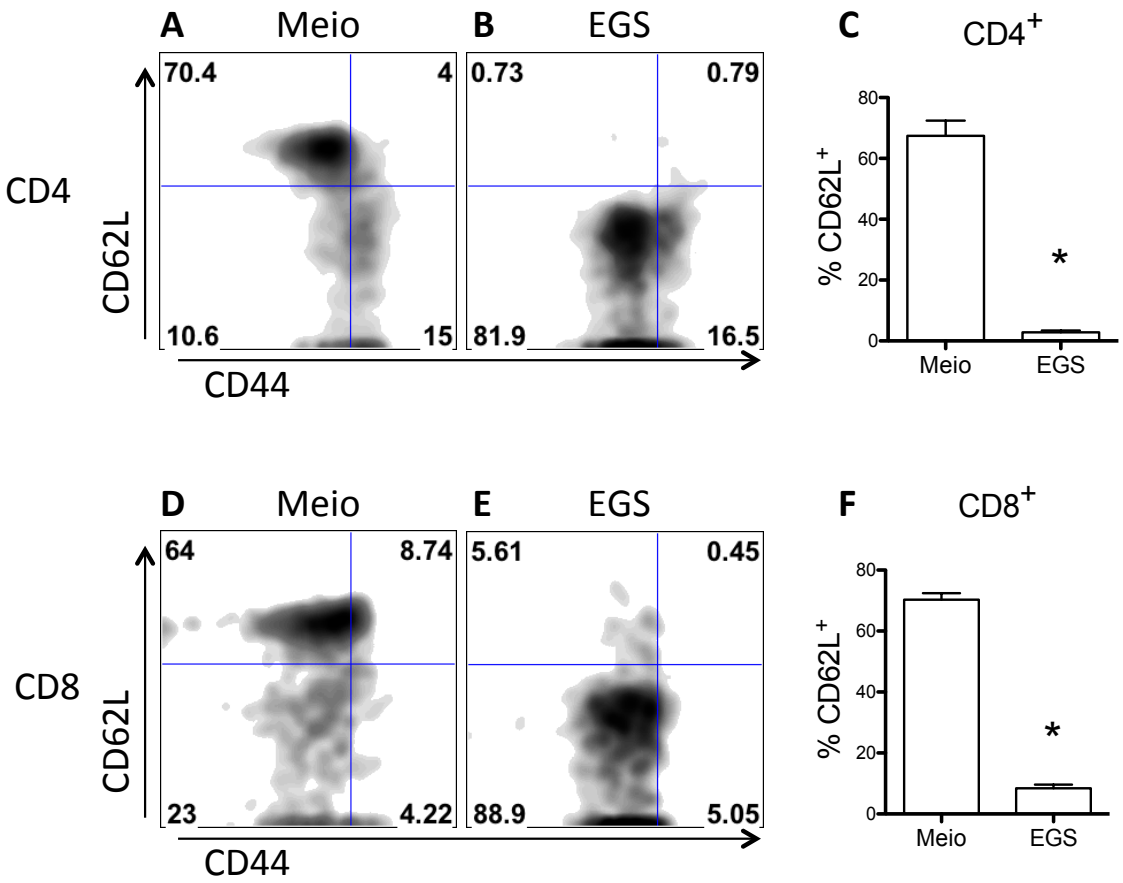


Figura 6 - Expressão de CD62L e CD44 após incubação com EGS de *A. aegypti.* Esplenócitos de camundongos BALB/c foram preparados e marcados com DAPI, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD62L e anti-CD44. Essas células foram incubadas com meio ou EGS por 2 hs e analisadas por citometria de fluxo. A estratégia de análise consistiu na exclusão de "*dublets*" e de células mortas ($DAPI^+$), seleção de células $CD3^+$, seleção de células $CD4^+$(A) ou $CD8^+$(B) e dentro dessas populações a expressão dos marcadores CD62L e CD44 foi avaliada. Figura representativa de 4 experimentos independentes realizados nas mesmas condições. * $p \leq 0{,}05$ *versus* grupos de células incubadas com meio somente.

Como apresentado na introdução, a presença do EGS de *A. aegypti* em culturas de células dendríticas não foi capaz de alterar a diferenciação, maturação e função dessas células. Isso sugere que a atividade citotóxica descritas aqui é seletiva para linfócitos. Para confirmar essa hipótese, células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos BALB/c foram diferenciadas *in vitro* como descrito em Material e Métodos. Paralelamente, células do baço da mesma linhagem de camundongos foram preparadas como descrito anteriormente. Essas populações celulares foram simultaneamente incubadas com EGS por 2 hs, e marcadas com anticorpos anti-MHC classe II ou anti-CD3 para BMDCs e linfócitos, respectivamente. As células foram lavadas, marcadas com anexina V e avaliadas por citometria de fluxo e por microscopia de fluorescência. Nas figuras 7A e 7C é possível observar que existe uma marcação basal de anexina V nos linfócitos e em células dendríticas, respectivamente. A incubação com EGS gera um grande aumento na marcação com anexina V apenas em linfócitos (Figura 7B), sendo que não é observada nenhuma alteração nas células dendríticas incubadas com o EGS (Figura 7D). A análise por citometria de fluxo reforça esse resultado sendo que os linfócitos marcados com CD3 apresentam cerca de 90,8% de células marcadas com anexina V em comparação com as células controle que apresentam apenas 15,1% (Figura 7Ee 7F). Já as células dendríticas apresentam menos de 10% de marcação com anexina V em ambas as condições (Figura 7G e 7H).

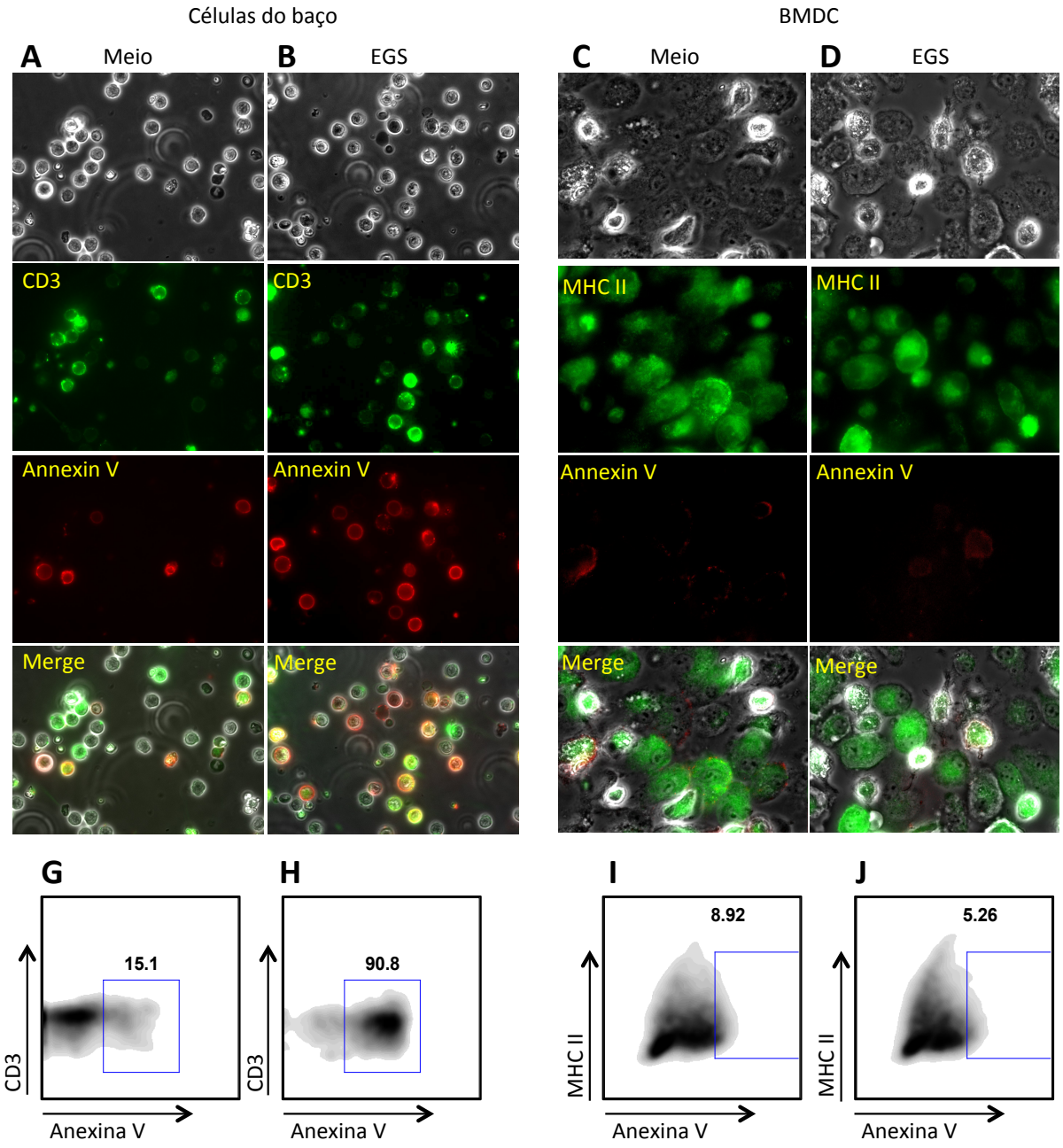


Figura 7 - Efeito diferencial do EGS de *A. aegypti* nas diferentes células do sistema imune. (A, B, E e F) Células do baço de camundongos BALB/c foram marcadas com anti-CD3 (FITC) e anexina V (PE), incubadas com meio ou EGS por 2 hs à 37 ºC. (C, D, G e H) BMDCs foram preparadas, marcadas com anti-MHCII (FITC) e anexina V (PE) e incubadas como descrito em Material e Métodos. As células foram analisadas por microscopia de fluorescência (A-D) e citometria de fluxo (E-H). Figura representativa de 2 experimentos independentes realizados nas mesmas condições.

Nosso trabalho anterior sugeriu que a morte de linfócitos observada na presença de EGS de *A. aegypti* é dependente de caspase-3 e de caspase-8 (BIZZARRO et al., 2013). Para confirmar essa possibilidade, investigamos se a inibição de caspases em linfócitos poderia de fato abolir a atividade do EGS. Assim, pré-incubamos as células com um inibidor de caspase de amplo espectro, o Q-VD, ou o solvente DMSO como controle, por 1 h à 37 ºC. A seguir, as células foram incubadas com meio somente ou EGS por mais 2 hs, como descrito em Material e Métodos. Podemos observar que as células controle incubadas apenas com o solvente DMSO (Figura 8A) ou com o inibidor de caspases Q-VD (Figura 8B), foram igualmente afetadas e pelo EGS. Esse resultado sugere que a morte induzida pelo EGS pode ser independente de caspase e contrasta com nossos resultados anteriores. A explicação para isso pode estar em diferenças no delineamento experimental dos ensaios, que serão comentadas na discussão.

Para confirmar que o inibidor de caspases estava realmente funcionando, pré-incubamos as células com a mesma concentração de Q-VD-OPh utilizada anteriormente e induzimos a morte celular de linfócitos utilizando Actinomicina D. Podemos observar que a incubação de linfócitos com Actinomicina D induz a morte celular de linfócitos $TCD4^+$ (Figura 9A) e a pré-incubação com o inibidor de caspase bloqueia a indução da apoptose (Figura 9B), comprovando que a atividade do inibidor está preservada.

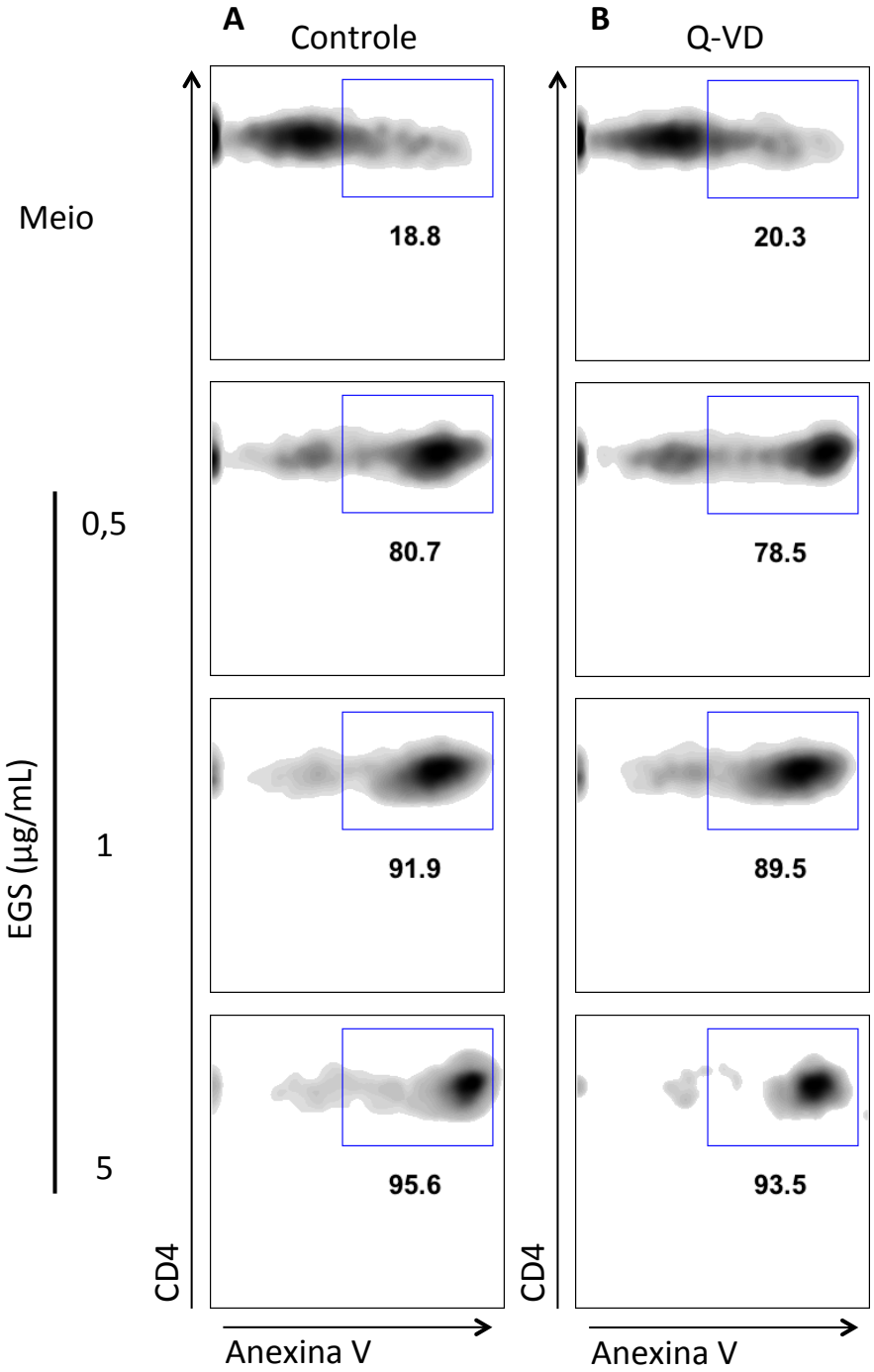


Figura 8 - Avaliação da ativação de caspases nas células incubadas com EGS de *A. aedgypi.* Células foram previamente incubadas com Q-VD-OPh (inibidor de caspases 3, 8, 9 10 e 12), por 1 h à 37 ºC e 5% CO_2, incubadas com meio ou EGS por 2 hs nas concentrações indicadas e marcadas com DAPI, anti-CD3, anti-CD4 e anexina V para avaliação por citometria de fluxo. Figura representativa de 2 experimentos independentes realizados nas mesmas condições.

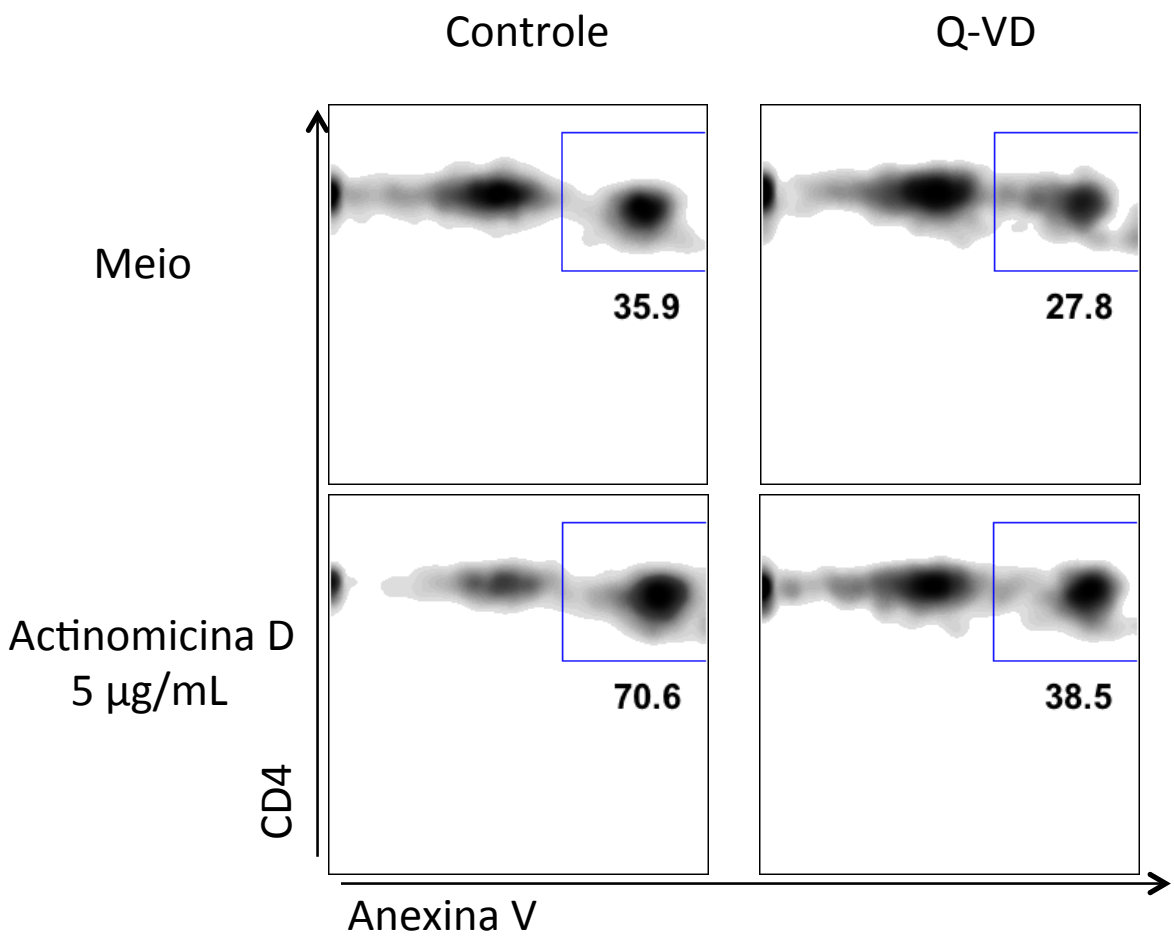


Figura 9 - Avaliação da atividade do inibidor de caspases. Células foram previamente incubadas com Q-VD-OPh (inibidor de caspases 3, 8, 9 10 e 12), por 1 h à 37 ºC e 5% CO_2, incubadas com meio ou Actinomicina D por 24 h na concentração indicada e marcadas com DAPI, anti-CD3, anti-CD4 e anexina V para avaliação por citometria de fluxo. Figura representativa de 2 experimentos independentes realizados nas mesmas condições.

4.4 Identificação da molécula responsável pela atividade citotóxica através de fracionamento por HPLC e espectrometria de massas

Na tentativa de identificar a molécula responsável pela atividade observada, o EGS total foi fracionado por HPLC conforme descrito em Material e Métodos e as frações coletadas foram testadas no ensaio de proliferação de linfócitos. A inibição da proliferação ocorreu nas frações com massa molecular próximas a 400 kDa, de acordo com a curva padrão realizada nas mesmas condições (Figura 10). As frações escolhidas foram divididas em dois grupos (azul e vermelho) e enviadas para análise por espectrometria de massas em um Centro de Facilidades ("*core facility*") do NIAD/NIH. Em vermelho estão as frações F1, F2, F3 e F4 que foram previamente analisadas e apresentadas em nossa Dissertação de Mestrado defendida em 2012 (BIZZARRO, 2012). Em azul estão as frações adjacentes F1', F2' e F3', que foram posteriormente analisadas por espectrometria de massas e comparadas com a análise das frações em vermelho para confirmação dos resultados prévios obtidos. O perfil da fragmentação iônica dos componentes detectados em cada fração foi comparado com uma base de dados composta pelo genoma e pelo transcriptoma de glândula salivar de *A. aegypti* e as proteínas correspondentes foram identificadas. Os resultados completos da análise de cada fração podem ser observados nos Apêndices 1 ao 7.

Na primeira análise, realizada com as frações em vermelho, observamos que de 13 proteínas identificadas, 7 também apareceram em F4 que não está relacionada com a inibição da proliferação e portanto foram descartadas da análise (Figura 11 A-G). Entre as 6 proteínas restantes, detectadas apenas em F1, F2 e F3, onde a atividade de inibição está presente, apenas 3 apresentaram abundância relativa correspondente ao perfil de atividade observado no ensaio *in vitro*, ou seja, abundância relativa alta em F2, moderada em F1 e F3 e ausência de detecção em F4 (Figura 11L, 11M e 11N). Duas dessas proteínas possuem massa molecular baixa, com 31.0 e 97.9 kDa (Figura 11L e 11M, respectivamente) e por isso foram descartadas, enquanto a terceira tem massa molecular de 185kDa, sendo considerado portanto o candidato mais provável responsável pela atividade (Figura 11N). Na análise das frações em azul, foram selecionados somente os candidatos que apareceram nas frações F1'/F2'/F3', num total de 31 proteínas. Destas, as 6 proteínas apresentadas na Figura 12 apresentaram um perfil de

abundância relativa condizente com a atividade observada no ensaio, ou seja, maior quantidade em F2’ (efeito máximo) e menor quantidade em F1’ e F3’ (efeito parcial).

Ao comparamos as duas análises, verificamos que 3 proteínas (Figura 12A, 12B e 12C) apareceram também na fração F4’ da análise anterior (sem atividade no ensaio), e por isso provavelmente não estão relacionadas com a inibição da proliferação. Outras duas proteínas (Figura 12D e 12E) não apareceram nas frações F1, F2 e F3 na análise original e portanto também foram descartadas. A proteína que restou (AAEL003655 - Figura 12F) foi a mesma encontrada na análise anterior, confirmando a hipótese de que esse seja o candidato mais provável responsável pela atividade, uma vez que apareceu nas duas análises (F1’, F2’ e F3’ em azul e F1, F2, e F3 em vermelho), mas não na fração F4.

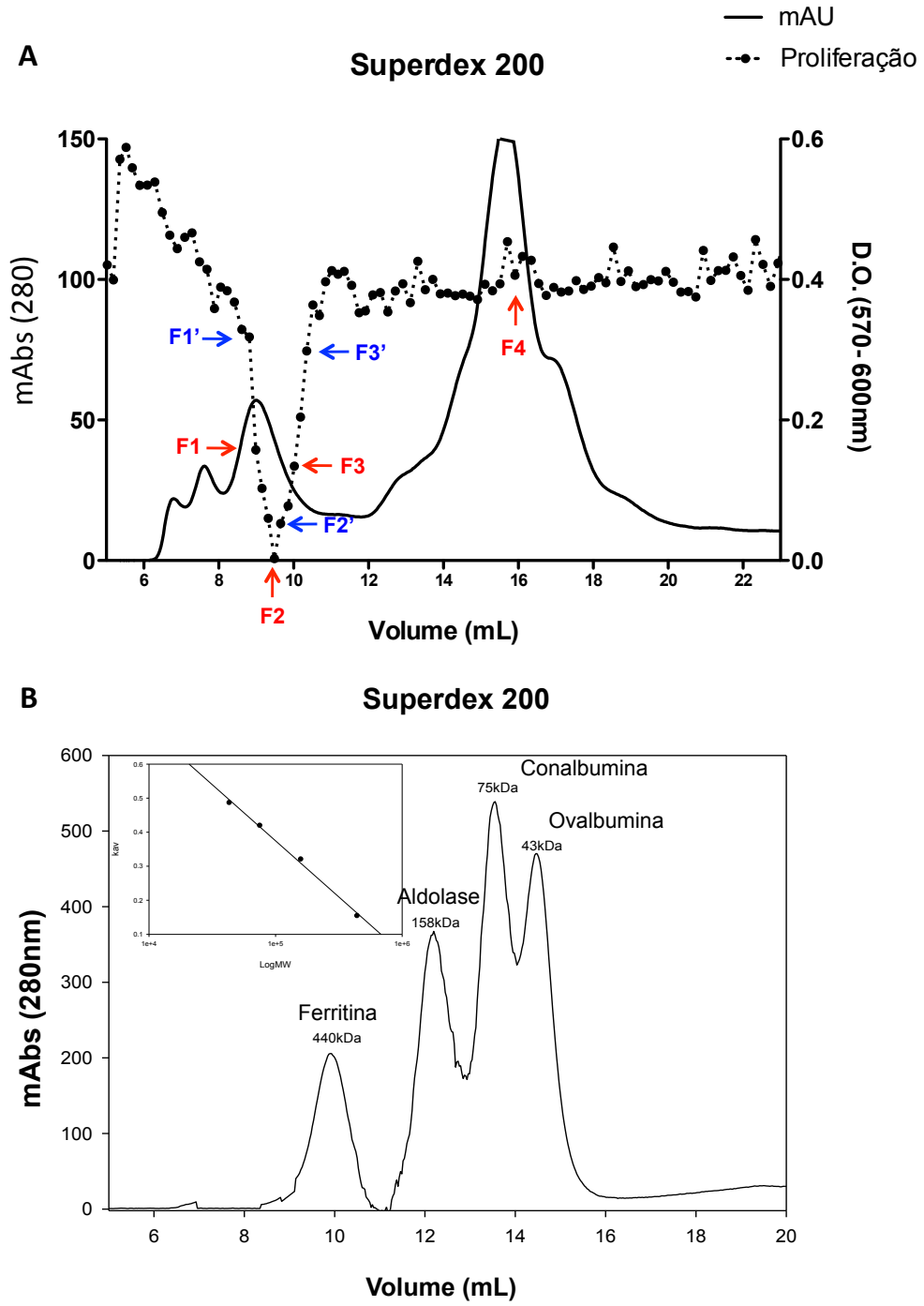


Figura 10 - Fracionamento do EGS de *A. aegypti* por HPLC e avaliação da proliferação de linfócitos induzida por Con A na presença de cada fração. O EGS foi filtrado por um Microcon YM-100 e o material retido fracionado por HPLC utilizando coluna Superdex 200. (A) As linhas contínuas representam os picos dos componentes eluídos. A linha pontilhada representa a inibição causada por cada fração no ensaio de proliferação de linfócitos T. As setas em vermelho indicam as frações coletadas para a análise de espectrometria de massas apresentada previamente na dissertação de mestrado (F1, F2, F3 e F4). As setas em azul indicam frações adjacentes (F1', F2' e F3') escolhidas para nova análise por espectrometria de massas. (B) A cromatografia de uma curva padrão composta por proteínas com pesos moleculares conhecidos e indicados na figura, foi realizada utilizando a mesma coluna (Superdex 200) nas mesmas condições.

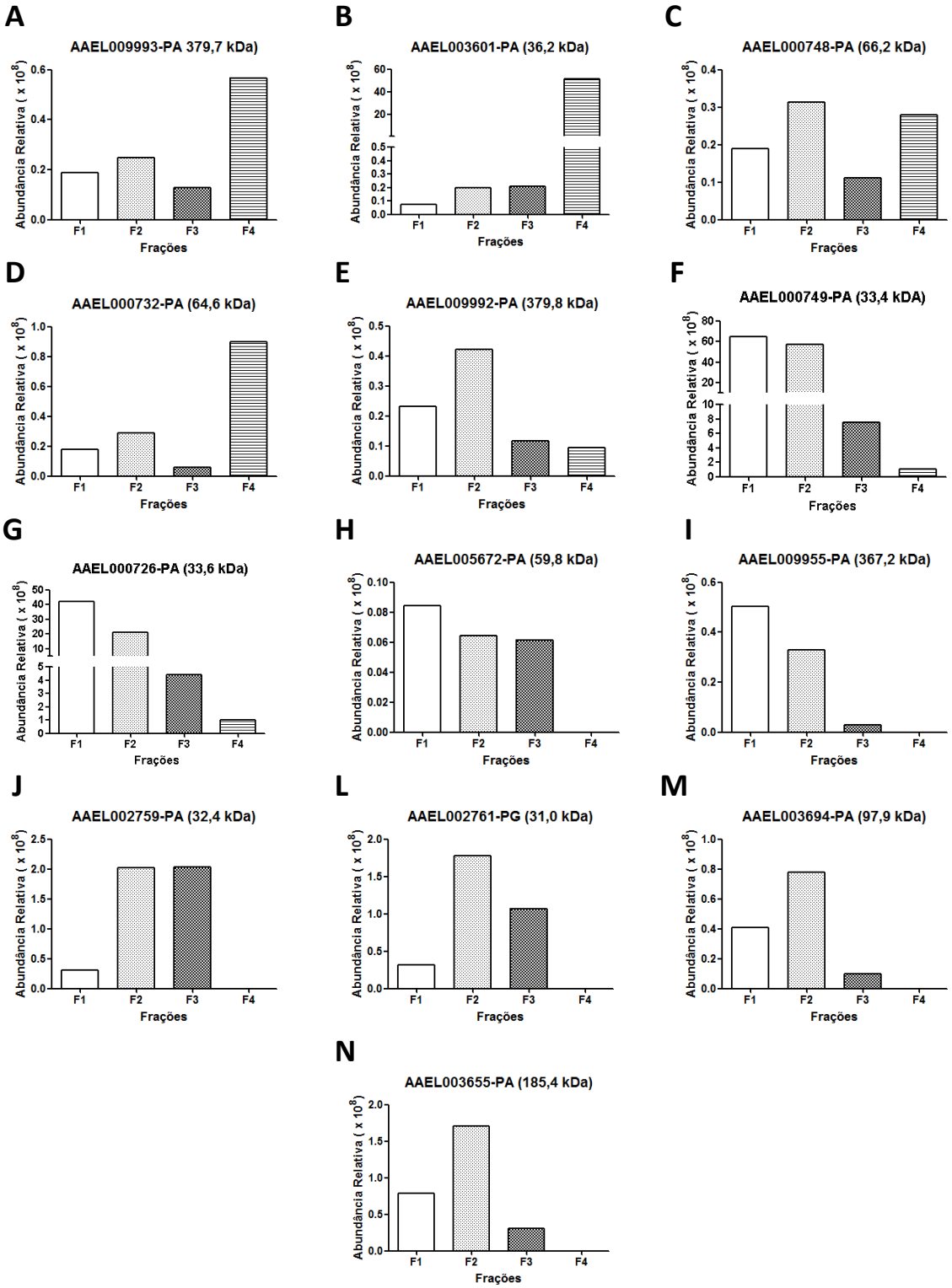


Figura 11 - Abundância relativa das proteínas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 mostradas em vermelho na Figura 10, determinadas por espectrometria de massas. O perfil da fragmentação iônica gerada pela espectrometria de massas de cada fração foi comparado com o genoma e transcriptoma do *A. aegypti.* As análises de bioinformática revelaram os candidatos detectados nas frações analisadas.

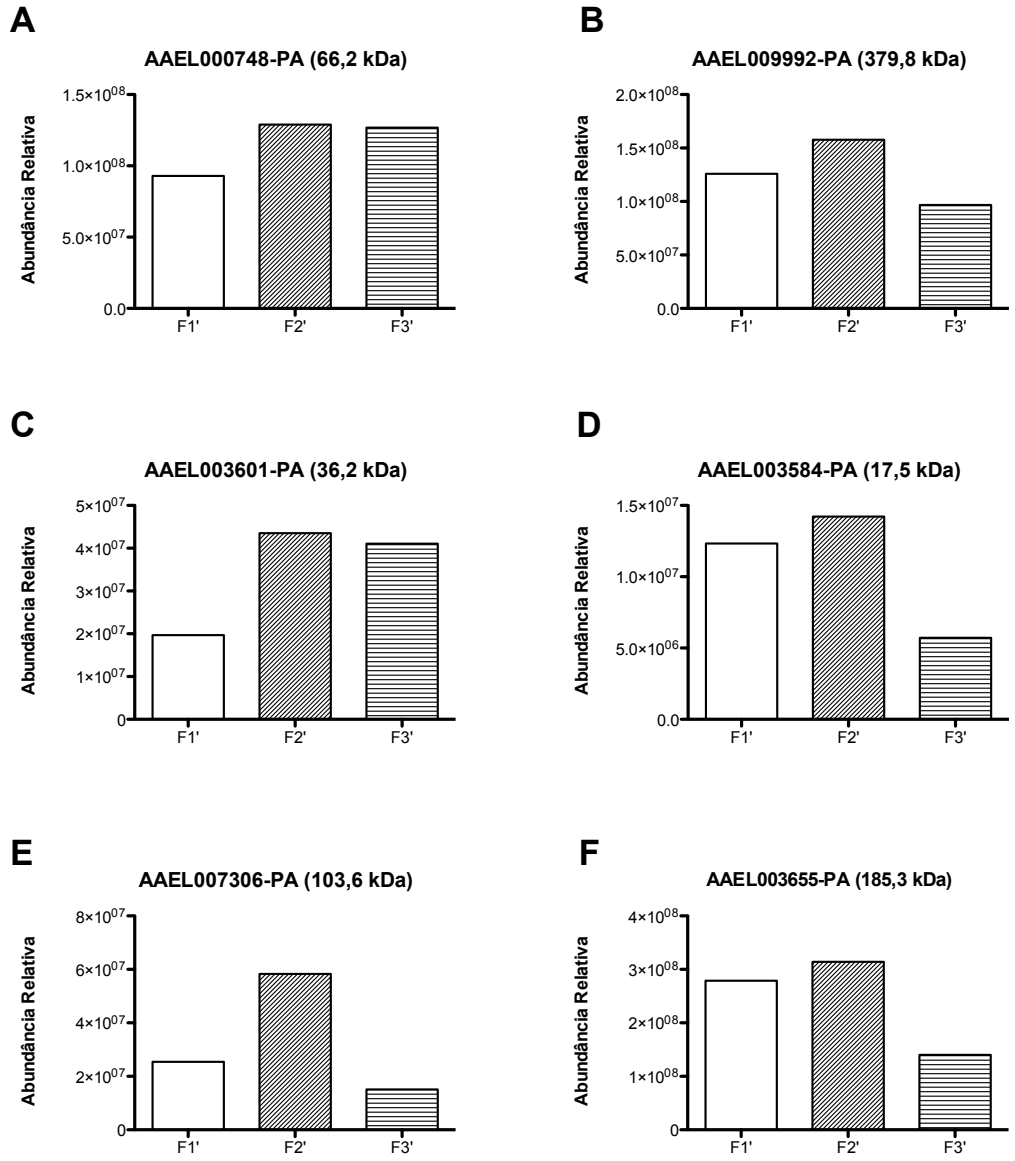


Figura 12 - Abundância relativa das proteínas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 mostradas em azul na Figura 10, determinadas por espectrometria de massas. O perfil da fragmentação iônica gerada pela espectrometria de massas de cada fração foi comparado com o genoma e transcriptoma do *A. aegypti.* As análises de bioinformática revelaram os candidatos detectados nas frações analisadas.

Surpreendeu-nos que o transcrito encontrado estava anotado no transcriptoma salivar de *A. aegypti* como uma proteína de 185,4 kDa, enquanto a purificação por HPLC indica algo em torno de 400 kDa. Isso sugeria que a proteína poderia formar um dímero ou mesmo um trímero, resistentes às condições da purificação e portanto eluídas em uma faixa mais alta de massa molecular. Porém, análises de bioinformática realizadas pelo Dr. José Marcos Ribeiro indicaram que esse transcrito estava na verdade truncado na anotação do genoma de *A. aegypti*. Por conta disso, foi realizado um novo sequenciamento em preparação de glândulas salivares do *A. aegypti* utilizando a tecnologia Illumina (seqüenciamento de nova geração) como descrito em Material e Métodos. Além disso, uma técnica para estender a sequência de nucleotídeos nas extremidades 5' e 3' (RACE – Rapid Amplification of cDNA ends) também foi utilizada, como descrito em Material e Métodos. Esse novo sequenciamento revelou um transcrito de cerca de 338,16 kDa, mais condizente com os dados do fracionamento por HPLC, cuja a sequência proteica completa está no Apêndice 8 e sua organização genômica, demonstrada na Figura 13A. Análises de bioinformática subsequentes demostraram que a molécula AAEL003655 apresenta dois sítios de clivagem para furina, um na posição 904 e outro na posição 2669, como mostrado na Figura 13A. Além disso, também existem os seguintes domínios conservados: RhsA, RHS repeat-associated core, Tox-SGS e um domínio transmembrana, todos localizados na porção C-terminal da molécula, de acordo com a seção "Conserved Domains" do site NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd) (Figura 13A e 13B).

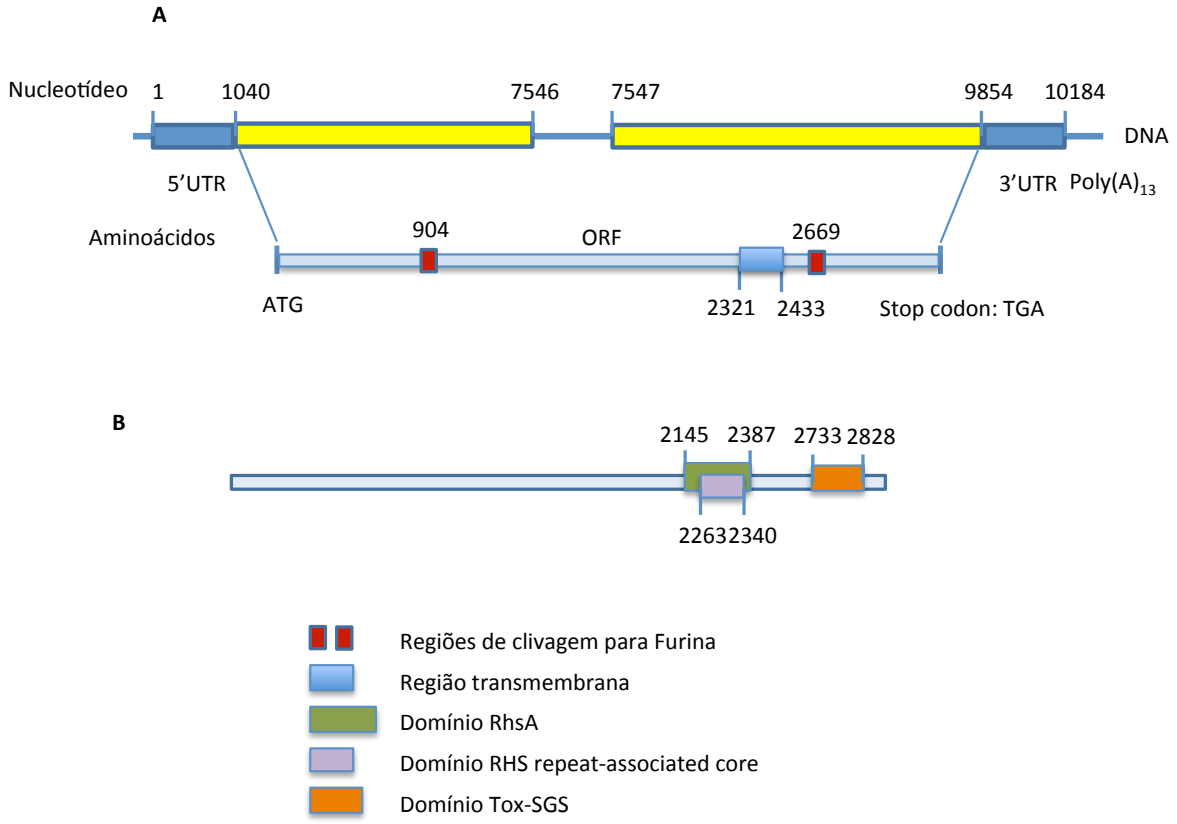


Figura 13 - Organização genômica do transcrito AAEL003655. (A) A sequência de nucleotídeos do transcrito AAEL003655 é representada em azul escuro, com a fase de sequência aberta (*Open Reading Frame – ORF)* em amarelo e um íntron na posição 7546. A proteína corresponde a 2937 amino ácidos e peso molecular de 338.16 kDa. Análises de bioinformática revelaram dois sítios de clivagem para Furina, nas posições 904 e 2669, além de uma região transmembrana localizada na posição 2321 a 2433. (B) Os domínios RhsA, RHS repeat-associated core e Tox-SGS são encontrados nas posições demonstradas na figura de acordo com a análise realizada no *Conserved Domains* do site http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cdd.

4.5 Produção de proteínas recombinantes e avaliação de suas atividades biológicas

Com o objetivo de confirmar se o candidato identificado é de fato o responsável pela atividade citotóxica em linfócitos do EGS de *A. aegypti*, realizamos a expressão de algumas proteínas recombinantes (PR) como descrito em Material e Métodos. Anticorpos policlonais contra essas proteínas foram gerados pela imunização de camundongos. A Figura 14 mostra que anticorpos produzidos contra a PR1 (anti-PR1) são capazes de reconhecer por Western Blot proteínas com mais de 200 kDa no EGS (Figura 14A), porém não houve reconhecimento da proteína nativa por ELISA (Figura 14B). Isso sugere que o dobramento da proteína não ocorreu de forma adequada e somente a estrutura primária (epítopo linear) pode ser reconhecida. Fizemos uma nova tentativa para gerar uma PR abrangendo uma porção maior da molécula, como descrito em Material e Métodos. Camundongos foram imunizados com essa proteína e tiveram o soro coletado. Os anticorpos foram purificados e testados por ELISA e Western Blot. Observamos que os anticorpos contra PR2 (anti-PR2) foram capazes de reconhecer componentes do EGS nas duas técnicas realizadas (Figura 15A e 15B), ao contrário do que acontece para PR1.

Como a PR2 foi capaz de ligar tanto componentes nativos do EGS (ELISA) quanto desnaturados (Western Blot), testamos também se seria capaz de exercer o mesmo efeito inibidor sobre a proliferação de linfócitos observado com o EGS. Para isso, realizamos um ensaio de proliferação de linfócitos onde as células foram incubadas com concentrações crescentes da proteína e estimuladas com Con A. Na Figura 16 é possível observar um aumento da taxa de proliferação nas células estimuladas por Con A e a incubação com EGS inibe essa proliferação. Já a incubação com diferentes concentrações da PR2 não alterou a proliferação estimulada pela Con A (Figura 16).

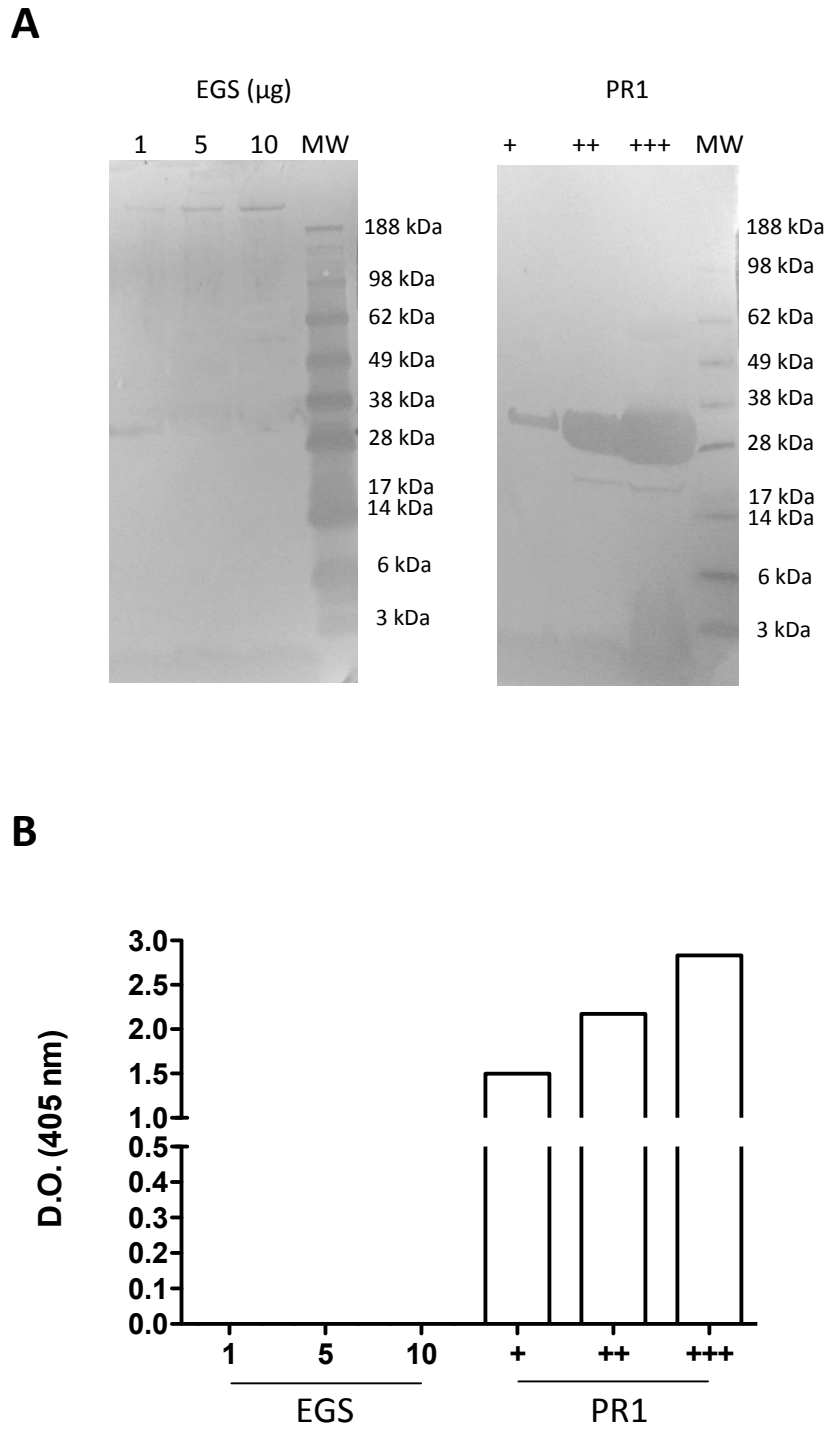
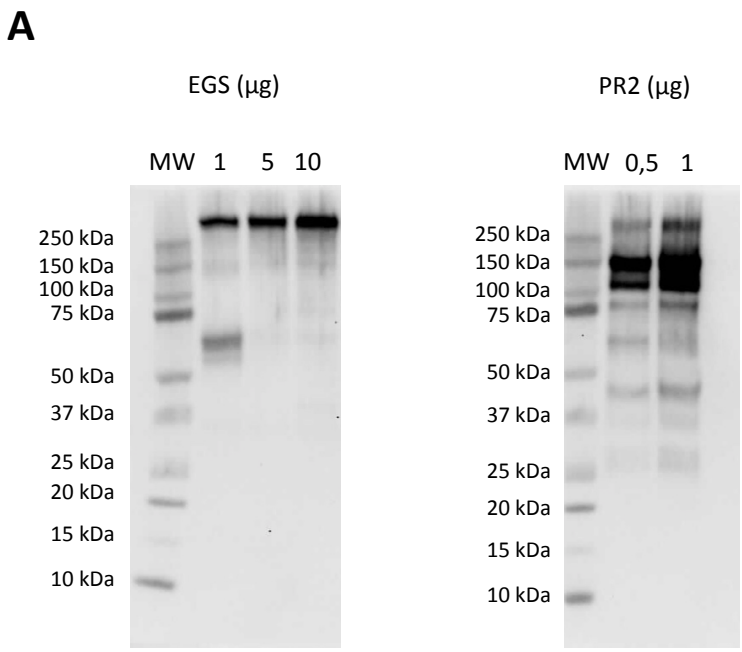


Figura 14 - Teste de reconhecimento dos anticorpos contra a PR1. (A) O EGS e a PR1 foram incubados com o tampão de amostra e agente redutor, fervidos por 5 min à 90 ºC e então aplicados em gel de poliacrilamida Bis-Tris 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e bloqueadas com TBST/SFB 5%. Após lavagem, a membrana foi incubada por 1 h com anticorpos anti-PR1 (1:100), lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina para detecção com ECL. (B) EGS e PR1 foram diluídos em tampão carbonato de sódio pH 9,5 e incubados em placas de 96 poços *overnight* à 4 ºC. A seguir, a placa foi lavada, bloqueada com PBS/SFB 5%, incubada com anti-PR1, lavada novamente e incubada com anti-mouse HRP para detecção com TMB.



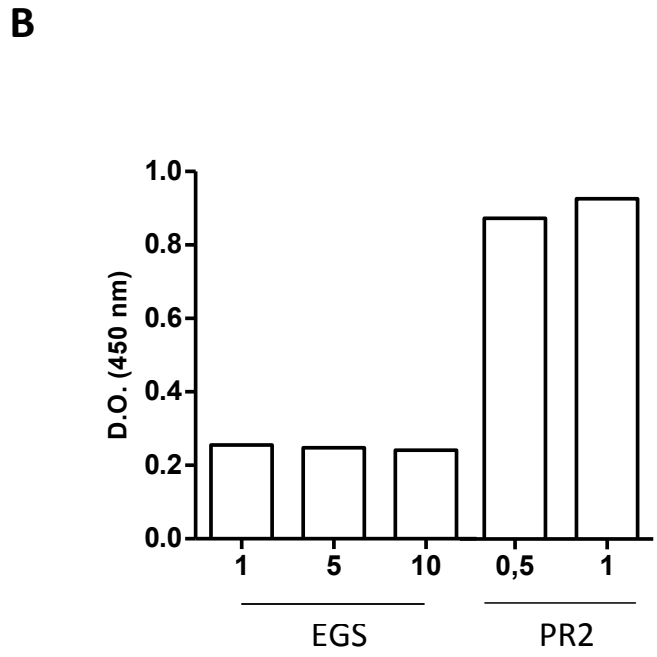


Figura 15 - Teste de reconhecimento dos anticorpos contra a PR2. (A) O EGS e a PR2 foram incubados com o tampão de amostra e agente redutor, fervidos por 5 min à 90 ºC e então aplicados em gel de poliacrilamida Bis-Tris 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e bloqueadas com TBST/SFB 5%. Após lavagem, a membrana foi incubada por 1 h com anticorpos anti-PR2 (1:100), lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com HRP para detecção com ECL. (B) EGS e PR2 foram diluídos em tampão carbonato de sódio pH 9,5 e incubados em placas de 96 poços *overnight* à 4 ºC. A seguir, a placa foi lavada, bloqueada com PBS/SFB 5%, incubada com anti-PR2, lavada novamente e incubada com anti-mouse HRP para detecção com TMB.

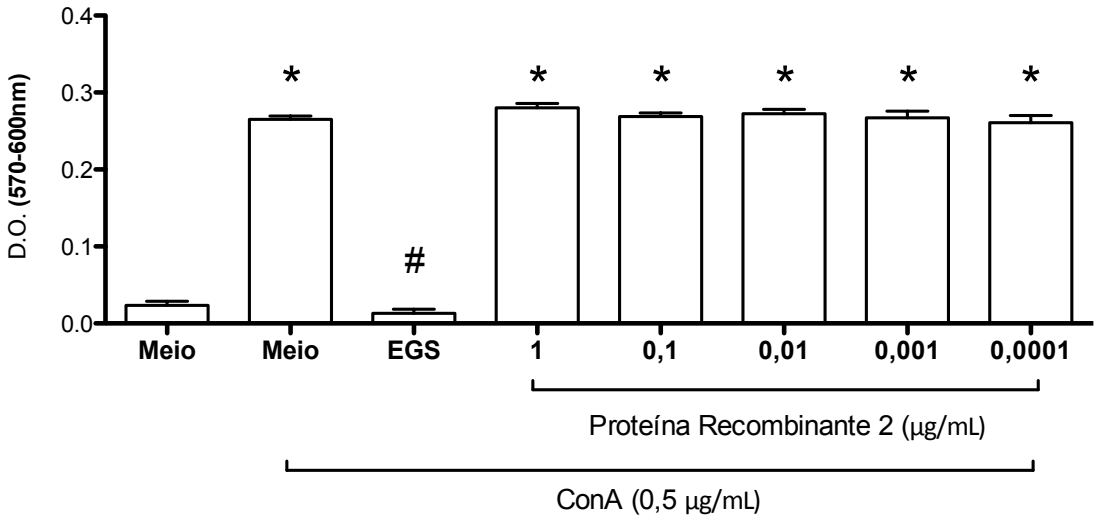


Figura 16 - Teste de proliferação de linfócitos com a PR2. Células do baço foram incubadas com meio, EGS (5 µg/mL) ou PR2 (nas concentrações indicadas), estimuladas com Con A por 72 hs e a proliferação foi avaliada indiretamente pela adição de resazurina, fator colorimétrico que mede o metabolismo celular. Figura representativa de 2 experimentos independentes realizados nas mesmas condições. * $p < 0,05$ *versus* grupo incubado com meio somente. # $p < 0,05$ *versus* grupo estimulado com Con A.

4.6 Produção de anticorpos monoclonais contra frações ativas do EGS e avaliação de sua atividade

Como não tivemos sucesso em produzir uma PR que mimetizasse o efeito encontrado no EGS bruto, nosso próximo passo foi gerar anticorpos contra a fração ativa do EGS para utilizá-los em ensaios de depleção da atividade. Para isso, realizamos um novo fracionamento do EGS de *A. aegypti* em colaboração com o Dr. Pedro Ismael (Laboratório Especial de Toxicologia Aplicada do Instituto Butantan). A atividade de cada fração foi novamente testada no ensaio de proliferação e as 3 frações responsáveis pela inibição foram coletadas e utilizadas para imunizar camundongos BALB/c como descrito em Material e Métodos.

Após cada imunização, uma alíquota de soro dos animais foi coletado e testado por ELISA, para confirmar a reatividade com o EGS. Observamos níveis detectáveis de IgG2a (Figura 17A) e IgG1 (Figura 17B) específicos para o EGS já à partir da segunda imunização, que mantiveram-se altos após a terceira imunização. Utilizamos o soro desses animais numa tentativa de neutralizar o efeito de inibição da proliferação de linfócitos causada pelo EGS. Para isso, o soro imune e o soro de animais controles (não imunizados) foram pré-incubados por 30 min com EGS e adicionados à cultura de linfócitos seguido de estimulação com Con A. O soro imune foi capaz de reverter a inibição da proliferação de linfócitos causada por 1 µg/mL de EGS, mas não por 10 µg/mL em comparação com o soro controle (Figura 17C). A ausência de inibição na presença da concentração mais alta de EGS provavelmente ocorreu porque não havia anticorpos suficientes na diluição de soro utilizada para neutralizar todo o inibidor presente. Seria preciso uma pureza/quantidade maior de anticorpos específicos contra a molécula responsável por essa atividade para que ocorresse a neutralização de uma concentração maior de EGS. De qualquer maneira, nossos resultados sugerem que ocorreu a produção de anticorpos neutralizadores após a imunização de camundongos com as frações ativas no ensaio de proliferação (Figura 17).

Para a produção de anticorpos monoclonais, hibridomas foram gerados através da fusão dos esplenócitos dos animais imunizados com células de melanoma, procedimento realizado em colaboração com o Dr. Juliano Bordignon do Laboratório de Virologia Molecular (ICC/FIOCRUZ-PR). Os sobrenadantes de cultura desses hibridomas foram testados por Western Blot (Figura 18A) e por ELISA (Figura 18B) para a reatividade com o EGS. Nossos resultados mostram que alguns

clones reconheceram o EGS de forma mais eficiente, enquanto outros o reconheceram fracamente, de forma inespecífica ou não reconheceram (Figura 18). Dessa forma, selecionamos os hibridomas que apresentaram um reconhecimento maior das proteínas com alto peso molecular do EGS (clones 6, 7 10, 11 e 12), os quais teriam maior chance de se ligar a molécula de interesse e neutralizar sua atividade.

Para refinar o experimento de neutralização da atividade, anticorpos foram purificados do sobrenadante desses hibridomas. Foram incluídos neste ensaio os anticorpos anti-PR2 descritos anteriormente. Esses anticorpos foram utilizados como anticorpos de captura e após as lavagens e o bloqueio descritos em Material e Métodos, os poços foram incubados com EGS diluído em PBS. Ao final da incubação, o PBS contendo proteínas do EGS que não permaneceram ligadas aos anticorpos foi removido e adicionado a tubos contendo células do baço de camundongos BALB/c. Essas células foram incubadas por 2 hs à 37 ºC e a seguir analisadas por citometria de fluxo para a marcação de anexina V e expressão de CD62L. A Figura 19A mostra que o EGS proveniente de incubações com alguns dos anticorpos foi capaz de diminuir a indução da morte celular. Isso sugere que alguns anticorpos foram capazes de se ligar à proteína responsável pela atividade citotóxica presente no EGS, diminuindo sua disponibilidade na suspensão e portanto diminuindo seu efeito nas células. A concentração de um dos anticorpos (Ac5) foi duplicada, o ensaio de captura repetido e observamos uma diminuição ainda maior na marcação com anexina V, confirmando a ligação do mesmo à proteína citotóxica do EGS (Figura 19A). Além disso, a porcentagem de células marcadas com anexina V foi inversamente proporcional a expressão de CD62L (Figura 19B). Ou seja, quanto menor a quantidade da proteína citotóxica disponível, menor a marcação com anexina V e maior a expressão de CD62L.

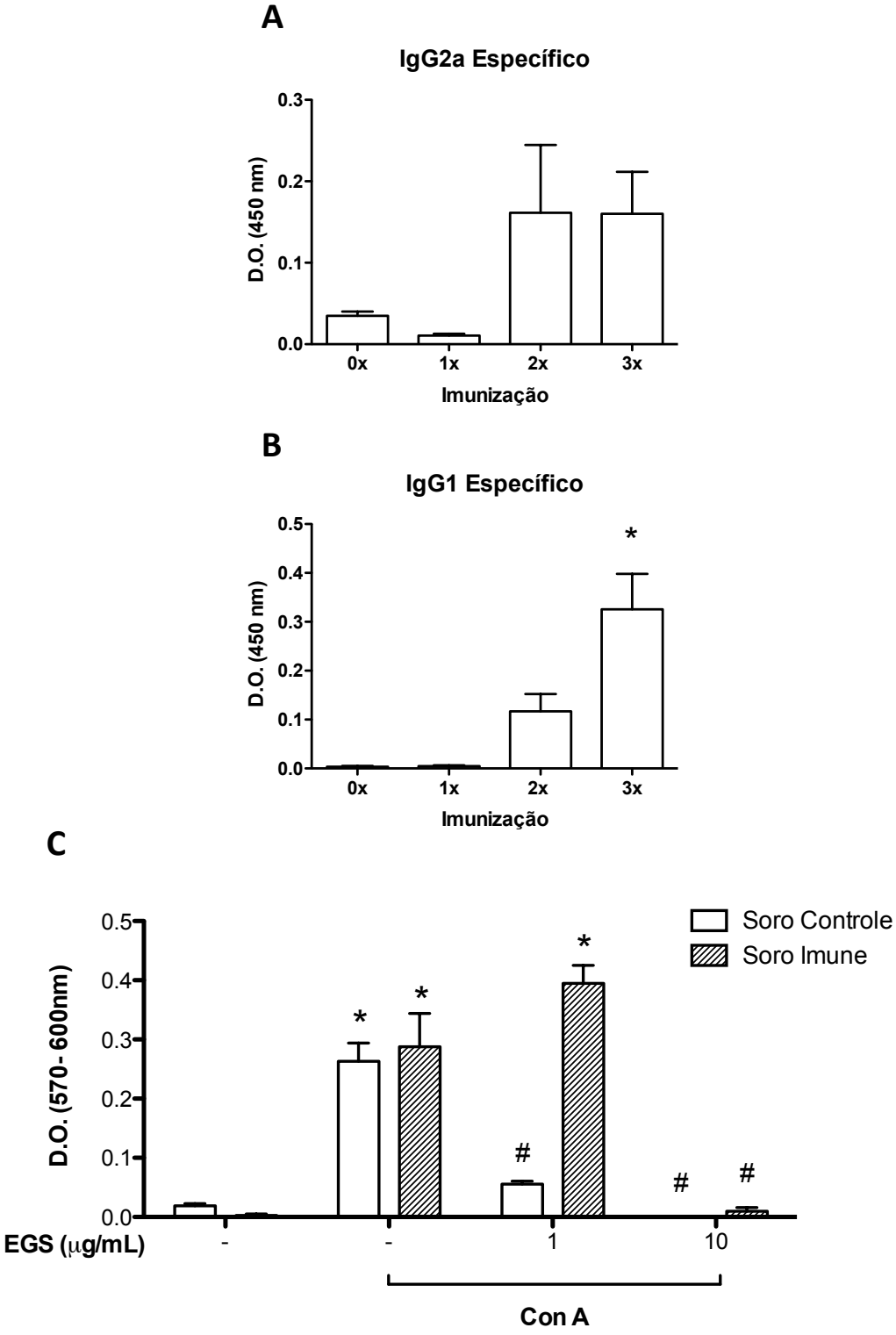


Figura 17 - Determinação dos anticorpos no soro de camundongos imunizados e neutralização da atividade utilizando o soro imune. Camundongos foram imunizados com as frações ativas do EGS. Os níveis dos anticorpos (A) IgG2a e (B) IgG1 foram determinados no soro desses animais por ELISA. (C) Células do baço foram incubadas na presença de 10% do soro controle ou soro imune e estimuladas com Con A. A proliferação foi avaliada utilizando uma medida colorimétrica por resazurina como descrito em Material e Métodos. * $p < 0,05$ *versus* grupo incubado com meio somente. # $p < 0,05$ *versus* grupo estimulado com Con A.

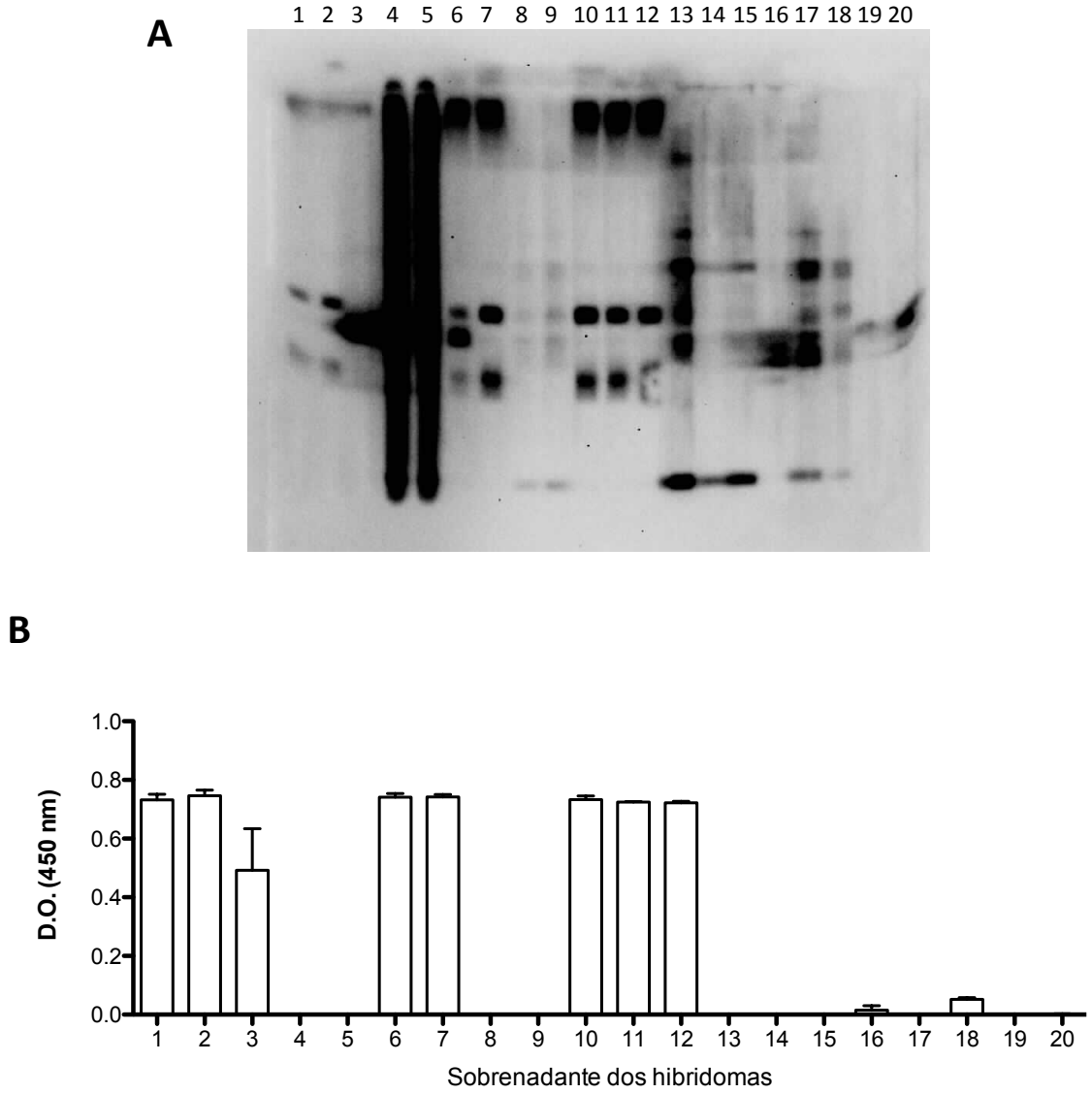


Figura 18 - do EGS pelos anticorpos monoclonais. O EGS foi incubado com LDS e agente redutor, fervido por 5 min à 90 ºC e então aplicado em gel de poliacrilamida Bis-Tris 4-12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e bloqueadas com TBST/SFB 5%. Após lavagem, a membrana foi incubada por 1 h com o sobrenadante dos hibridomas, lavada novamente e incubada com anticorpo secundário anti-mouse conjugado com HRP para detecção com ECL. (B) EGS foi diluído em tampão carbonato de sódio pH 9,5 e incubado em placas de 96 poços *overnight* à 4 ºC. A seguir, a placa foi lavada, bloqueada com PBS/SFB 5%, incubada com o sobrenadante dos hibridomas, lavada novamente e incubada com anti-mouse HRP para detecção com TMB.

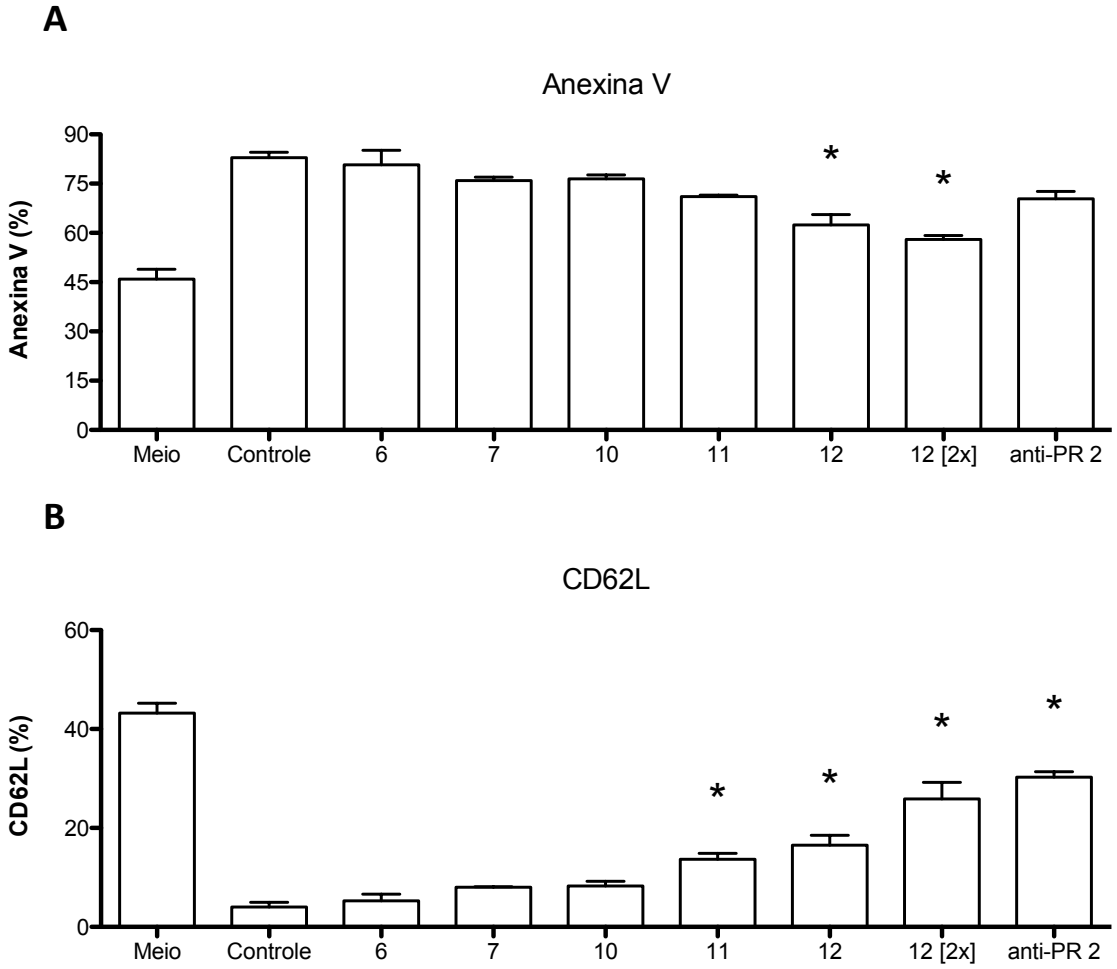


Figura 19 - Ensaio de neutralização da atividade. Os anticorpos monoclonais e o anticorpo policlonal anti-PR2 foram diluídos em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5 e incubados *overnight* a 4 ºC em placas de 96 poços. A placa foi lavada com PBS/Tween 0,05% e bloqueada com PBS/SFB 5% por 1 h. Após esse período, a placa foi lavada novamente e incubada por 2 horas com EGS (0,5 µg/mL) diluído em PBS. Ao final da incubação, o PBS contendo proteínas do EGS que não permaneceram ligadas aos anticorpos foi removido e adicionado a tubos contendo células do baço de camundongos. Essas células foram incubadas por 2 horas à 37 ºC e a seguir analisadas por citometria de fluxo para a marcação de anexina V (A) e expressão de CD62L (B). Figura representativa de 2 experimentos independentes. * $p < 0,05$ *versus* grupo Controle.

4.7 RNA de interferência

Uma outra abordagem que utilizamos para comprovar que o produto do transcrito AAEL003655 é o responsável pela atividade citotóxica em linfócitos foi utilizar a técnica do RNA de interferência (RNAi) para silenciar o gene alvo no mosquito. Para tanto foi sintetizada RNA de fita dupla do gene AAEL003655 (ds3655) e, como controle do experimento, foram sintetizadas RNA de fita dupla para outra molécula com mais de 380kDa AAEL009992 (ds9992) e para o promotor Lacz (dsLacz). Um total de 50 mosquitos foram inoculados na cavidade torácica com cada uma das preparações descritas acima e as glândulas salivares foram coletadas e preparadas para os ensaios subsequentes conforme descrito em Material e Métodos. A Figura 20 mostra que a expressão relativa dos transcritos AAEL003655 e AAEL009992 foi reduzida 58% e 86% respectivamente. A proliferação de linfócitos foi inibida quando EGS de mosquitos injetados com dsLacz e ds9992 foram adicionados a cultura, de maneira semelhante ao observado para o EGS de mosquitos não silenciados. Por outro lado, não houve alteração na proliferação de linfócitos incubados na presença de EGS dos mosquitos injetados com ds3655, condizente com o bloqueio da expressão da molécula ativa (Figura 21A). A morte celular também foi avaliada e mais uma vez, somente células incubadas com EGS de mosquitos injetados com dsLacz e ds9992 apresentaram aumento no número de células marcadas com anexina V, enquanto não foram observadas alterações nas células incubadas com EGS de mosquitos injetados com ds3655 (Figura 21B). Esses resultados mostram que mosquitos que tiveram o gene AAEL003655 silenciado perderam a capacidade de induzir a morte de linfócitos, confirmando então que esse transcrito, presente no EGS de *A. aegypti* é responsável pela inibição da proliferação e morte celular de linfócitos.

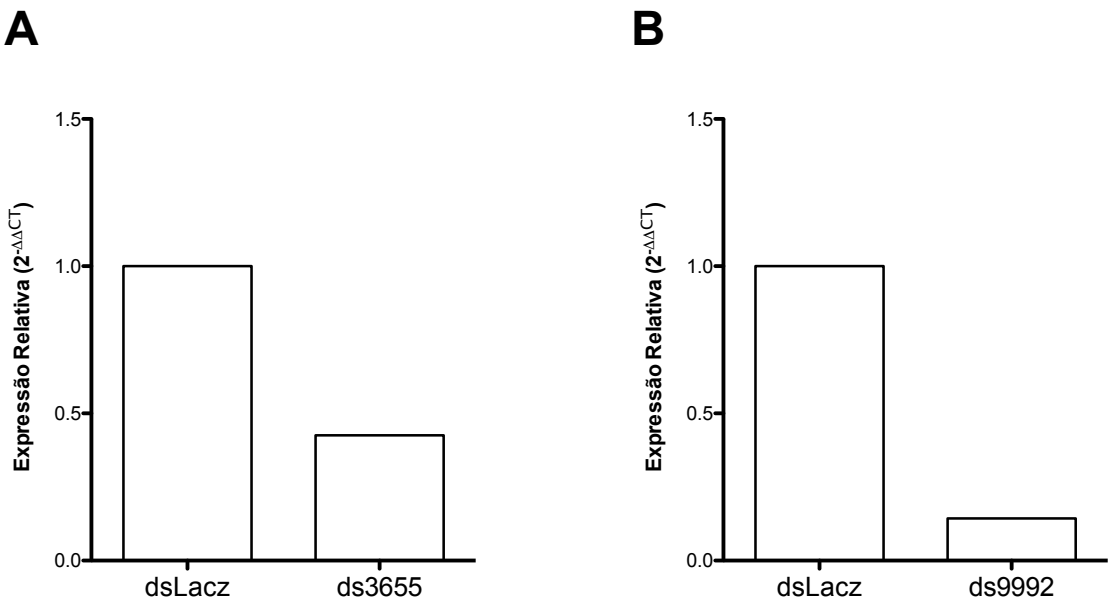


Figura 20 - Avaliação da expressão gênica dos mosquitos injetados com dsRNA. Três dias após a injeção com dsRNA, as glândulas salivares dos mosquitos injetados foram dissecadas em trizol. O cDNA foi sintetizado como descrito em Material e Métodos para avaliação da expressão dos transcritos AAEL003655 (A) e AAEL009992 (B) por qPCR. Mosquitoes injetados com ds3655 e ds9992 tiveram respectivamente 58% e 86% de redução da expressão do gene alvo em relação controle dsLacZ.

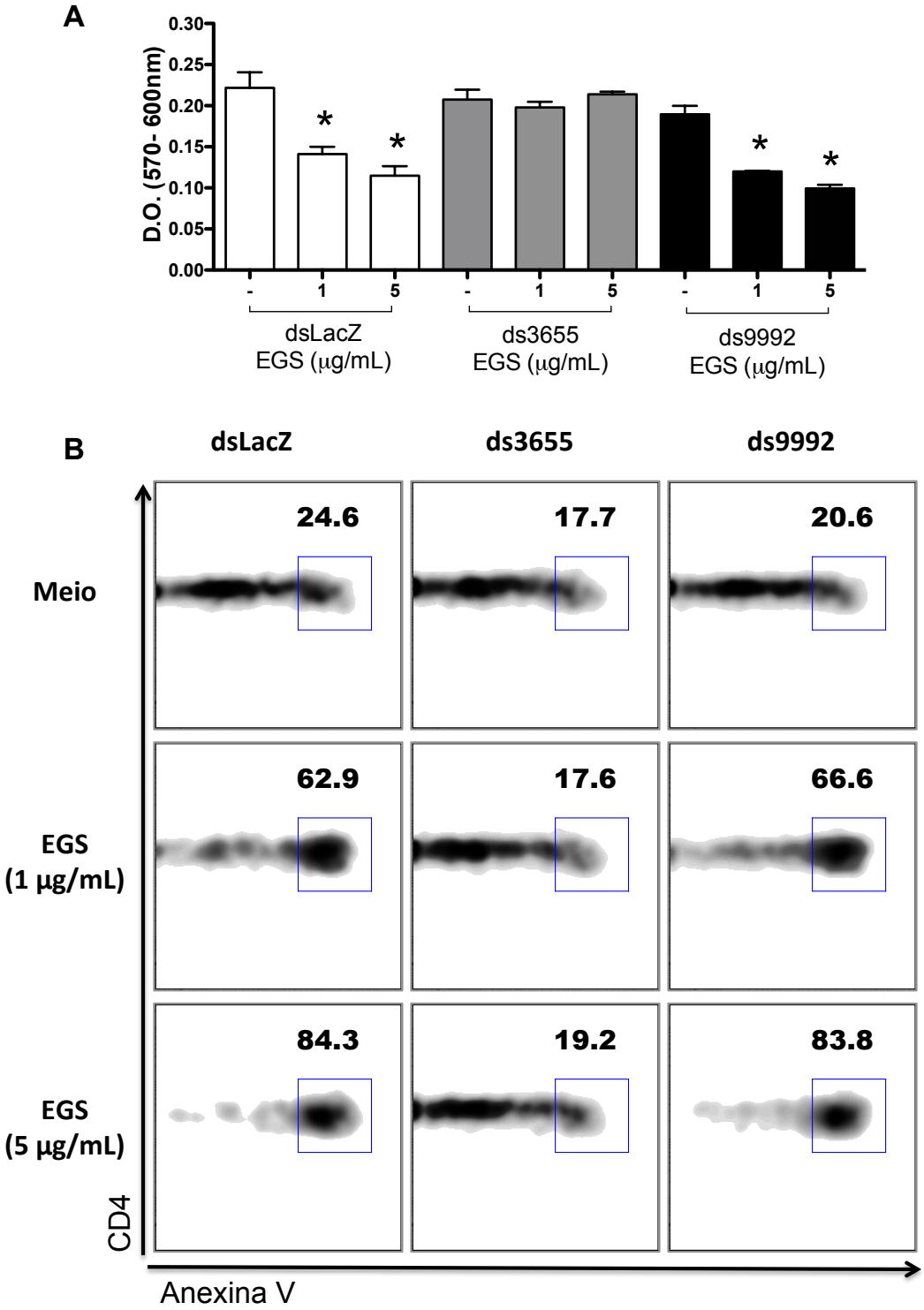


Figura 21 - Bloqueio da atividade citotóxica contra linfócitos T CD4$^+$ no EGS de *A. aegypti* por RNAi. Fêmeas de *A. aegypti* foram injetadas 1 dia após emergir com 276 nL de uma solução contendo 3mg/mL de dsRNA para os alvos: LacZ (controle), AAEL003655 (gene de interesse), AAEL009992 (gene presente no genoma do *A. aegypti* com peso molecular similar ao gene de interesse) utilizando um nanoinjetor. Linfócitos foram incubados com o extrato da glândula salivar (EGS) dos mosquitos injetados e a proliferação de linfócitos (A) e morte celular (B) foram avaliadas. Figura representativa de 1 experimentos. * $p < 0,05$ *versus* grupo incubado com meio somente (-).

4.8 Expressão do transcrito AAEL003655

A inibição da proliferação é uma atividade observada apenas em EGS de fêmeas de *A. aegypti* e não em machos dessa espécie (Figura 22A) corroborando com dados da literatura (WANASEN et al., 2004). Investigamos se o candidato AAEL003655 também está presente somente onde a atividade é observada. Para isso, corremos um gel com EGS de fêmeas e machos de *A. aegypti* e realizamos um Western Blot, revelando o candidato com anticorpos gerados contra PR1. A Figura 22B mostra que a proteína está presente apenas em fêmeas de *A. aegypti,* reforçando a hipótese de que está molécula é a responsável pela atividade inibidora.

Nós também investigamos em qual estágio da vida do mosquito o transcrito começa a ser detectado. Para isso, cDNA dos 4 estádios larvais, pupa macho, pupa fêmea, macho adulto e fêmea adulta divididos em tórax e abdome foi sintetizado conforme descrito em Material e Métodos e a expressão gênica foi quantificada por qPCR. A Figura 22C mostra que o transcrito é altamente expresso no tórax da fêmea, onde as glândulas salivares estão localizadas, e discretamente expresso no macho adulto e primeiros estádios larvais.

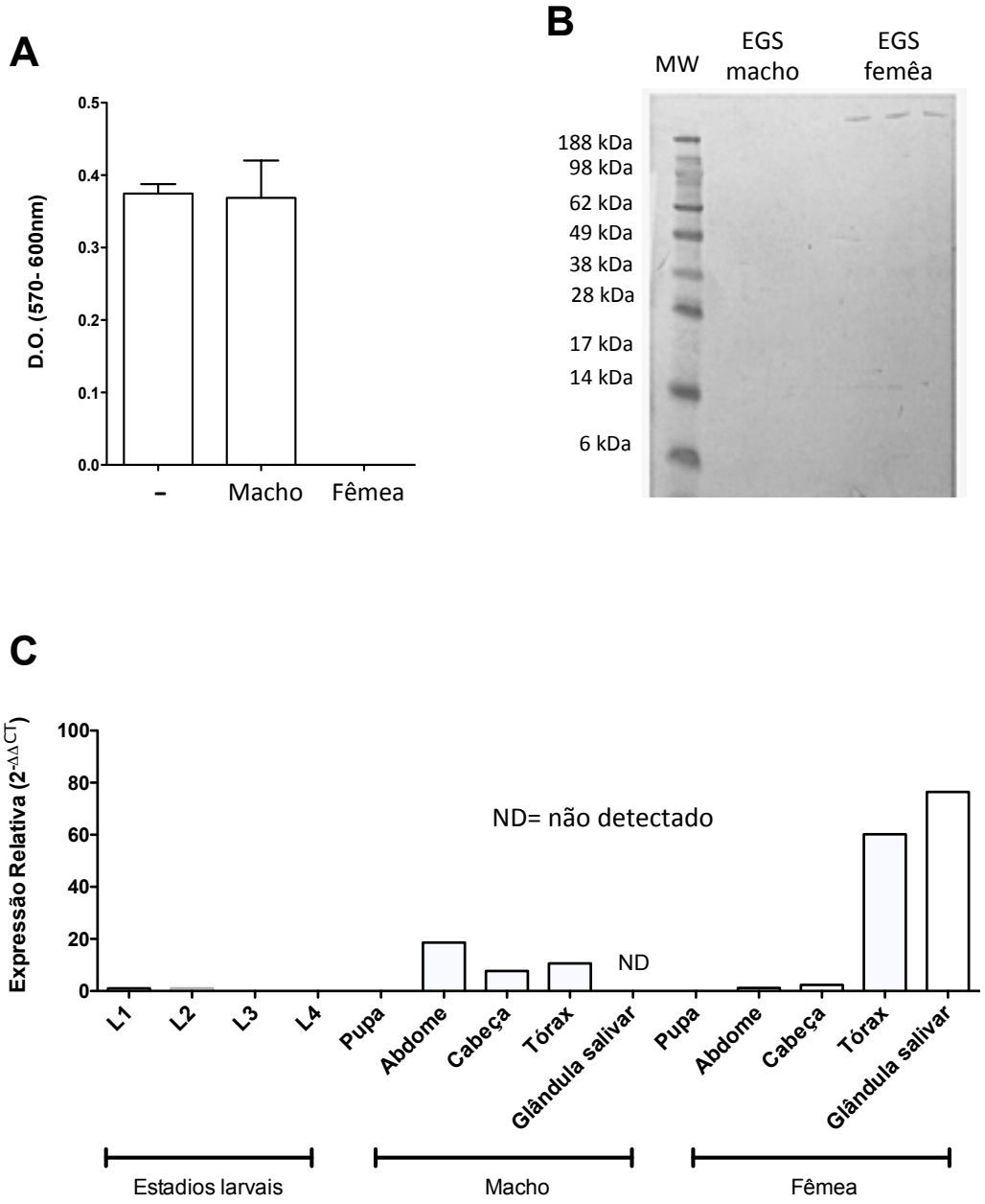


Figura 22 - Expressão do transcrito AAEL003655. (A) EGS de machos e fêmeas de *A. aegypti* foram testados na proliferação de linfócitos. (B) Membrana do Western blot com proteínas do EGS de machos e fêmeas do mosquito foi incubada com anti-PR1 e revelado com anticorpo anti-mouse conjugado com fosfatase alcalina. (C) Expressão relativa do transcrito AAEL003655 em diferentes estágios do ciclo de vida do mosquito. A normalização das amostras foi realizada de acordo com os níveis de amplificação da sequência da proteína ribossômica S7. A expressão gênica nos diferentes tecidos foi calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ em relação a larva no estádio L1. (ND = Não detectado).

5 DISCUSSÃO

Nas últimas 3 décadas, houve um investimento de alguns grupos de pesquisa em conhecer as atividades da saliva de artrópodes hematófagos sobre seus hospedeiros vertebrados, e assim gerar conhecimento sobre a relevância biológica destas moléculas e sua potencial participação na transmissão de patógenos (BERNARD et al., 2014; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA, 2013; STIBRANIOVA et al., 2013). No presente trabalho demonstramos que os componentes salivares de *A. aegypti* são capazes de seletivamente induzir a morte de linfócitos murinos. Essa atividade é caracterizada pela rápida exposição de fosfatidilserina na superfície celular, incorporação de PI ao DNA, diminuição do tamanho celular e perda da expressão de CD62L na superfície (Figuras 1, 2 e 6). Diferentes mecanismos moleculares de morte celular podem estimular ou suprimir a inflamação, portanto, elucidar o mecanismo pelo qual o EGS de *A. aegypti* induz a morte celular pode ajudar no entendimento dos efeitos da saliva desse mosquito no sistema imune do hospedeiro.

Algumas características da morte celular induzida pelo EGS de *A. aegypti* se assemelham a morte por apoptose, como por exemplo a redução no tamanho celular, que contrasta com o que acontece na necrose, onde as células ganham volume e perdem a integridade da membrana, extravasando componentes intracelular para o espaço extracelular (KROEMER et al., 2009; WALLACH et al., 2014). Além disso, o EGS induz a exposição de fosfatidilserina, que é um sinal para que células vizinhas fagocitem e eliminem essas células antes que elas percam a integridade da membrana e estimulem a inflamação (GREEN et al., 2016; SEGAWA; NAGATA, 2015). Em um trabalho publicado anteriormente pelo nosso grupo, foi demonstrado que a incubação de linfócitos do baço de camundongos na presença de EGS de *A. aegypti* por 4 hs estimulados por Con A poderia diminuir a expressão de pró-caspase-3 e pró-caspase-8, sugerindo que elas estariam sendo clivadas e portanto ativadas pelo EGS (BIZZARRO et al., 2013). Entretanto, esse dado contrasta com nossos resultados recentes, demonstrando que a presença de um inibidor de caspases (Q-VD-OPh) não altera a indução da morte celular, que portanto seria independente de caspases 3, 8, 9, 10 e 12 (Figuras 8 e 9). A explicação para isso pode estar nas diferenças no delineamento experimental, já que os tempos de incubação foram diferentes (2 horas no presente trabalho e 4

horas no trabalho publicado) e as condições da cultura de linfócitos também (células mantidas em meio apenas no presente trabalho e estimuladas com Con A no trabalho publicado). Conjuntamente, essas diferenças podem explicar os resultados contrastantes.

O EGS de *A. aegypti* parece abolir a expressão da molécula CD62L (Figura 6), também chamada de L-selectina, uma molécula importante na recirculação de linfócitos e outros leucócitos para órgãos linfóides ou tecidos inflamados (RAFFLER et al., 2005). Essa molécula é altamente expressa em linfócitos T *naïve,* células que são mais afetadas pelo EGS, e está diminuída em linfócitos ativados, células menos afetadas pelo EGS. Isso poderia indicar a existência de um potencial ligante para o EGS na superfície de linfócitos e essa ligação poderia impedir a marcação com anti-CD62L com os anticorpos utilizados nos experimentos de citometria de fluxo, causando a falsa impressão de que a célula estaria perdendo a expressão dessa molécula. De fato, em nossos experimentos não é possível saber se o CD62L está sendo clivado, internalizado ou ligado pelo EGS. Um experimento piloto foi realizado onde as células foram marcadas com o anticorpo anti-CD62L antes da incubação com o EGS. Entretanto, o EGS ainda foi capaz de reduzir a expressão de CD62L nessas células (dados não mostrados). Para entender melhor esse fenômeno, outros experimentos precisam ser realizados.

Um efeito semelhante ao do EGS é observado quando receptores purinérgicos, como o P2x7, são ativados em alguns tipos celulares. A ativação desses receptores aciona mecanismos intracelulares que geram a abertura de poros na membrana da célula, e induzem a morte celular, caracterizada pela exposição de fosfatidilserina, incorporação de PI, redução no tamanho celular e perda da expressão de CD62L (RISSIEK et al., 2015; SEMAN et al., 2003; SENGSTAKE et al., 2006). Alguns experimentos pilotos utilizando células de baço de animais P2x7$^{-/-}$, gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Maria Regina D'Império Lima do Departamento de Imunologia (ICB/USP) foram realizados, porém não foram observadas diferenças na indução da morte celular pelo EGS nessas células (dados não mostrados). Outros ensaios para avaliação da formação de poros, influxo de cálcio e fragmentação de DNA ainda estão em andamento e vão ajudar a elucidar esse mecanismo.

O EGS é capaz de afetar diretamente linfócitos *naïve*, não afetando linfócitos ativados ou de memória e nem outras células estudas, como células dendríticas

(Figuras 5 e 7) (BIZZARRO et al., 2013). Além disso, foi observado maior efeito em células T $CD4^+$ e $CD8^+$ do que em linfócitos B (Figura 4). Essa seletividade da atividade do EGS reforça a potencial existência de um ligante população-específica e pode estar relacionada ao mecanismo de ação pelo qual a morte celular é induzida.

No presente trabalho fomos capazes de identificar a molécula responsável pela atividade citotóxica em linfócitos presente no EGS do *A. aegypti*, através de fracionamento por HPLC e análise das frações por espectrometria de massas (Figuras 10, 11 e 12). No entanto, a análise bioinformática revelou que o transcrito AAEL003655 estava truncado na anotação do genoma, cujo produto aparece como uma proteína com 185 kDa. Um novo seqüenciamento da glândula salivar de *A. aegypti* foi gerado utilizando a plataforma Illumina e revelou uma sequência mais longa do mesmo transcrito, com 338,16 kDa. A sequência completa está descrita no apêndice 8 e a organização genômica está mostrada na Figura 13. Análises subsequentes revelaram a presença de alguns domínios conservados, como RhsA, RHS *repeat-associated core,* Tox-SGS e um domínio transmembrana, como mostra a Figura 13. Os domínios RhsA e RHS *repeat-associated core* podem ser encontrados em bactérias e eucariotos e estão associados à funções tóxicas. Por exemplo, a proteína C do complexo de toxinas ABC, possui domínios RHS-repeat e são moléculas com complexo sistema citotóxico. Apesar se estar presente em diversas proteínas, sua função ainda não está bem caracterizada (BUSBY et al., 2013). Outros trabalhos associam esses domínios a virulência e a competição de algumas bactérias (KOSKINIEMI et al., 2013; YU et al., 2016). Fomos capazes de mostrar que essa molécula é de fato expressa abundantemente em glândulas salivares de mosquitos fêmeas e não detectada em glândulas salivares de machos, corroborando com os resultados biológicos mostrando que somente o EGS de fêmeas é capaz de inibir a proliferação de linfócitos (Figura 22).

Com o objetivo de tentar neutralizar a atividade observada, anticorpos monoclonais contra as frações biologicamente ativas e anticorpos policlonais contra proteínas recombinantes foram produzidos (Figuras 14, 15, 17 e 18). Porém, apesar de termos verificado uma pequena reversão na atividade, esses experimentos não geraram resultados satisfatórios (Figura 19). Uma das dificuldades que encontramos nesses experimentos é que como o produto do transcrito AAEL003655 é muito grande, não fomos capazes de expressar a proteína inteira apesar de diversas

tentativas. As proteínas recombinantes produzidas (PR1 e PR2) representam apenas porções/domínios parciais da proteína nativa e é possível que os anticorpos gerados contra essas regiões não possuam uma atividade bloqueadora potente, o que explicaria nossos resultados.

Partimos então para o silenciamento do gene usando a técnica do RNA de interferência. O RNAi foi utilizado para silenciar o gene responsável pela atividade em fêmeas do mosquito. O EGS desses mosquitos perdeu a capacidade de induzir a morte de linfócitos, confirmando que essa é a molécula responsável por essa atividade (Figura 20 e 21). Porém, essa técnica não é trivial e apresenta alguns problemas inerentes ao processo: 1) o silenciamento de genes de glândula salivar é mais difícil de ser observado do que em outros tecidos; 2) o silenciamento só é alcançado quando grandes quantidades de dsRNA são inoculadas na hemolinfa do mosquito; 3) mesmo quando bem sucedido, o silenciamento do gene é geralmente parcial e temporário; 4) a eficiência da técnica é dependente do gene a ser silenciado. De fato, encontramos um pouco de cada uma dessas dificuldades e ainda estamos trabalhando na reprodutibilidade do sistema em nosso laboratório. Ao mesmo tempo, estamos estudando a possibilidade de gerar uma linhagem transgênica de *A. aegypti* que não expressa o gene que codifica o transcrito AAEL003655, utilizando para isso a técnica de CRISPR/Cas9 (do inglês "*clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated sequence*").

Até o momento, atividades similares presente em glândula salivar de artrópodes só foram encontradas em *Simulium vittatum,* um simulídeo capaz de inibir a proliferação de linfócitos e induzir apoptose em células do baço de camundongos (TSUJIMOTO et al., 2010). Efeitos semelhantes em outras células do sistema imune também foram descritos, por exemplo, a saliva de *Lutzomia longipalpis* induz apoptose dependende de FasL e caspases em neutrófilos (PRATES et al., 2011). O EGS de *Armigeres subabaltus*, induz apoptose dependente de FAS e caspase-3 e independente de caspase-8 em macrófagos humanos e murinos (LIU et al., 2012). Seguindo uma outra abordagem, uma molécula encontrada em carrapatos da espécie *Amblyomma cajennense,* a Ambliomina-X foi capaz de induzir a morte de células tumorais sem afetar células normais e esta sendo patenteada para iniciar testes clínicos (AKAGI et al., 2012; CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; DREWES et al., 2012; MORAIS et al., 2016; PACHECO et al., 2014; PACHECO et al., 2016). De fato, diversas moléculas

descritas na saliva de carrapato estão sendo estudadas em modelos experimentais de doenças para possível utilização como tratamento, tais como doenças de coagulação do sangue (CARNEIRO-LOBO et al., 2009; KOH et al., 2007), encefalomielite (SA-NUNES et al., 2009), psoríase (DERUAZ et al., 2008), miastenia grave (HEPBURN et al., 2007), câncer (CHUDZINSKI-TAVASSI et al., 2010; SIMONS et al., 2011; SOUSA et al., 2015), entre outras (STIBRANIOVA et al., 2013). Entretanto, pouco se sabe sobre o uso dos componentes salivares do mosquito como drogas terapêuticas. Trabalhos recentes realizados em colaboração com nosso grupo mostram que o EGS do *A. aegypti* pode melhorar o quadro clínico da colite experimental (SALES-CAMPOS et al., 2015) e da encefalomielite autoimune experimental (RAMOS, 2014). Em ambos os casos, já identificamos as potenciais moléculas responsáveis por essas atividades e temos trabalhado para confirmar suas atividades biológicas.

Apesar disso, muitos componentes da saliva do mosquito ainda são desconhecidos e isso dificulta o entendimento da relação entre o vetor, o patógeno e o hospedeiro. A saliva desses artrópodes é composta por moléculas bioativas com atividades poderosas e potencialmente úteis na formulação de novos fármacos. Esse é um campo a ser explorado considerando a quantidade de moléculas produzidas por mais de 14.000 espécies de artrópodes hematófagos existentes, cada um produzindo cerca de centenas de fatores diferentes em sua saliva (LEITNER et al., 2011; STIBRANIOVA et al., 2013).

Uma área importante a ser explorada no estudo da saliva de artrópodes hematófagos é o desenvolvimento de vacinas, que ao invés de focar somente em antígenos derivados de patógenos, poderá abranger também proteínas salivares dos vetores, com o objetivo de neutralizar os componentes que facilitam a transmissão (LEITNER et al., 2012; TITUS et al., 2006). Algumas provas de princípio já estão sendo geradas nesse sentido, como a imunização de camundongos contra antígenos salivares do vetor *Phlebotomus papatasi,* que foi capaz de protegê-los contra o desafio com *Leishmania major* (VALENZUELA et al., 2001). Em outro estudo, foi mostrado que a imunização de hamster com antígenos da saliva de *Lutzomia longipalpis* evitou o desenvolvimento de um quadro fatal da leishmaniose viceral em animais infectados com o parasita *Leishmania infantum chagasi* (GOMES et al., 2008). Esses relatos demonstram a importância de estudar a imunidade contra a saliva para o desenvolvimento de vacinas contra patógenos transmitidos por

vetores. Apesar de já ter sido descrito que a saliva de *A. aegypti* facilita a transmissão de vírus como a dengue (SCHMID et al., 2016; SURASOMBATPATTANA et al., 2014; SURASOMBATPATTANA et al., 2012), até o momento não existem estudos visando esse conceito de vacinação direcionada para saliva nessa espécie. Nosso grupo submeteu recentemente uma proposta nesse sentido para *A. aegypti* que, se bem sucedida, será capaz de interferir com a transmissão dos vírus causadores da Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika à partir de uma única preparação vacinal.

As espécies de artrópodes hematófagos possuem estratégias distintas para se alimentar no hospedeiro. Enquanto algumas levam poucos minutos e necessitam de repetidas alimentações, como é o caso dos mosquitos, flebótomos, triatomíneos e carrapatos moles, outros levam de dias até semanas para se alimentar, mas precisam de apenas uma alimentação em cada estágio do ciclo de vida, como os carrapatos duros. Independentemente de suas necessidades e métodos de alimentação, todos os artrópodes hematófagos já estudados possuem moléculas capazes de inibir tanto a resposta imune inata quanto a adaptativa (LEITNER et al., 2011; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Apesar de os componentes salivares entrarem em contato primeiramente com os mediadores e células da resposta imune inata, a resposta imune adaptativa tem um papel fundamental nas reações geradas pela saliva no momento da picada em indivíduos sensibilizados. A atividade do EGS seletiva para linfócitos pode servir para evitar a elaboração de uma resposta imune adaptativa eficiente, que poderia interferir com o repasto sanguíneo em alimentações posteriores. Além disso, linfócitos T tem como principal função secretar citocinas que ativam e orquestram outras células do sistema imune, modulando o tipo de resposta a ser montada. Sendo assim, essa potente atividade citotóxica seletiva de linfócitos T, poderia impedir a participação de determinadas citocinas e consequentemente alterar todos os outros fatores da resposta imune decorrentes da ativação por esses mediadores. Numa perspectiva evolutiva, essa modulação pode não ser diretamente benéfica ao primeiro mosquito que se alimenta em um determinado hospedeiro, mas vai favorecer a população de mosquitos como um todo, já que outros indivíduos daquela espécie eventualmente irão realizar o repasto sanguíneo em hospedeiros já sensibilizados por picadas anteriores. Do ponto de vista biológico, fica ainda a pergunta sobre as consequências dessa modulação no organismo do hospedeiro vertebrado. Uma possibilidade é que a morte celular

causada pelos componentes salivares do *A. aegypti* em alguns tipos celulares pode desencadear um processo chamado de eferocitose, que é a fagocitose de células mortas (DECATHELINEAU; HENSON, 2003; HEADLAND; NORLING, 2015; HENSON; HUME, 2006; MARTIN et al., 2014; MEDEIROS et al., 2009; VANDIVIER et al., 2006). Essa possibilidade será explorada em uma próxima etapa em um projeto de Pós-Doutorado que já está submetido à FAPESP.

Concluindo, este trabalho revela uma nova proteína presente na saliva de *A. aegypti* capaz de induzir a morte de linfócitos, cuja identidade permaneceu elusiva nos últimos 20 anos. Com esse trabalho conseguimos também desvendar algumas características importantes dessa molécula e gerar novos conhecimentos a cerca da composição da saliva do mosquito vetor *A. aegypti.* Esses estudos contribuem para elucidar melhor o mecanismo de ação desta proteína e sua importância biológica durante o repasto sanguíneo.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho, concluímos que:

- A morte celular induzida pelo EGS de *A. aegypti* é caracterizada pela exposição de fosfatidilserina, incorporação de PI, diminuição no tamanho celular e perda da expressão de CD62L.
- O EGS dessa espécie é capaz de induzir a morte seletiva de linfócitos *naïve*, não afetando células ativadas.
- Linfócitos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ são mais sensíveis a essa atividade do que linfócitos B.
- Células dendríticas não são afetadas por essa atividade.
- A morte celular induzida pelo EGS parece ser independente de caspases.
- O transcrito AAEL003655 foi identificado como o candidato mais provável responsável pela atividade.
- A atividade está presente somente em fêmeas dessa espécie, assim como o transcrito AAEL003655, sugerindo um papel no repasto sanguíneo.
- Anticorpos monoclonais contra a proteína foram capazes de neutralizar parcialmente a atividade.
- O silenciamento do gene responsável pela atividade por RNAi aboliu o efeito do EGS dos mosquitos silenciados em linfócitos.

REFERÊNCIAS*

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.

AKAGI, E. M. et al. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma "in vitro". **Biomed Pharmacother.** v. 66, n. 1, p. 64-69, Feb 2012.

ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, Aedes aegypti. **Insect Biochem Mol Biol.** v. 25, n. 5, p. 621-630, May 1995.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu Rev Entomol.** v. 52, p. 209-229, 2007.

BATTAGLIA, M. et al. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. **Semin Immunol.** v. 18, n. 2, p. 120-127, Apr 2006.

BELIZARIO, J. E. et al. Thymic and Postthymic Regulation of Naive CD4(+) T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models. **Mediators Inflamm.** v. 2016, p. 9523628, 2016.

BERNARD, Q.; JAULHAC, B.; BOULANGER, N. Smuggling across the border: how arthropod-borne pathogens evade and exploit the host defense system of the skin. **J Invest Dermatol.** v. 134, n. 5, p. 1211-1219, May 2014.

BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite Immunol.** v. 15, n. 1, p. 27-33, Jan 1993.

BIZZARRO, B. **Efeito da saliva de Aedes aegypti sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T**. 2012. (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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, Jun 2009.

BOURGEOIS, C.; TANCHOT, C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. **Eur J Immunol.** v. 33, n. 12, p. 3225-3231, Dec 2003.

BUCKLEY, R. H. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. **Annu Rev Immunol.** v. 22, p. 625-655, 2004.

BUSBY, J. N. et al. The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device. **Nature.** v. 501, n. 7468, p. 547-550, Sep 26 2013.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. **J Biol Chem.** v. 282, n. 37, p. 26928-26938, Sep 14 2007.

CARNEIRO-LOBO, T. C. et al. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. **J Thromb Haemost.** v. 7, n. 11, p. 1855-1864, Nov 2009.

CHAGAS, A. C. et al. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, Aedes aegypti. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 111, n. 19, p. 6946-6951, May 13 2014.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.** v. 4, n. 4, p. 375-396, Dec 2004.

CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n. 1, p. 138-142, Jan 4 1994.

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 U S A.** v. 92, n. 3, p. 694-698, Jan 31 1995.

CHMELAR, J. et al. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **J Proteomics.** v. 75, n. 13, p. 3842-3854, Jul 16 2012.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon.** v. 56, n. 7, p. 1145-1154, Dec 15 2010.

COSSU, F. Genetics of SCID. **Ital J Pediatr.** v. 36, p. 76, 2010.

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, Nov 1994.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature.** v. 534, n. 7606, p. 267-271, Jun 9 2016.

DAVIS, M. M. T cell receptor gene diversity and selection. **Annu Rev Biochem.** v. 59, p. 475-496, 1990.

DECATHELINEAU, A. M.; HENSON, P. M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. **Essays Biochem.** v. 39, p. 105-117, 2003.

DERUAZ, M. et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **J Exp Med.** v. 205, n. 9, p. 2019-2031, Sep 1 2008.

DREWES, C. C. et al. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon.** v. 60, n. 3, p. 333-340, Sep 1 2012.

DUSTIN, M. L. et al. T cell-dendritic cell immunological synapses. **Curr Opin Immunol.** v. 18, n. 4, p. 512-516, Aug 2006.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci (Landmark Ed).** v. 14, p. 2051-2088, 2009.

GOL-ARA, M. et al. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis.** v. 2012, p. 805875, 2012.

GOMES, R. et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 105, n. 22, p. 7845-7850, Jun 3 2008.

GREEN, D. R.; OGUIN, T. H.; MARTINEZ, J. The clearance of dying cells: table for two. **Cell Death Differ.** v. 23, n. 6, p. 915-926, Jun 2016.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res.** v. 33, n. 4, p. 330-342, Jul-Aug 2002.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol.** v. 27, n. 3, p. 149-160, May 2015.

HENSON, P. M.; HUME, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **Trends Immunol.** v. 27, n. 5, p. 244-250, May 2006.

HEPBURN, N. J. et al. In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick Ornithodoros moubata. **J Biol Chem.** v. 282, n. 11, p. 8292-8299, Mar 16 2007.

HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4+ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **Int Immunol.** v. 28, n. 4, p. 163-171, Apr 2016.

KAZIMIROVA, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 3, p. 43, 2013.

KIM, H. J. et al. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. **Nature.** v. 467, n. 7313, p. 328-332, Sep 16 2010.

KING, C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 11, p. 757-766, Nov 2009.

KLEIN, L. et al. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 12, p. 833-844, Dec 2009.

KOH, C. Y. et al. Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. **J Biol Chem.** v. 282, n. 40, p. 29101-29113, Oct 5 2007.

KOSKINIEMI, S. et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 110, n. 17, p. 7032-7037, Apr 23 2013.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ.** v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009.

KRYSKO, D. V. et al. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death Differ.** v. 13, n. 12, p. 2011-2022, Dec 2006.

LEITNER, W. W.; COSTERO-SAINT DENIS, A.; WALI, T. Immunological consequences of arthropod vector-derived salivary factors. **Eur J Immunol.** v. 41, n. 12, p. 3396-3400, Dec 2011.

_____. Role of immune cell subsets in the establishment of vector-borne infections. **Eur J Immunol.** v. 42, n. 12, p. 3110-3115, Dec 2012.

LEWINSOHN, D. A.; GOLD, M. C.; LEWINSOHN, D. M. Views of immunology: effector T cells. **Immunol Rev.** v. 240, n. 1, p. 25-39, Mar 2011.

LIU, S. et al. Induction of Fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by Armigeres subalbatus saliva. **PLoS One.** v. 7, n. 7, p. e41145, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. **Curr Opin Microbiol.** v. 17, p. 17-23, Feb 2014.

MEDEIROS, A. I. et al. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. **J Exp Med.** v. 206, n. 1, p. 61-68, Jan 16 2009.

MILLS, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 12, p. 807-822, Dec 2011.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends Mol Med.** v. 13, n. 3, p. 108-116, Mar 2007.

MORAIS, K. L. et al. Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. **Mol Cell Biochem.** v. 415, n. 1-2, p. 119-131, Apr 2016.

PACHECO, M. T. et al. Dynein function and protein clearance changes in tumor cells induced by a Kunitz-type molecule, Amblyomin-X. **PLoS One.** v. 9, n. 12, p. e111907, 2014.

PACHECO, M. T. et al. Specific role of cytoplasmic dynein in the mechanism of action of an antitumor molecule, Amblyomin-X. **Exp Cell Res.** v. 340, n. 2, p. 248-258, Jan 15 2016.

PRATES, D. B. et al. Lutzomyia longipalpis saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J Leukoc Biol.** v. 90, n. 3, p. 575-582, Sep 2011.

RAFFLER, N.; RIVERA-NIEVES, J.; LEY, K. L-selectin in inflammation, infection and immunity. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies.** v. 2, n. 3, p. 213-220, 2005.

RAMOS, A. D. **Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato da glândula salivar de Aedes aegypti.** 2014. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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, Sep 2005.

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

_____. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **J Exp Biol.** v. 165, p. 61-71, Apr 1992.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol.** v. 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. **Comp Biochem Physiol B.** v. 79, n. 1, p. 81-86, 1984.

RISSIEK, B. et al. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. **Front Immunol.** v. 6, p. 204, 2015.

SA-NUNES, A. et al. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. **J Immunol.** v. 182, n. 12, p. 7422-7429, Jun 15 2009.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in Ixodes scapularis saliva. **J Immunol.** v. 179, n. 3, p. 1497-1505, Aug 1 2007.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell.** v. 133, n. 5, p. 775-787, May 30 2008.

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

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol.** v. 22, p. 745-763, 2004.

SCHMID, M. A. et al. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. **PLoS Pathog.** v. 12, n. 6, p. e1005676, Jun 2016.

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, p. e11704, 2010.

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends Cell Biol.** v. 25, n. 11, p. 639-650, Nov 2015.

SEMAN, M. et al. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. **Immunity.** v. 19, n. 4, p. 571-582, Oct 2003.

SENGSTAKE, S.; BONEBERG, E. M.; ILLGES, H. CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. **Int Immunol.** v. 18, n. 7, p. 1171-1178, Jul 2006.

SHEVACH, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. **Immunity.** v. 25, n. 2, p. 195-201, Aug 2006.

SIMONS, S. M. et al. The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomed Pharmacother.** v. 65, n. 6, p. 443-450, Sep 2011.

SIMS, T. N.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunol Rev.** v. 186, p. 100-117, Aug 2002.

SOUSA, A. C. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon.** v. 102, p. 69-73, Aug 2015.

SPRENT, J. et al. T cell homeostasis. **Immunol Cell Biol.** v. 86, n. 4, p. 312-319, May-Jun 2008.

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

_____. 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, Aug 14 1998.

STIBRANIOVA, I.; LAHOVA, M.; BARTIKOVA, P. Immunomodulators in tick saliva and their benefits. **Acta Virol.** v. 57, n. 2, p. 200-216, 2013.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. Aedes aegypti saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** v. 134, n. 1, p. 281-284, Jan 2014.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. Aedes aegypti saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses. **J Invest Dermatol.** v. 132, n. 8, p. 2103-2105, Aug 2012.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3+ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nat Immunol.** v. 9, n. 3, p. 239-244, Mar 2008.

TILAK, R. et al. Dengue, chikungunya ... and the missing entity - Zika fever: A new emerging threat. **Med J Armed Forces India.** v. 72, n. 2, p. 157-163, Apr 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, Apr 2006.

TRITARELLI, A. et al. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. **Mol Biol Cell.** v. 15, n. 8, p. 3751-3757, Aug 2004.

TSUJIMOTO, H.; GRAY, E. W.; CHAMPAGNE, D. E. Black fly salivary gland extract inhibits proliferation and induces apoptosis in murine splenocytes. **Parasite Immunol.** v. 32, n. 4, p. 275-284, Apr 2010.

VALENZUELA, J. G. et al. Toward a defined anti-Leishmania vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med.** v. 194, n. 3, p. 331-342, Aug 6 2001.

VAN SEVENTER, G. A. et al. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. **J Immunol.** v. 144, n. 12, p. 4579-4586, Jun 15 1990.

VANDIVIER, R. W.; HENSON, P. M.; DOUGLAS, I. S. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. **Chest.** v. 129, n. 6, p. 1673-1682, Jun 2006.

VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat Immunol.** v. 6, n. 4, p. 338-344, Apr 2005.

WALLACH, D.; KANG, T. B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. **Nat Rev Immunol.** v. 14, n. 1, p. 51-59, Jan 2014.

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.** v. 18, n. 2, p. 191-199, Jun 2004.

WANG, Q. et al. Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. **Int Immunol.** v. 25, n. 6, p. 363-372, Jun 2013.

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. 6-7, p. 295-306, Jun-Jul 2004.

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

WATANABE, R. M. 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, Mar 2011.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin North Am.** v. 92, n. 6, p. 1377-1390, x, Nov 2008.

WILLIAMS, M. A.; TYZNIK, A. J.; BEVAN, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. **Nature.** v. 441, n. 7095, p. 890-893, Jun 15 2006.

YU, Y. et al. Ss-Rhs1, a secretory Rhs repeat-containing protein, is required for the virulence of Sclerotinia sclerotiorum. **Mol Plant Pathol.** Jul 9 2016.

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, Jan 1999.

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity.** v. 30, n. 5, p. 646-655, May 2009.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood.** v. 112, n. 5, p. 1557-1569, Sep 1 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.** v. 28, p. 445-489, 2010.

ZINKERNAGEL, R. M. et al. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? **J Exp Med.** v. 147, n. 3, p. 882-896, Mar 1 1978.

Apêndice 1 – Relatório da análise da fração F1 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL000749-PA	57,93	357	17	290	33,4	6,10	1822,41	6,481E9
AAEL000726-PA	33,33	181	12	291	33,6	6,42	816,40	4,202E9
AAEL003655-PA	26,21	56	35	1629	185,4	6,27	238,53	7,893E7
AAEL009955-PA	20,42	71	54	3321	367,2	7,50	320,86	5,023E7
AAEL003694-PA	23,52	22	18	846	97,9	5,12	104,37	4,082E7
AAEL002761-PG	45,39	15	12	271	31,0	4,74	70,52	3,151E7
AAEL002759-PA	40,85	22	9	284	32,4	4,89	83,52	3,053E7
AAEL009992-PA	19,61	76	57	3340	379,8	7,88	338,43	2,329E7
AAEL000748-PA	18,79	9	8	580	66,2	6,15	61,83	1,899E7
AAEL009993-PA	18,97	54	48	3364	379,7	8,02	263,20	1,867E7
AAEL000732-PA	24,30	14	11	568	64,6	6,39	65,36	1,783E7
AAEL007306-PA	22,32	17	15	896	103,6	5,60	85,81	9,723E6
AAEL003600-PA	16,35	5	5	312	35,8	6,42	29,28	8,865E6
AAEL006424-PA	20,87	5	5	321	36,9	7,78	23,14	8,819E6
AAEL005656-PA	11,08	20	16	1940	221,3	5,99	121,40	8,628E6
AAEL005672-PA	13,36	10	6	524	59,8	6,86	44,77	8,445E6
AAEL002956-PA	13,92	6	5	467	51,6	8,82	23,62	7,985E6
AAEL006347-PA	18,15	11	9	562	62,7	8,16	43,65	7,496E6
AAEL003601-PA	17,72	5	5	316	36,2	5,31	19,63	7,212E6
AAEL013559-PA	3,60	12	12	4560	516,5	6,30	58,97	4,602E6
AAEL002827-PA	21,63	8	7	504	53,9	5,12	35,72	4,514E6
AAEL000517-PA	31,07	5	3	103	11,4	11,36	19,09	4,340E6
AAEL003182-PA	25,36	8	8	418	47,0	5,57	36,17	4,150E6
AAEL002565-PA	1,44	8	8	7100	796,6	6,48	42,15	3,916E6
AAEL010235-PA	17,22	7	5	273	29,1	4,27	35,77	3,898E6
AAEL006417-PA	22,29	8	7	332	38,6	9,23	26,92	3,464E6
AAEL004616-PA	7,45	3	3	376	41,7	5,48	17,00	2,662E6
AAEL004461-PA	13,53	4	4	340	37,8	5,20	14,58	2,431E6
AAEL004452-PA	7,77	2	2	489	54,9	8,76	8,75	2,018E6
AAEL016984-PB	6,63	3	2	332	35,4	8,18	12,27	1,957E6
AAEL015065-PA	4,52	9	8	2414	277,8	5,25	38,60	1,822E6
AAEL012910-PA	1,19	4	4	5644	604,7	4,81	12,30	1,620E6
AAEL008166-PA	16,23	4	4	419	44,2	9,00	19,14	1,479E6
AAEL003107-PA	4,97	2	2	342	38,6	5,41	5,96	1,385E6
AAEL012905-PA	2,14	3	3	5429	581,6	5,38	8,87	9,197E5
AAEL003671-PA	2,53	2	2	1344	142,9	4,44	7,61	8,395E5
AAEL009185-PA	7,04	2	2	355	39,8	6,40	8,88	6,502E5
AAEL017096-PA	9,07	2	2	463	50,4	9,09	6,75	6,145E5
AAEL011741-PA	14,29	2	2	203	23,2	5,20	8,35	3,038E5
AAEL002558-PA	2,71	2	2	924	104,5	7,06	8,32	1,774E5

Apêndice 2 – Relatório da análise da fração F2 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL000749-PA	52,41	273	16	290	33,4	6,10	1321,23	5,721E9
AAEL000726-PA	31,27	114	10	291	33,6	6,42	464,96	2,106E9
AAEL002759-PD	61,27	43	18	284	32,4	4,86	205,86	2,015E8
AAEL002761-PG	60,89	24	18	271	31,0	4,74	132,59	1,775E8
AAEL003655-PA	23,33	50	35	1629	185,4	6,27	193,37	1,709E8
AAEL003694-PA	25,65	29	19	846	97,9	5,12	117,02	7,764E7
AAEL009992-PA	21,11	76	63	3340	379,8	7,88	350,86	4,225E7
AAEL009955-PA	16,53	64	45	3321	367,2	7,50	284,81	3,298E7
AAEL000748-PA	22,76	12	10	580	66,2	6,15	65,02	3,130E7
AAEL000732-PA	28,87	16	13	568	64,6	6,39	74,40	2,873E7
AAEL009993-PA	14,86	53	44	3364	379,7	8,02	212,16	2,493E7
AAEL007306-PA	28,57	29	23	896	103,6	5,60	129,03	2,269E7
AAEL003601-PA	18,35	6	5	316	36,2	5,31	28,78	1,971E7
AAEL003600-PA	26,92	8	8	312	35,8	6,42	31,01	1,324E7
AAEL006347-PA	12,46	9	6	562	62,7	8,16	40,77	7,197E6
AAEL005672-PA	10,11	6	5	524	59,8	6,86	36,11	6,409E6
AAEL005656-PA	7,42	15	13	1940	221,3	5,99	85,00	6,264E6
AAEL004461-PA	25,00	7	7	340	37,8	5,20	32,34	6,153E6
AAEL003182-PA	20,57	8	6	418	47,0	5,57	35,70	4,193E6
AAEL010235-PA	13,55	4	4	273	29,1	4,27	20,03	4,155E6
AAEL000517-PA	31,07	3	3	103	11,4	11,36	11,55	3,435E6
AAEL013559-PA	1,80	7	7	4560	516,5	6,30	35,19	3,243E6
AAEL004452-PA	6,13	2	2	489	54,9	8,76	19,76	2,868E6
AAEL006417-PA	15,36	4	4	332	38,6	9,23	19,31	2,777E6
AAEL002827-PA	13,89	5	4	504	53,9	5,12	23,33	2,753E6
AAEL006424-PA	17,76	3	3	321	36,9	7,78	17,24	2,602E6
AAEL015065-PA	3,81	8	8	2414	277,8	5,25	32,63	2,141E6
AAEL002558-PA	4,00	3	3	924	104,5	7,06	16,13	2,120E6
AAEL007226-PA	2,70	2	2	1298	143,3	4,77	8,52	1,932E6
AAEL012910-PA	2,20	12	7	5644	604,7	4,81	29,04	1,585E6
AAEL002565-PA	0,58	4	4	7100	796,6	6,48	19,22	1,416E6
AAEL001673-PA	7,45	3	2	376	41,7	5,39	20,53	1,384E6
AAEL008166-PA	8,35	4	3	419	44,2	9,00	13,28	1,289E6
AAEL006333-PA	5,77	2	2	572	63,2	8,38	9,18	1,274E6
AAEL009847-PA	0,74	3	3	4478	490,6	5,05	9,09	1,052E6
AAEL007385-PA	10,58	2	2	208	23,6	5,97	11,33	1,017E6
AAEL011604-PA	1,62	4	4	3652	404,7	5,17	18,48	9,402E5
AAEL006096-PA	5,66	2	2	389	43,0	9,04	7,70	7,412E5
AAEL002158-PA	10,65	2	2	216	24,2	6,01	8,45	7,219E5
AAEL005845-PA	0,87	2	2	2299	266,0	5,33	8,09	7,004E5
AAEL000641-PA	6,48	2	2	494	55,9	5,02	8,10	5,957E5

Apêndice 3 – Relatório da análise da fração F3 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL000749-PA	43,79	69	12	290	33,4	6,10	502,29	7,514E8
AAEL000726-PA	26,46	23	7	291	33,6	6,42	204,62	4,438E8
AAEL002759-PA	48,94	20	14	284	32,4	4,89	116,00	2,032E8
AAEL002761-PG	52,03	14	12	271	31,0	4,74	103,08	1,071E8
AAEL003655-PA	9,88	15	13	1629	185,4	6,27	94,31	3,082E7
AAEL003601-PA	10,44	3	3	316	36,2	5,31	17,40	2,072E7
AAEL009993-PA	5,23	14	13	3364	379,7	8,02	98,20	1,267E7
AAEL009992-PA	6,17	18	16	3340	379,8	7,88	93,82	1,166E7
AAEL000748-PA	12,41	7	5	580	66,2	6,15	47,09	1,106E7
AAEL003694-PA	2,84	2	2	846	97,9	5,12	38,18	9,606E6
AAEL014367-PA	2,09	4	2	2055	221,7	4,48	20,00	6,460E6
AAEL005672-PA	8,97	6	4	524	59,8	6,86	46,78	6,152E6
AAEL000732-PA	10,21	4	4	568	64,6	6,39	32,31	5,903E6
AAEL008340-PA	2,96	3	2	1182	132,7	5,25	20,83	5,705E6
AAEL002834-PA	4,85	2	2	557	61,1	6,43	13,21	4,377E6
AAEL009955-PA	1,57	4	4	3321	367,2	7,50	17,89	2,957E6
AAEL001091-PA	5,21	2	2	652	72,0	7,52	7,30	1,412E6

Apêndice 4 – Relatório da análise da fração F4 (fração em vermelho na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL006424-PA	77,88	485	37	321	36,9	7,78	2558,04	3,125E10
AAEL006417-PA	65,36	232	34	332	38,6	9,23	1808,48	2,663E10
AAEL003601-PA	46,20	80	15	316	36,2	5,31	284,89	5,144E9
AAEL003600-PA	71,15	53	23	312	35,8	6,42	273,90	4,994E9
AAEL002704-PB	35,25	41	14	417	47,8	6,70	210,87	3,586E9
AAEL000533-PA	53,90	43	11	154	17,7	5,81	116,37	2,447E9
AAEL010235-PA	28,57	21	12	273	29,1	4,27	97,37	1,096E9
AAEL010228-PA	36,74	17	12	215	23,6	4,72	83,65	7,040E8
AAEL006096-PA	56,30	29	19	389	43,0	9,04	134,67	5,312E8
AAEL015450-PA	64,23	7	6	137	14,4	7,24	32,48	4,508E8
AAEL003182-PA	28,47	13	11	418	47,0	5,57	70,44	2,951E8
AAEL006347-PA	21,89	19	13	562	62,7	8,16	88,12	2,741E8
AAEL000200-PA	33,04	2	2	112	12,3	6,34	11,56	2,609E8
AAEL000274-PA	60,13	12	6	153	15,4	6,24	57,07	2,116E8
AAEL003835-PA	23,75	4	3	160	17,6	5,57	23,69	2,007E8
AAEL006406-PA	37,93	7	6	145	16,4	6,00	37,78	1,926E8
AAEL004088-PC	29,97	10	6	317	35,5	6,19	49,25	1,537E8
AAEL003057-PB	35,25	7	7	261	29,6	9,38	39,58	1,458E8
AAEL011741-PA	38,42	7	7	203	23,2	5,20	43,23	1,241E8
AAEL007420-PB	16,18	7	6	414	47,4	9,25	46,84	1,129E8
AAEL000793-PA	23,53	5	4	255	28,9	8,88	28,14	1,094E8
AAEL000749-PA	21,72	7	5	290	33,4	6,10	119,23	9,968E7
AAEL000726-PA	17,53	5	3	291	33,6	6,42	29,73	9,935E7
AAEL006576-PB	19,27	7	6	327	36,1	5,95	27,61	9,202E7
AAEL000732-PA	4,93	3	2	568	64,6	6,39	29,44	8,961E7
AAEL002833-PA	19,76	4	4	339	38,0	6,10	16,38	7,803E7
AAEL013005-PA	13,73	3	2	204	23,3	4,84	23,25	7,532E7
AAEL012175-PA	5,26	2	2	551	59,4	8,94	9,14	6,946E7
AAEL011741-PB	19,21	5	3	203	23,2	5,17	23,40	6,510E7
AAEL000641-PA	14,17	7	6	494	55,9	5,02	40,23	6,406E7
AAEL004081-PA	23,66	4	4	186	19,8	7,30	14,39	5,934E7
AAEL009993-PA	2,26	8	7	3364	379,7	8,02	54,27	5,672E7
AAEL006408-PA	47,47	8	8	158	18,1	8,41	35,36	5,543E7
AAEL008166-PA	23,15	9	7	419	44,2	9,00	43,39	5,255E7
AAEL002764-PA	2,85	2	2	491	51,9	9,22	6,52	4,987E7
AAEL004118-PA	13,44	3	3	320	36,4	7,03	25,85	4,802E7
AAEL002542-PA	21,05	4	4	247	26,3	6,34	27,65	4,746E7
AAEL011302-PA	13,58	4	4	324	35,6	4,78	21,72	4,671E7
AAEL004112-PA	15,63	2	2	192	21,4	5,96	9,39	4,414E7
AAEL006070-PA	28,63	6	6	255	28,5	6,81	23,89	4,282E7
AAEL006333-PA	10,31	7	4	572	63,2	8,38	37,91	3,520E7

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL009337-PC	33,17	7	5	202	22,4	5,54	41,02	3,227E7
AAEL002504-PB	21,12	3	2	161	17,0	5,31	13,92	3,131E7
AAEL003872-PA	21,64	3	3	171	19,6	4,78	14,21	2,943E7
AAEL007281-PA	4,35	2	2	712	79,5	5,26	13,83	2,825E7
AAEL000748-PA	4,66	2	2	580	66,2	6,15	15,99	2,792E7
AAEL009872-PA	9,19	5	3	544	59,5	8,28	31,28	2,645E7
AAEL014583-PC	23,00	2	2	100	9,8	8,13	6,43	2,607E7
AAEL003491-PA	12,02	3	2	258	29,1	8,07	18,60	2,535E7
AAEL010242-PA	27,71	2	2	83	8,6	8,84	8,92	2,531E7
AAEL005515-PF	10,77	2	2	325	34,7	8,00	14,60	2,410E7
AAEL012326-PA	28,19	3	3	149	16,8	4,22	13,29	2,406E7
AAEL008489-PA	13,02	2	2	215	24,0	5,07	9,50	2,354E7
AAEL009906-PB	11,74	4	2	298	33,6	6,37	16,65	2,320E7
AAEL002417-PC	10,22	3	3	362	43,7	4,83	26,35	2,317E7
AAEL007135-PA	17,10	2	2	193	20,7	8,88	8,89	2,311E7
AAEL009852-PA	30,47	2	2	128	13,7	5,12	9,56	2,289E7
AAEL004102-PA	11,64	2	2	318	35,8	6,84	18,71	2,266E7
AAEL013138-PA	12,80	4	3	289	31,0	8,88	20,35	2,093E7
AAEL001022-PA	13,23	7	4	310	34,1	5,44	31,70	2,083E7
AAEL006885-PA	10,08	2	2	248	28,2	4,88	7,54	2,054E7
AAEL003053-PC	19,61	3	3	255	29,5	8,69	20,92	1,997E7
AAEL008789-PA	31,12	6	6	196	22,1	5,72	31,18	1,996E7
AAEL008257-PA	9,55	4	3	398	42,2	7,03	16,00	1,878E7
AAEL001005-PA	5,90	2	2	407	46,7	4,56	7,90	1,764E7
AAEL012731-PA	18,67	3	3	241	26,3	7,03	21,98	1,651E7
AAEL008620-PA	7,72	3	2	311	35,2	5,35	13,50	1,588E7
AAEL002023-PA	9,30	3	3	441	48,0	8,21	15,09	1,549E7
AAEL009216-PB	18,95	4	4	306	34,8	5,69	16,85	1,506E7
AAEL001061-PB	13,88	2	2	209	23,8	6,07	21,77	1,334E7
AAEL008569-PA	11,44	2	2	236	25,5	9,19	8,48	1,271E7
AAEL004086-PA	9,15	2	2	284	32,3	5,63	14,37	1,209E7
AAEL004930-PA	13,41	6	2	276	31,3	6,14	25,14	1,197E7
AAEL005407-PA	13,08	3	3	321	35,7	4,75	14,70	1,085E7
AAEL009992-PA	1,05	3	3	3340	379,8	7,88	21,22	9,311E6
AAEL011414-PA	23,21	2	2	112	12,7	9,38	16,86	8,831E6
AAEL000037-PA	9,37	2	2	363	39,8	7,17	6,96	8,680E6
AAEL005102-PA	6,52	2	2	322	35,7	6,47	20,14	8,208E6
AAEL014959-PA	6,74	2	2	430	45,7	7,17	7,10	5,079E6
AAEL007915-PA	2,92	2	2	583	69,0	6,01	5,99	5,035E6
AAEL011288-PA	5,32	3	2	432	48,9	7,68	12,07	5,015E6
AAEL009169-PA	2,76	2	2	832	91,7	6,11	9,20	4,443E6
AAEL012904-PA	8,35	2	2	443	49,9	5,59	10,70	4,296E6

Apêndice 5 – Relatório da análise da fração F1 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL000749-PA	53,45	89	16	290	33,4	6,10	683,32	2,993E9
AAEL009993-PA	27,29	82	67	3364	379,7	8,02	516,60	1,167E8
AAEL009992-PA	23,74	94	66	3340	379,8	7,88	515,71	1,259E8
AAEL000726-PA	38,83	76	12	291	33,6	6,42	492,13	2,653E9
AAEL009955-PA	26,02	74	65	3321	367,2	7,50	421,41	8,497E7
AAEL003655-PA	28,85	47	34	1629	185,4	6,27	251,25	2,787E8
AAEL015065-PA	14,33	25	24	2414	277,8	5,25	157,43	1,387E7
AAEL003694-PA	32,15	26	19	846	97,9	5,12	154,99	8,107E7
AAEL005656-PA	13,97	23	21	1940	221,3	5,99	126,18	2,233E7
AAEL006347-PA	29,18	24	16	562	62,7	8,16	121,69	5,919E7
AAEL000732-PA	27,82	16	14	568	64,6	6,39	102,10	9,471E7
AAEL000748-PA	26,03	17	13	580	66,2	6,15	100,71	9,293E7
AAEL002759-PA	46,13	20	14	284	32,4	4,89	100,13	1,080E8
AAEL007306-PA	18,86	16	13	896	103,6	5,60	97,23	2,542E7
AAEL013559-PA	3,18	11	9	4560	516,5	6,30	72,90	1,627E7
AAEL008166-PA	36,04	12	9	419	44,2	9,00	63,77	1,919E7
AAEL002827-PA	27,98	12	8	504	53,9	5,12	63,41	3,523E7
AAEL005672-PA	22,33	11	9	524	59,8	6,86	61,76	4,931E7
AAEL002761-PG	33,21	11	9	271	31,0	4,74	54,08	9,236E7
AAEL003182-PA	25,84	10	8	418	47,0	5,57	51,86	2,359E7
AAEL001673-PA	17,82	7	4	376	41,7	5,39	44,02	5,258E7
AAEL002956-PA	17,13	6	5	467	51,6	8,82	43,35	3,054E7
AAEL016984-PB	29,52	7	6	332	35,4	8,18	41,44	2,842E7
AAEL002565-PA	1,11	5	5	7100	796,6	6,48	40,48	6,523E6
AAEL003584-PA	36,84	8	6	152	17,5	8,37	38,36	1,233E7
AAEL005845-PA	2,87	4	4	2299	266,0	5,33	30,35	3,627E6
AAEL003600-PA	15,38	5	5	312	35,8	6,42	29,82	1,697E7
AAEL005766-PA	16,53	5	5	363	39,1	7,87	28,28	1,239E7
AAEL003601-PA	15,82	4	4	316	36,2	5,31	24,24	1,969E7
AAEL002704-PB	17,75	4	4	417	47,8	6,70	23,55	1,152E7
AAEL000793-PA	20,00	5	4	255	28,9	8,88	23,44	2,865E7
AAEL011741-PB	22,17	4	3	203	23,2	5,17	22,47	6,330E6
AAEL012175-PA	6,35	2	2	551	59,4	8,94	21,25	6,176E6
AAEL006424-PA	11,21	2	2	321	36,9	7,78	16,31	2,225E7
AAEL017096-PA	11,45	3	3	463	50,4	9,09	15,47	9,410E6
AAEL006642-PA	9,33	4	3	450	49,9	5,14	15,39	2,831E6
AAEL010235-PA	10,26	2	2	273	29,1	4,27	15,26	1,348E7
AAEL006333-PA	2,97	3	2	572	63,2	8,38	15,07	2,826E6
AAEL006719-PA	5,70	3	3	737	80,8	7,44	15,03	5,517E6
AAEL001194-PA	1,78	3	3	2422	264,9	6,62	14,30	1,819E6

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL006096-PA	14,65	4	4	389	43,0	9,04	14,12	3,986E6
AAEL012576-PB	7,80	3	3	513	55,5	7,40	13,92	2,852E6
AAEL009691-PA	2,12	2	2	1180	130,6	6,87	13,63	1,723E6
AAEL014845-PA	3,93	2	2	560	63,7	5,33	13,37	5,436E6
AAEL012207-PC	22,50	3	2	120	13,6	4,81	13,35	1,448E7
AAEL006417-PA	11,75	3	3	332	38,6	9,23	12,47	8,281E6
AAEL012827-PA	3,40	2	2	795	91,1	4,91	10,21	3,755E6
AAEL000641-PA	8,70	3	3	494	55,9	5,02	10,05	2,519E6
AAEL009869-PA	0,73	2	2	4525	504,2	5,38	9,97	1,261E6
AAEL006485-PA	6,80	2	2	338	37,9	5,07	9,80	1,529E7
AAEL010228-PA	11,16	2	2	215	23,6	4,72	9,50	4,189E6
AAEL005187-PA	1,66	2	2	1624	180,0	5,47	9,43	1,409E6
AAEL005269-PA	7,71	2	2	441	45,5	7,78	6,84	3,084E6
AAEL003658-PA	1,19	2	2	1761	197,6	5,33	6,22	3,017E6

Apêndice 6 – Relatório da análise da fração F2 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massa.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL009992-PA	27,31	106	76	3340	379,8	7,88	596,34	1,577E8
AAEL009993-PA	27,56	87	70	3364	379,7	8,02	494,06	1,198E8
AAEL000749-PA	37,93	48	10	290	33,4	6,10	424,25	1,802E9
AAEL009955-PA	19,39	50	47	3321	367,2	7,50	333,04	6,140E7
AAEL003655-PA	24,68	51	32	1629	185,4	6,27	256,92	3,143E8
AAEL002759-PA	65,49	46	29	284	32,4	4,89	234,11	7,673E8
AAEL002761-PC	68,42	40	25	285	32,7	4,73	221,97	4,784E8
AAEL007306-PA	28,35	23	21	896	103,6	5,60	165,39	5,830E7
AAEL003694-PA	33,33	26	21	846	97,9	5,12	156,72	6,856E7
AAEL000726-PA	35,05	32	11	291	33,6	6,42	152,14	1,469E9
AAEL000732-PA	42,61	25	20	568	64,6	6,39	142,04	1,793E8
AAEL000748-PA	39,14	19	17	580	66,2	6,15	97,73	1,290E8
AAEL006347-PA	28,65	21	15	562	62,7	8,16	86,85	3,953E7
AAEL002827-PA	27,98	15	10	504	53,9	5,12	70,18	3,068E7
AAEL015065-PA	4,97	8	8	2414	277,8	5,25	64,69	6,807E6
AAEL008166-PA	40,57	12	9	419	44,2	9,00	62,72	1,218E7
AAEL005672-PA	22,52	9	8	524	59,8	6,86	61,11	3,013E7
AAEL011197-PA	30,32	9	6	376	41,8	5,48	54,62	4,026E7
AAEL003182-PA	19,62	8	6	418	47,0	5,57	46,59	1,468E7
AAEL003584-PA	27,63	6	4	152	17,5	8,37	36,32	1,422E7
AAEL005656-PA	4,02	5	5	1940	221,3	5,99	35,71	4,675E6
AAEL003601-PA	15,82	6	5	316	36,2	5,31	35,42	4,354E7
AAEL016984-PB	24,10	5	5	332	35,4	8,18	29,72	1,614E7
AAEL005766-PA	16,25	5	4	363	39,1	7,87	27,89	5,195E6
AAEL002956-PA	14,56	5	5	467	51,6	8,82	26,69	2,707E7
AAEL002704-PB	17,75	5	4	417	47,8	6,70	26,20	1,235E7
AAEL002558-PA	5,41	4	4	924	104,5	7,06	24,79	5,302E6
AAEL003600-PA	15,71	4	4	312	35,8	6,42	24,56	1,903E7
AAEL017096-PA	10,80	3	3	463	50,4	9,09	20,90	1,046E7
AAEL012101-PA	11,80	4	3	449	49,8	5,06	19,46	3,119E6
AAEL006424-PA	17,13	3	3	321	36,9	7,78	18,88	1,922E7
AAEL000793-PA	16,08	3	2	255	28,9	8,88	17,57	2,076E7
AAEL002834-PA	4,85	2	2	557	61,1	6,43	17,56	3,291E6
AAEL010235-PA	13,55	3	3	273	29,1	4,27	16,52	4,987E6
AAEL012827-PA	4,28	2	2	795	91,1	4,91	15,92	4,544E6
AAEL013559-PA	0,61	2	2	4560	516,5	6,30	13,75	4,522E6
AAEL002851-PA	9,84	2	2	447	50,1	4,86	12,55	4,805E6
AAEL006417-PA	11,75	3	3	332	38,6	9,23	10,27	5,692E6
AAEL004112-PA	19,79	2	2	192	21,4	5,96	10,20	1,392E7
AAEL007385-PA	17,79	2	2	208	23,6	5,97	9,09	6,958E6
AAEL014367-PA	1,27	2	2	2055	221,7	4,48	8,59	3,702E6
AAEL007281-PA	6,88	2	2	712	79,5	5,26	7,99	6,386E6
AAEL004297-PA	3,02	2	2	1127	122,8	7,18	7,23	1,115E6
AAEL001194-PA	0,95	2	2	2422	264,9	6,62	6,72	4,699E5

Apêndice 7 – Relatório da análise da fração F3 (fração em azul na Figura 10A) por espectrometria de massas.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL009993-PA	27,14	97	80	3364	379,7	8,02	620,62	1,893E8
AAEL000749-PA	40,34	52	11	290	33,4	6,10	488,14	8,193E8
AAEL009992-PA	24,07	95	70	3340	379,8	7,88	482,63	9,669E7
AAEL002759-PD	67,61	49	27	284	32,4	4,86	251,57	7,544E8
AAEL002761-PC	60,00	27	19	285	32,7	4,73	212,41	4,446E8
AAEL000726-PA	33,33	24	10	291	33,6	6,42	184,74	5,597E8
AAEL003655-PA	16,64	32	21	1629	185,4	6,27	167,48	1,402E8
AAEL000732-PA	35,04	26	20	568	64,6	6,39	158,92	2,055E8
AAEL001091-PA	28,99	29	16	652	72,0	7,52	142,18	1,891E8
AAEL002761-PH	48,03	20	15	254	29,5	4,74	139,11	3,147E8
AAEL009955-PA	9,15	23	23	3321	367,2	7,50	137,68	1,164E7
AAEL012576-PB	27,88	25	14	513	55,5	7,40	128,10	1,025E8
AAEL005672-PA	27,48	18	12	524	59,8	6,86	118,04	1,530E8
AAEL006347-PA	26,51	20	15	562	62,7	8,16	106,35	5,398E7
AAEL000748-PA	29,14	16	14	580	66,2	6,15	102,68	1,268E8
AAEL003694-PA	21,75	16	14	846	97,9	5,12	92,10	4,449E7
AAEL007281-PA	29,49	16	14	712	79,5	5,26	85,74	8,887E7
AAEL005790-PA	26,36	13	10	660	72,1	6,48	83,65	3,809E7
AAEL007306-PA	20,65	15	15	896	103,6	5,60	83,62	1,510E7
AAEL012827-PA	20,38	13	12	795	91,1	4,91	70,41	2,146E7
AAEL005845-PA	6,09	9	9	2299	266,0	5,33	68,58	1,693E7
AAEL002827-PA	28,37	13	10	504	53,9	5,12	67,39	2,932E7
AAEL002834-PA	16,52	12	8	557	61,1	6,43	64,63	5,516E7
AAEL008166-PA	35,56	12	9	419	44,2	9,00	61,30	9,061E6
AAEL003182-PA	25,36	10	8	418	47,0	5,57	60,82	2,578E7
AAEL015065-PA	5,01	9	9	2414	277,8	5,25	59,35	6,568E6
AAEL008340-PA	8,97	8	7	1182	132,7	5,25	52,60	1,168E7
AAEL004112-PA	46,88	7	5	192	21,4	5,96	47,99	8,745E7
AAEL001951-PA	20,74	7	5	376	41,6	5,48	43,48	1,847E7
AAEL002558-PA	6,93	5	5	924	104,5	7,06	42,07	1,245E7
AAEL005766-PA	16,53	7	6	363	39,1	7,87	40,68	9,308E6
AAEL002704-PB	17,75	6	4	417	47,8	6,70	36,51	1,906E7
AAEL003600-PA	11,86	4	4	312	35,8	6,42	33,98	2,160E7
AAEL017349-PA	12,98	6	6	655	72,2	5,20	33,55	1,732E7
AAEL011741-PB	22,17	6	3	203	23,2	5,17	31,82	1,938E6
AAEL002956-PA	9,85	4	3	467	51,6	8,82	28,65	8,427E6
AAEL001194-PA	2,81	5	4	2422	264,9	6,62	28,14	2,518E6
AAEL003584-PA	27,63	5	4	152	17,5	8,37	26,60	5,723E6
AAEL017263-PA	6,05	4	4	925	103,6	5,24	25,82	5,787E6
AAEL005656-PA	2,22	3	3	1940	221,3	5,99	25,30	3,614E6
AAEL003601-PA	15,82	4	4	316	36,2	5,31	22,44	4,107E7

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area
AAEL007718-PA	10,17	5	5	688	80,1	5,80	22,22	9,105E6
AAEL016984-PB	21,39	5	5	332	35,4	8,18	21,48	1,702E7
AAEL010235-PA	7,69	2	2	273	29,1	4,27	21,03	9,295E6
AAEL011704-PA	7,27	4	4	715	81,5	5,03	19,88	6,769E6
AAEL010821-PA	10,48	3	2	315	33,8	5,60	18,30	4,760E6
AAEL006333-PA	5,59	4	3	572	63,2	8,38	16,72	2,055E6
AAEL010599-PA	1,26	2	2	1662	190,7	5,99	16,41	2,625E6
AAEL006424-PA	14,33	3	3	321	36,9	7,78	15,98	1,285E7
AAEL007420-PB	7,00	2	2	414	47,4	9,25	15,91	5,615E6
AAEL010382-PA	2,05	2	2	1268	139,5	6,73	15,59	2,645E6
AAEL000641-PA	4,66	2	2	494	55,9	5,02	15,28	2,946E6
AAEL012207-PC	22,50	4	3	120	13,6	4,81	14,94	5,711E6
AAEL000424-PA	8,04	3	3	510	54,8	6,46	14,88	1,470E6
AAEL005324-PA	0,65	2	2	4779	537,0	5,92	14,72	1,504E6
AAEL006719-PA	6,38	3	3	737	80,8	7,44	14,69	1,433E7
AAEL013407-PB	8,53	4	3	504	56,8	7,56	14,36	2,310E6
AAEL007950-PA	4,92	2	2	488	53,8	5,63	13,74	1,923E6
AAEL017096-PA	7,56	2	2	463	50,4	9,09	13,61	1,007E7
AAEL003530-PA	42,86	2	2	112	11,5	4,28	13,51	6,496E6
AAEL006885-PA	16,94	3	3	248	28,2	4,88	13,46	2,974E6
AAEL006417-PA	11,75	3	3	332	38,6	9,23	12,03	4,551E6
AAEL000793-PA	12,55	3	2	255	28,9	8,88	12,01	1,858E7
AAEL012175-PA	5,26	2	2	551	59,4	8,94	11,69	5,865E6
AAEL004297-PA	2,48	2	2	1127	122,8	7,18	11,04	2,751E6
AAEL014562-PA	18,79	2	2	165	17,6	8,97	10,41	4,028E6
AAEL014548-PA	10,50	2	2	238	26,8	7,25	10,40	6,621E6
AAEL005270-PA	25,00	2	2	144	15,3	5,02	9,84	5,211E7
AAEL011881-PA	7,11	2	2	394	42,5	4,93	8,65	5,790E6
AAEL012421-PA	2,11	2	2	1420	159,0	4,70	8,05	1,052E6
AAEL006096-PA	6,68	2	2	389	43,0	9,04	7,91	1,758E6
AAEL009691-PA	2,12	2	2	1180	130,6	6,87	7,64	1,044E6
AAEL000517-PA	21,36	2	2	103	11,4	11,36	6,26	1,402E7

Apêndice 8 – Sequência completa do transcrito AAEL003655.

```
AAACCAACCCGTTTAAGAAACGAGAAAATGGAAACTTCTACGGAGCAACCCCAGACTACCGGAACGGAACAGCCCAAAACGATGGAGAAGGCCGTTTTGG  < 100
AATTCCGGAACCCCTCCACCCTGGTGGAAGGACTACGGGGTACGGTTGAGGCGGCTCTTTTGCTGAACGAATCGTCTGGAGTTTCGTTGATTGGTGTGAA  < 200
GTGCGAGCAAAATCTGTTTCTTTATCGGTTCGACGAGAAAGACAGAAAGATGACATTGTTGGACGCCAAGTTTGGCGTGTTCGACGAAAATCGGTTGG  < 300
AGGCAGTGGTGGTTACCGAAGAAAGGATTGATCGTTGCGCAGAACGGGAAAATTGTTAAAGTGTTTAGATTGAACGAGACTAGAGATGGGTTTGACTTTG  < 400
TGAATCAAGTGGACGCTTCTGATTATGTTGAAGTTTTGATGGGAAATTTCTTCGAGGATACACAATTGGACGCGCTAGTTCGAGACAAAAATGAGTGGAC  < 500
ATTTAAATCATTCAAGAATTCTACATGGAATAACCAAACCGTTGAGCTTCCCGAAGAGATGAAGGAAGAGAAATGTGAAGTTCAAGTGATTAGTAAATTT  < 600
ATTCGTGAAAAGGACGTGTTTGGGATCAAAACAGTCGAAGGTTTCGGCATATATCAACTTAACGAATCTAAACAGCTTAAAACGGTGGTGAAGTGTATGA  < 700
ACATCAAGCTTCCTGAAGATGCCGAATTTGACCGGATCGCGTTCGCTAAGTTTTCCGACGCGAAATTTAAGGATTTGTTGCATCTGAACGCACTTCTGGATT  < 800
GAATGTGTATCGTTTCAATGAAACTTCAGGAAACTATGAACCACGTTTGTTCAGCACTATGTTTTCAAAATTTCGCAATTGGAATGCTGAGCTTGTGAGC  < 900
TCTATGATGGTACACGATATGAACGGTGATGGACGTGACGAGTTGCTGTTCACTACACCAGCTGGATTTCAAGTGTTTAGAGCAGTTGAAGAAACAAATG  < 1000
ATTTTTATATAGAACAAGTAGTACTGAAGAGTGAGGAAGATGTCCACCGTTTTTTTGAATTTGAAGACCATTCTACCGAAGAAGCAAAACGAATCTAGTG  < 1100
TAATTTTTCATGATGGAGAAAAGCTTTCTCTAATGGATGTTGAGAATACTACCATGACAATCACGCTACCGCAGGACATCAAACCGAAGAACATTTCGTC  < 1200
GCAAATCACGTTGATTACACCGGCGGTAAAATATTCACGTTGGTTGCACGAGCAGTTGGATCTGTCGGAGTTGCTTCAACCGATGAACTCTCTAACGGGT  < 1300
AAAGTGGAGCTTTGCATTCCGTTGGTGCAGTTGGATAATCCCTTTGGGATCAGTGTGAGGAAGAGCTTCCAGTATCGAGATATTCCTGGAGATGACTATC  < 1400
TGGCACGAGGATGGACGTTTCCGCTGGAGTACATCGTTGTGGATTGGCGGGGAAGGGTTTTCGAGCAGGATTTTCGATATTTTATGATAGGGAAAAATTT  < 1500
GAAGATCAGCCTGTCGCCAAACTTTGAAAAGTCCAACAACGAGACGGTTTTCTTCGAAGTGCAACCAGGGGTGGTGTTGACATACTTCAAAAGTGAGGAG  < 1600
AAATGGGAAATGGACAACAAGGAGGAGTCGATAAAGTATATTTTTGGGAATCTAGAAACAACGAAGGGTTTGAGATATAAGGATCAAAACGCTGATCTAA  < 1700
AAATCGTGACTGAGTGGTATTTGGTCCGCGAAGAAGACACCTCGGGCAGCTGGGTGGAATATAAGTACGACTTTGAAAAGAGTAGTGCAAAACTCGTAGG  < 1800
CATCTCCACTGATCAGAAGTCTACTGTCGAATTTAAATACATAAAATACGAAAATGGAGAGCTTCATAGTTGAAACCCAGTTCTACAAACAACATGTAATT  < 1900
CTACAAATGGAGAAAAAGGACGATAAAGATTATTTAACTGGTGTCAAACAAGACAATTATCCGTTATTTGAATTTAAATATGACTCTGACAGAATGGTAA  < 2000
AAATTGTCTATCCCAATGGTTTAAGTTCAACCCTGGAGTATGGCGAAGAATCCATTGATACCTTAAGCCGTAACGAACTGGAACTAGCTAGTCGAGATTT  < 2100
CACTATAAACTACGGACCAGATTATAGCGTTATCGCTACAGCCGCACCTGATAAGACATATGTGAGGATAAATGTACGTGACGTACTCGGCGGATATCAC  < 2200
ACTTCGAAGACATTCAACAGTACGTTACTCAATGATCAAGAGCCATTCTCTGCGTACCAAGTCGTCACTCTGGAAGATCTGTTTGGGATCATAAGAACAT  < 2300
TCAAAACGGAGAAGATTCTGGATATCTTTAGGTTTACTGAAGACAAATGGGATACAACTACGCGAAATTTAACGTCTGATGCAATCATTACTAGCAATAC  < 2400
TAACTACGTTTATGTGGCTGATGCTGAAAAACTGCAAAGTATCGCTATGGGAACTGATGACGCTTTGGTATTCTACTTTCAAAATATTACCAACAATGTT  < 2500
GCGATGCACGCAACTAGCCGAGGGCTTCTGTTTTATGACGATCAAAAATTTGTTCTGCAATATACACTAAACAAACAGTCCCTAACGGGGAAATACAATA  < 2600
GCGATGATGAGGACTACATCCAAAGTACAATCTCTACGCTAAATCGATTCATGTTGACAGACGAGGTGAAAGCAAATCTTATACGAGCACTGAAATTGGG  < 2700
TATGATTCAAACGTACAAAAACTTCATCATATTGCGGGAACTGGAAATCATCAACGGAGTTTTGAAAATATGTCTAAGACAAAGAGAACTGGATGTGAAT  < 2800
AATGAGATAGTTAAAAGTGATCAATGGAGGATCAATCTGGGAAACGTTGAAAGCTTCAAATTGAAGGTCAAATCAGAAAACGATGATTCATGTACTCTGG  < 2900
GATACATGACGTACTTGGAGAAATATGCTACTACTATCAGCTGTAGTGGACCATCCGTTGATCTTTATAACAGCACATTTCATGGAGAAATGCTATCTGC  < 3000
TCTGACTGATGAGGATAAAGTTGGCAAAACCATGAACGCGATAATAAAATACAGCAATTCTATGGCAGCATTTGAAACAGAGATTTTGGACAAAAATCCT  < 3100
CTTGCTTTCGATGTATCGCTGTTGGCTATTTCCACTGATGAGCAAGGCATCCAAACCGGTGGGAAAATAATTTCCTACAACGAAAAGGAATGGACTGAAA  < 3200
AGGACCCAAAATCAGATGTAGATTTAGTATTGCGAGATAAACTGAAACTTGTAAAAAAATCCAGCGATTCAGATACATACAAGGTTTACAACGATACTGT  < 3300
AGTCATTTATGATTCGAATACCACTGTCTCCGAATCAGTCAAACTAGTATGGCCTCATTATTTCGCTTCACAAACTACGGATGGCTCCACCGTCATTGTAC  < 3400
CTTTTTCAGGAAAACAAAGTAGTAAAACTGAATAATGATGAAAAATTGAGTACCCTCAGTAACAAAATGGTAGTAGTTACAACATCTGAAAACAGCACTA  < 3500
AACTGACGTTATTACCAGTCAAATCCATGCAACAATCAAAAGTTGAAGTTTTAATAAAGCAAACGTTGGAACTGGGCCCGAACGTATCGCGAGTTACCAC  < 3600
ATACGAAAATGGCGGAATGGAGCTGGATGGTGTATCGAATGGATACGTTTTCACTGATAGCAAAATACTTCCCGGGGGTAACAAAACCAGATATGGGTGG  < 3700
TACCAGCACAGTTATGACATGAAAACCCGGGAGTTGCGACGCAGTGCCAGAGACAGCGAAGGTAATCTGATCAAATATATAGACCCAATGCACGAAGAAG  < 3800
CGCGTGAAAATCCCAACCCTGCGACGGTCCTTACTGATAAAACGGGCCGTTTGTCAATAGTGGACATGGCTCCAAAGAATGTTCAAGATGGTGACTATTC  < 3900
ATACTACGGGTTTGAGGAATATGAAAGAAAAATGTTCAATACGCTTCGATGGAAGTTCGATGATAAAAACATAAAAACGGAAGGTGGTAATCGCTTCCTT  < 4000
CAACTTGTATCGGAGGATGCTTTTGAAGGAATTCTTCACATAAGAAGTGCAAATGAAACGTACCTGTTTTCCTGCTTGCTGAGAACAGATACGCCTGAAA  < 4100
AAATCGAAGAGGTACTGAACTTTGTATCTGTTAACTTGGATGATGCCCAAAAGTATAAAATCGGAAAACCCAAGGTGCTACATGCAATAGCAACAGGCTG  < 4200
GTTTTACGTCGAACTGAACATAACTACGACGAACTTAGTAAAACCTACGTCTGTAACCGTCACAATAAAGCCACAAGCAGATAAAACCCTCAGCGTTGAT  < 4300
CATGTAAGATTCTCCCCGATGAATGTCGACTTCCGGGCTTACGTCTATCGTCGACCGTTCTGGGGAGTCAGCAGAGTGATGCACAACAGTGGGCTGCTGA  < 4400
CTCAGTATCTGCTGGATTCCCACGGAAATCGTGTCGTTTATGTGTCCGAAATGGGAAAAGTGACTGATTTTATAACGTACTCCAAGTCGTACAACATCAG  < 4500
AGGATCGCAGAAGTTACCGCATGTCATGGAGATCAGGCCTAGGAACGGAGAAATCGAATGCTTCAATAATCCTTCAAGCTGGACTCCTGAAATTAAGAAA  < 4600
GATATATGGACTATGCAAAGTGGAACGTTGAAACATGTTTCAAACTCGACGGATACGATCAGTAGAGATTTGTCGTATAACTGTGATCGTTTGTTGTCA  < 4700
GATTTGTATACAACTTAGATTCTAACGATGCTGTGATAAAACTTGAAATTGATCACTTGACAATTGATGTTCTATGCAAATTTTCCAAAAGCACATGTGA  < 4800
GTCAAACGGAAACATTTCTGATTATGGCGAAATCGTTATATTTGTATCAAAATCACACAAAGCGATATGGTTTGAAGGCAGTCTCATTTCTGAAGCGTCT  < 4900
CATACCATGTCTGGTTTTGAAAAGGTTGGCATTACAGTATCCGGCTCGGTAGCGATCAATGAAATGCTCGTGCTGTATGATCCTTCCATGAAGATCACCT  < 5000
ACTACAATCGGCTTGGCTTACCTAGACAAACGCTTACCATGCAGGACGAGAACTTCATTAGAATCAAAGAAGTTCTGTACGATGAAATCGATCGTTCTAT  < 5100
CGTCAACACAAAATGGACAACCGTGGAGAAAAATGGTAGTTTGTTCTTCGATTTCCACGAGAAATTCATCGAATCAGTGGAATCTAACCAGTTGACAGGA  < 5200
CTCGTCCATGACTTGAACCCGGATTGTGAAGGGTACCCATATTTCCGGAAGGATTATGCAGACAGTCCCATCACCGAAGAAGTAACGATTTCGATGCCGG  < 5300
GAAAAATCTTTTCGGAGGACACCAAATATTCCAGGCAGTTGGCTAGACAATCCAAATACGTTGTGCTGGATAGGCTGTTTCCTTCTACGAGCGGCTTCAC  < 5400
GCAGCAGGTAGAAATACGGCAGAACAAAACCTTTCATGTCGTTGTGAACGATGCCAATAACCAAAAGGTAGCTTATTTCGTGGCAGGTGACAGTTCCGAT  < 5500
GCACGAATAACAACTTATGAATATGACAGCGAAGGTAACCTTATTCTGGAGTTGCCACCTATGTACCACAACGCGACAGCTACACTGAATCTAACGATTC  < 5600
CGTTTTGGGACAGAAACTTGACGCAGACTGAGTTGAAGTTACAGGATCAATGGGGCGTTCGCTATACATACAACGATAAGGATCAACTTTCGAGCAAAAG  < 5700
AATGCCTGACTCTGGAATTCAACAGTACATCTATGATGGTGACGTTGTGAGATTTTTAGTACACATGGACAACCATAACAAAACTGATAAGACCGTCTTT  < 5800
TTCTCATATGGATCAGCTGGACAAATTATCAAAGAAGCTGTTGTAGACGTTGCTCTAACTGATTTCAACCAATACTTAAATGGCAGCGCATTGGTACCTG  < 5900
ATTCCAAAAACTATATCGAATACTACCATGGAGAATACGACGAATCGCCCAATATGAGACATAGATCGCAACAATCGATCAGACGCATTGGAGACAAGCA  < 6000
CATGATAGAGAGTTTAATCAACGATGACGCTAACAGAATTGTGAAGAAGATATACATTGTGCCAACGCTGAACACATCGTACGCAATCGATTATGAATAT  < 6100
CTCAACGACAAACTTTCCATGATACAATACCCTATTGGCGTGAATGGTACCGGTTTCAAAGTCAGGTATGCCTATAACAACGCTGGAGATATGATCGCCA  < 6200
TTGGGACCACGGCAGATCCAGAAAAGTTCGTCAAACTGCAATACAACGCAGATGGCTTGGTACGGGAAATGCAGTTCGAACCAAGTTCCTCCTATTCCTA  < 6300
CAGACGAGAGTACAGTTACAACGAACCCGGCTATCTGAAACGGATTTCTGACATGTTTTTGGAAGAAACGGTTAGCTACCTGGAAGGTGATGGATATGGT  < 6400
AATGCCTTCTCCATGATTTTTGAAGGCTTGATTTCAAGAACCACCTTTAATGCAACGTGGTTTGAGCGGAGCAATCCAGCATTATCCAAACTGCGGTTGG  < 6500
ATGGCATCGATTCTTACGACAGAACCCTCACAGAGTTTTGCATCAAACAACTTCAATTGAGGAGATATTACGACAACCATTTCCATCCAATAAAATCATT  < 6600
CTACCCTAAATTGGATAGCTCCATCAGTGAAGCCTGCAGATCGAAACAGTTCTACAAGGCATTTCATGTAAATCAGTTTCCCCGCTACTATGGACACTCT  < 6700
TACGATTACGACAATCACGAACAATTGATTAGAGCGAAATATTTCCAATCTCAAACTGAAATTTCGTTGAAACCGCTTCTAGAAACAAGTTTCTCATCCA  < 6800
TTAAAGGCATAAACGAAACCGTATCCAAGGAAATCTGGAACATTCTTATGGAAAACGACTTCGTTTCGAACAATTGTTATCATGGTGGAATATGCGAAGG  < 6900
ATTACCTGGAAATAGATCTTTGCTTAATACGCTGATACCGAATAAATCTTACGTTCAGGCATTTATGTTGAAAGCTGTATCTAAAATGAAAACTTTGACA  < 7000
GATGCAGACTTCATGACAAAATGCTTAAAATGGTTCGAACATTCCGAAAACGTCGAACAATTCGATTGTACTGAATTGAAGAAACAATTGCAAATCCACA  < 7100
ATATGATAGGCTTAAATTCCAACCAAACATTGAACGCATTGAACAGCGATCTCCAAGCGATGCTTTCATCTTACTCACAGTACATTCCTCAAATTGTCCA  < 7200
GAAGCTTCATAAACACTTTGCAACACGCCTAGGAGAATCGCCAGCTGATGTACTGTCGTGTCGCTTTGACGCCAATGGTAACCATCGCTTGTTCAGGAAG  < 7300
GGATCTATTCGGTATTCATTTGAGTATACCAATGGAACCAACCAAATAAACACAGTCACAAAAACTGACACTTACGATTCTGAAAACTCCATCATCGCGT  < 7400
ACGCAATTGTACACAATAGCGAGGGAAGTGTCACTGTCGCCCAGCATAAGAACATAGAGAAGATCGAATACGATCCTTTGCTGAATAGACCGTCCAGTAT  < 7500
TCACATGGGCAATGGAAGAAAGCTAAAATTCGAGTACGACGTACGAGGAGAACGAACTTTCAAGCAAATTATCGAGGAAAGATGGGTATGTGAGTAAAGAA  < 7600
AAGTACTACATAAGAGATTTGAATAGGAATGTGCTAGTAGATTTGCAATTGACCTACGTAGCCCAGAATAAAACACCGGACATACAGGTTACTAGCTATG  < 7700
TTTACTCAGATCAAGGCCTGGTTGGGTTCGTCAGAAATGACGAATTCTACAGTGTGTTCACAGACCATGAAGGATCCACAAGGTTGGTGATCAAGGACGG  < 7800
TGAAGTTAAAGCCGCTTACGACTATCTACCGTTCGGAATAATTTTCCGCAAATCTGAGAGAGATCTGGATGGTGCACTCTCCTATCTCTACACCGGCCAA  < 7900
GAATGGGATGAGGAAACCGGTCTGTACAACTACCATACACGATTGTATGACCCGGAAATTGGACGGTTCTATCAGATTGATCCCAAGAACCAATACGCTA  < 8000
GTCCTTACATTTACGCTGGTAATAGCCCTATAGGCCTGGTGGATCCAGACGGACAATTCTTCATGACCTTGATTGCCATAGCATTGGCAATTGTAGGAGC  < 8100
GTATCTGGGAGCGGCGGCAGCTAATGGATCGTGGGATCCCACCGAGTGGAATTGGAAGAGCGGTAATACATGGTTGGCATTGATAACTGGTGCACTGGCG  < 8200
GGAGCCACCCTACCATCCAGTGCAGTGGCAACTTTCGCATATTTTACTACAACCCTAGGACTCAGCGTGAGCACTGCTTTGAGCATTATGGTCGGTAGTG  < 8300
GAATTGGGTTTTCGTACTTTTCCATGGCCGCAGCCAACAATGATTGGAATCCCGATCATTGGGATATGAAATCACCTGCTACGTGGAATGCATTTTTCGC  < 8400
CGGAATTTCAACGAGTATGAATGTAATGACAAATCCACACAATTTGGCTAGTTCATACTCAGCCATCACCTCTACAGTTGGGAAAGGATTGTTCATAGGT  < 8500
GGCAAATTGATTCTAACCACCGGATTCGCCTACATTCTAGGAGTGATCCAACAGAACGGAGAGTTCGATCCTTCAAAATGGGACTTCTCGAAACCAGGAT  < 8600
TGTACATGTCATTGTTCAACGGCGCTGTGAGAGCTACATCAACAGTCAGATTCTTGAGTAATTTACCAGAAAATGTCAAATCAATTTCCCAAAGAGTCGG  < 8700
CGAGTTGATAAGCAGCAAGCAATTAAGTATAGCATTCCTCAACTTCAAGCAGCACTTAGGAAGTGACTGGTCGAAACAAATTTCTAATACCCGCCACATT  < 8800
CTACACGCTTATTCCGGAAATCTGAAAGTATCGGAAAAGGCTCGTTCAACGTTTTACTCTACACCACAGTATCCTCGTTGAGAATATCTAAAATCGTTG  < 8900
ACAAAGATAAAGTTCCCGAGCTTGGTATTGCGTTAGAGATCATCAATCAAATACAAAAAGTCACTTCAATTTCCGATTATTTGGTAAATAATTTTGACTT  < 9000
AACGGAATACCCAAAAGTTAAAGATGGATCATATCGCCTAAAACGGAGTATAACAGAGGATTCACAATTCAACAGCACATCATCCGGTGCGTCGAGCTTC  < 9100
TCTCGCTCATTTATGGACTTCATCAGCTTCCGTTTACGGAATCATAACACACCAGTGACTCCAAGTTCGAAAGAAATGAACACATATTCACCACAAACCA  < 9200
AATCTTCAGTAGGTAAAAGTTTTACAATACCCAATTGTTTCAAACTGCACCCCAACAAAAACGAAAATCCATCCATCAAATGCTACGGACACCACTCCCA  < 9300
AACTTCCATACATTACAAAACTTACCACGCTGAGATAACACAAGATCGCTTCCAGAGTTGTTATCCAATCTATTACAACGGTATTCCGAGTGTTTCTTGC  < 9400
GAAGGACAGGAGTCTTCATTGTTATTCACTTCCTACGAAACACCCAGATTGTTTGATCACGTCGATGGGTGGATTCTGCTGGCTCGTGTTATACCCACTG  < 9500
CAATCAAAAATATCGTGTCCGGTGTGCGAAGAGTCTGCGGTTGTGATGGGAGCATTCCATCGGAACCCGTATCGGAAACAGAACTGATCTCAATGATGAA  < 9600
CGATCATGCGGGACTTGGTGATTTGACGGCGATATGCGAAAACTCCGAATGGGCTCGGAAAGCTATCGATGAGTTGAACGAAGATTTGTCGGAATTTATG  < 9700
AACGAGCCGACGAGAAATCGACAGATGTATGGGGTTTTGAAGGAGAGAATCGCAGCCCTGCGGGATGATGTTTTGGAGGAAACAGAGCTTTTCCAAAATG  < 9800
TGGATCAGATATTCAGTTATCTTGGTGGCAAAAATTGCCTATGCTTGAAGTGACTCGGACAATGGAGGTCAAAACTATGATGCAAGGAATACTGCAAGAT  < 9900
CTTGAAATTGGACGACTAAATTGATCGACGAGCRTTTAGCGTTTAGGGGTTTTATAATATTTTCAATTAAGYATTTAAATGAACGAATRAAAATTGGTGT  < 10000
AGGTAGAGTATTTGATGTACTAAGGAAAATTACCGCGAACATTTTTATAAAAAATCGAAATGACTTCACCCAAATGTTGCACTGAAAGTATGATATTGTA  < 10100
TTGGCactaaatgtAGCAATTTTCGCCCAGAAATAGGTGCCTGAAGATTGTCGGAACATAAAAACGTTTTGTTAAAGATGATGAAAAAAAAAAAAA  < 10196
```