

**MARESSA DE OLIVEIRA HENRIQUE**

**Reação eosinofílica decorrente dos componentes salivares  
do mosquito *Aedes aegypti*: caracterização  
do infiltrado inflamatório**

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

São Paulo  
2016

**MARESSA DE OLIVEIRA HENRIQUE**

**Reação eosinofílica decorrente dos componentes salivares  
do mosquito *Aedes aegypti*: caracterização  
do infiltrado inflamatório**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

Versão Corrigida. A versão eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca 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)

Henrique, Maressa de Oliveira  
Reação eosinofílica decorrente dos componentes  
salivares do mosquito *Aedes aegypti*: caracterização  
do infiltrado inflamatório. / Maressa de Oliveira  
Henrique; orientador Anderson de Sá-Nunes. -- São  
Paulo, 2016.  
92 p.

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

1. Picada de Inseto. 2. *Aedes aegypti*. 3.  
Eosinófilo. 4. Interleucina-5. 5. Leucotrienos. I. Sá-  
Nunes, Anderson de , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Maressa de Oliveira Henrique

Título da Dissertação: Reação eosinofílica decorrente dos componentes salivares do mosquito  
*Aedes aegypti*: caracterização do infiltrado inflamatório.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou o(a) candidato(a):

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

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

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

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

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



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

## CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **121** nas fls. **24** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Anderson de Sá Nunes**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Reação eosinofílica cutânea decorrente da picada de mosquitos: caracterização do infiltrado inflamatório e do fator indutor de IL-5 presente na saliva de Aedes aegypti*" do qual participam o(s) aluno(s) **Maressa de Oliveira Henrique, Michele Silva de Barros** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **29. 10.2014**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 30 de outubro de 2014.

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

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

**Dedico este trabalho ao  
leitor-cientista que inspirar.**

## AGRADECIMENTOS

Certa vez li um texto que contava a história de um professor que disse aos seus alunos que, desde que havia começado a lecionar, observou que os professores trabalhavam com apenas 5% dos alunos de uma turma, pois estes tornavam-se profissionais brilhantes e contribuíam de forma significativa para melhorar a qualidade de vida das pessoas. Isto podemos aplicar a este trabalho, porque envolve uma história escrita, apoiada, acima de tudo, em pessoas. Assim, agradeço as pessoas que estiveram durante esta fase da minha vida de forma direta, outras mais indireta, ou àquelas precedentes a esta dissertação de mestrado mas que eu gostaria de demonstrar o quão importante foram nessa história.

*Ágape* para dizer daqueles que sempre estiveram comigo contribuindo para harmonia e torcendo por cada etapa da minha vida. Essa paz no viver seria impossível sem a sabedoria e os cuidados do meu Pai, Osmar, e da minha mãe, Amália e o incondicional apoio do meu esposo João Paulo. Dessa energia serena fazem parte meu irmão, Abimael, minha irmã Karina e minha cunhada Fernanda. A família, minha fortaleza, que sem ela nada faria sentido para mim.

Essa história tem o valor de outras mãos, as quais contribuíram para que eu chegasse até aqui, às quais sempre serei grata. A minha querida professora Ana Maria quem me alfabetizou e com paciência segurou minhas mãos para que eu aprendesse escrever. Ao meu querido professor Luiz Carlos Zacharias (*in memoriam*), uma pessoa ímpar. A Universidade Federal de São Carlos onde graduei e conheci àqueles que me iniciaram na Ciência, apresentando o caminho científico. Ao professor Marcio Roberto Soares que me mostrou com leveza e profundidade este caminho. Aos amigos que conheci nessa caminhada, Gabriele Kataguirí, Cíntia Gabriela, Elisa Franco e Ionele Almeida.

Nessa nova etapa em que está encerrando os agradecimentos se devem ao Professor Anderson de Sá Nunes, orientador, pelo amparo, suporte, compreensão e incentivo. À professora Ana Paula Lepique pela ajuda na citometria de fluxo. À Sandra Alexandre, técnica do Laboratório de Imunologia Experimental, pela paciência e amizade e por tornar o trabalho menos cansativo. Aos colegas de trabalho, Bruna Bizzarro, Eliane Esteves, Marcelo Pinheiro, Mariana Hayashi e Priscila Guirão. Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP).

Em São Paulo conheci pessoas que tornaram a vida acadêmica mais doce que me ajudaram a manter firme na caminhada, às quais chamo de amigos: Murilo Duarte, Plínio Martins, Roseane Rabelo e Fernando Farias. Foi nessa cidade também que conheci uma nova fraternidade, minhas amigas-irmãs, Leila Santos, Michele Barros e Josiane Betim, que me ajudaram com os experimentos, mas que principalmente tornaram os dias tristes alegres, a saudade suportável, o choro em riso, mágicas que a amizade é capaz de promover.

Não posso deixar de agradecer outros envolvidos que contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço aos bioteristas do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas pelo fornecimento e manutenção dos animais e ao histotecnologista Paulo Albe do Laboratório de Histotecnologia do mesmo Instituto pelo preparo dos cortes histológicos. Este trabalho não poderia ser realizado sem os mosquitos *Aedes aegypti* fornecidos pela Professora Margareth Capurro responsável pelo Laboratório de Mosquitos Geneticamente Modificados do Departamento de Parasitologia do ICB/USP.

Agradeço ao Professor Jean Pierre Peron e às Professoras Bruna Bargieri e Anita Tanaka Azevedo, membros da banca de qualificação, que dispuseram tempo e esforços para lerem e contribuir para o presente trabalho. Por fim agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

**Este trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de  
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e do Conselho  
Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**

Daqui a vinte anos, você não terá arrependimento das coisas que fez, mas da que deixou de fazer. Por isso veleje longe do seu porto seguro. Pegue os ventos. Explore. Sonhe. Descubra. (Mark Twain)

## RESUMO

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

Durante o repasto sanguíneo, os mosquitos hematófagos inoculam os componentes de seu coquetel salivar na pele do hospedeiro podendo causar reações inflamatórias. Existem vários trabalhos que descrevem o infiltrado celular após a picada de mosquito utilizando abordagens clássicas de histologia. No entanto, são escassos os trabalhos que avaliem esse infiltrado celular de maneira quantitativa/qualitativa com técnicas mais modernas. Adicionalmente, a literatura científica carece de modelos simples para o estudo das moléculas envolvidas na migração celular induzida pelos componentes salivares de mosquitos. Diante disto, em um primeiro momento estudamos o infiltrado celular na pele da orelha decorrente da picada do mosquito *Aedes aegypti* em animais sensibilizados ou não com o extrato da glândula salivar (EGS) destes mosquitos utilizando a técnica de citometria de fluxo. Observamos que enquanto o edema em animais não sensibilizados alcança um pico 6 horas após a exposição aos mosquitos, o mesmo só acontece após 24 horas nos animais sensibilizados, persistindo ainda até 72 horas. A fenotipagem das células imunes presentes no tecido por citometria de fluxo mostrou a complexidade de populações celulares presentes na reação inflamatória à picadas de mosquito, destacando-se o infiltrado de linfócitos B, neutrófilos e eosinófilos que ocorreram em ambos os grupos, porém de maneira mais intensa após 24 horas no grupo sensibilizado. Dentre essas populações, os eosinófilos foram as células que proporcionalmente mais aumentaram em relação àquelas encontradas na orelha de animais *naïve*. Em uma segunda abordagem, desenvolvemos um modelo de inflamação eosinofílica na cavidade peritoneal de camundongos inoculados com o EGS de *A. aegypti*. Utilizando esse modelo, fomos capazes de mostrar que a migração de eosinófilos se deve a atividade dos componentes salivares do mosquito e não a uma possível contaminação por endotoxina presentes na preparação. Além disso, a desnaturação das proteínas do EGS aboliu sua capacidade de induzir migração de eosinófilos, reforçando a importância da integridade das moléculas salivares nesse processo. Finalmente, mostramos que a migração de eosinófilos nesse modelo é dependente de IL-5 e de produtos da 5-lipoxigenase. Em conjunto, esses dados contribuem para a caracterização da resposta inflamatória do hospedeiro aos componentes salivares do mosquito *A. aegypti* e para o entendimento das moléculas envolvidas na reação eosinofílica presente em indivíduos sensibilizados.

**Palavras-chave:** Picada de mosquito. *Aedes aegypti*. Eosinófilos. Interleucina-5. 5-lipoxigenase.

## ABSTRACT

**HENRIQUE, M. O. Eosinophilic reaction resulting from salivary components of the mosquito *Aedes aegypti*:** characterization of the inflammatory infiltrate. 2016. 92 p. Dissertation (Master thesis in Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

During their blood feeding, hematophagous mosquitoes inoculate the components of their salivary cocktail in the host skin causing inflammatory reactions. Several works describe the cellular infiltrate following the mosquito bites using classical histological approaches. However, only few studies evaluate the cellular infiltrate in a quantitative/qualitative manner employing recent techniques. Additionally, the scientific literature lacks simple models to study the molecules involved in cell migration induced by the salivary components of mosquitoes. In view of this facts, we first studied the cellular infiltrate in the skin of the ear following *Aedes aegypti* mosquito bites in animals sensitized or not with the salivary gland extract (SGE) of these mosquitoes, using the flow cytometry technique. We observed that, while the swelling reached a peak at 6 hours after exposure to mosquitoes in non-sensitized animals, the same occurred only after 24 hours in sensitized animals, and the edema still persisted at 72 hours. Immune cell phenotyping of the tissue by flow cytometry showed the complexity of cell populations present in the inflammatory reaction to mosquito bites, especially the infiltration of B lymphocytes, neutrophils and eosinophils that occurred in both groups, but more intensely after 24 hours in the sensitized group. Among these populations, eosinophils were the cells that most increased proportionally compared those found in the ear of naïve animals. In a second approach, we have developed a model of eosinophilic inflammation in the peritoneal cavity of mice inoculated with the *A. aegypti* SGE. Using this model, we were able to show that the migration of eosinophils was due to the activity of the mosquito salivary components and not to a possible endotoxin contamination of the preparation. Moreover, the denaturation of SGE proteins abolished its ability to induce eosinophil migration, underscoring the importance of the integrity of salivary molecules in this process. Finally, we showed that the eosinophil migration in this model is dependent on IL-5 and 5-lipoxygenase products. Together, these data contribute to the characterization of the host inflammatory response to salivary components of *A. aegypti* mosquitoes and to the understanding of the molecules involved in this eosinophilic reaction in sensitized individuals.

**Keywords:** Mosquito bite. *Aedes aegypti*. Eosinophils. Interleukin-5. 5-lipoxygenase.

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

- Figura 1** - Protocolo experimental utilizado para a caracterização do infiltrado celular após picada de mosquitos *A. aegypti*. .....26
- Figura 2** - Cinética do edema da orelha e histopatologia após picada do mosquito *A. aegypti*. .....32
- Figura 3** - Estratégia de “gating” para identificar células imunes presentes na orelha baseada nas moléculas de superfície.....29
- Figura 4** - Imunofenotipagem do infiltrado celular na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”).. .....34
- Figura 5** - Quantificação das populações de linfócitos T e linfócitos B na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). .....37
- Figura 6** - Quantificação das populações de linfócitos TCD4 e linfócitos TCD8 na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”).....38
- Figura 7** - Quantificação das populações de mastócito na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). .....39
- Figura 8** - Quantificação das populações de macrófagos na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). .....42
- Figura 9** - Quantificação das populações de células dendríticas na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”).. .....43
- Figura 10** - Quantificação das populações de neutrófilos e eosinófilos na orelha de animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”).....44
- Figura 11** - Porcentagem relativa dos leucócitos presentes na orelha animais Naïve e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”), baseada nas moléculas de superfície..... **Erro! Indicador não definido**7
- Figura 12** - Representação esquemática da presença dos tipos celulares após 6 e 24 horas da picada do mosquito *A. aegypti* na orelha.....56

## Capítulo 2

<b>Figura 1</b> - Processos envolvidos na eosinofilia.....	65
<b>Figura 2</b> - Infiltrado inflamatório no LCP de camundongos BALB/c que receberam PBS ou EGS do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	75
<b>Figura 3</b> - A presença de LPS e a desnaturação térmica das proteínas do EGS não induzem migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal.. ..	77
<b>Figura 4</b> - Presença da IL-5 no sobrenadante do LCP e efeito da neutralização dessa citocina no modelo de reação inflamatória eosinofílica induzida por EGS de <i>A. aegypti</i> . ..	79
<b>Figura 5</b> - Papel dos metabólitos derivados da via da 5-LO no infiltrado inflamatório peritoneal de camundongos 129 ALOX 5 e SvG inoculados com PBS ou com o EGS do mosquito <i>A. aegypti</i> .. ..	81
<b>Figura 6</b> - Representação esquemática do EGS do mosquito <i>A. aegypti</i> modulando a imunidade na cavidade peritoneal.....	86

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**animal KO** – animal “knockout”, animal com disrupção em algum gene

**ANOVA** – Análise de Variância

**CD** – Grupo de Diferenciação (*Cluster of Differentiation*)

**CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais

**CONCEA** – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

**DNase** – desorribonuclease

**ECP** – Proteína catiônica do eosinófilo

**EDN** – Neurotoxina Derivada do Eosinófilo

**EGS** – Extrato da Glândula Salivar

**ELISA** – Ensaio Imunoenzimático (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

**EPO** – Peroxidase do Eosinófilo

**FACS** – Separação de células ativada por fluorescência (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*)

**FcR** – Receptor para Fc de imunoglobulinas

**FSC** – Dispersão frontal (*forward scatter*)

**GM-CSF** – Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (*Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor*)

**H&E** – Hematoxilina e Eosina

**i.p.** – Intraperitoneal

**ICB** – Instituto de Ciências Biomédicas

**IFN- $\alpha$**  – interferon- $\alpha$

**IgE** – Imunoglobulina E

**IgG** – imunoglobulina G

**IL-5** – interleucina-5

**LAL** – Lisado de amebócito do Limulus (*Limulus Amebocyte Lysate*)

**LCP** – Lavado da Cavidade Peritoneal

**LPS** – Lipopolissacarídeo

**MBP** – Proteína básica principal

**MHC** – Complexo de Histocompatibilidade Principal

**MCP-3, 4** – Proteína quimioatraente de monócitos (*Monocyte Chemoattractant Protein*)

**MIP-1 $\alpha$**  – Proteína inflamatória de macrófagos (*Macrophage Inflammatory Protein*)

**NCBI** – *National Center for Biotechnology Information*

**PBS** – Salina tamponada com fosfato (*Phosphate-buffered saline*)

**rpm** – Rotações por minuto

**RPMI** – *Roswell Park Memorial Institute*

**SD** – Desvio padrão

**SEM** – Erro médio padrão

**SFB** – Soro Fetal Bovino

**SSC** – Dispersão lateral (*Side scatter*)

**TMB** – Tetrametilbenzidina (*Tetramethylbenzidine*)

**TRFK-5** – anticorpo monoclonal anti-IL-5

**USP** – Universidade de São Paulo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> Reação inflamatória cutânea decorrente da picada do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	18
<b>1.1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>1.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS</b> .....	23
<b>1.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	24
1.3.1 Animais .....	24
1.3.2 Mosquitos e obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) .....	24
1.3.3 Sensibilização dos animais com EGS e desafio de camundongos com picadas do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	25
1.3.4 Cinética do edema e análise histopatológica da orelha após a picada de mosquito <i>A. aegypti</i> .....	26
1.3.5 Caracterização do infiltrado celular por citometria de fluxo (“ <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> ” – FACS) .....	26
1.3.6 Análise estatística .....	30
<b>1.4 RESULTADOS</b> .....	31
1.4.1 Cinética do edema e histopatologia do infiltrado celular na orelha em resposta a picada do mosquito <i>A. aegypti</i> .....	31
1.4.2 Imunofenotipagem do infiltrado celular na orelha em resposta a picada do mosquito <i>A. aegypti</i> por citometria de fluxo .....	33
1.4.3 Alterações quantitativa e qualitativa das populações celulares presentes na orelha dos camundongos em resposta a picada do mosquito <i>A. aegypti</i> . .....	45
<b>1.5 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>1.6 CONCLUSÕES</b> .....	55
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>CAPÍTULO 2</b> Participação da interleucina-5 e da 5-lipoxigenase na eosinofilia aguda peritoneal causada pelos componentes salivares do mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	62
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	63
<b>2.2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS</b> .....	68
<b>2.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	69
2.3.1 Animais .....	69
2.3.2 Mosquitos e obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS) .....	69

2.3.3 Inoculação intraperitoneal do EGS de <i>A. aegypti</i> e obtenção do lavado da cavidade peritoneal (LCP).....	70
2.3.4 Avaliação do potencial papel de LPS e da integridade dos componentes salivares na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de <i>A. aegypti</i> .....	70
2.3.5 Quantificação de IL-5 por ensaio imuno-enzimático (“ <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> ” - ELISA).....	72
2.3.6 Participação da IL-5 na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de <i>A. aegypti</i> ... .....	72
2.3.7 Análise estatística.....	73
<b>2.4 RESULTADOS</b> .....	74
2.4.1 Eosinofilia peritoneal aguda induzida pela inoculação de EGS de <i>A. aegypti</i> ..	74
2.4.2 Papel de LPS e da integridade dos componentes salivares na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de <i>A. aegypti</i> .....	76
2.4.3 Efeito da neutralização de IL-5 sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal induzida por EGS .....	78
2.4.4 Efeito na migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal induzida por EGS em animais com interrupção do gene da 5-lipoxigenase (5-LO) .....	80
<b>2.5 DISCUSSÃO</b> .....	82
<b>2.6 CONCLUSÕES</b> .....	86
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	87

## **CAPÍTULO 1**

**Reação inflamatória cutânea decorrente da picada do  
mosquito *Aedes aegypti***

## 1.1 INTRODUÇÃO

Os mosquitos são insetos pertencentes à ordem Díptera, família Culicidae, a qual inclui mais de 300 mil espécies, das quais três gêneros são clinicamente importantes por afetarem direta ou indiretamente o homem: *Anopheles*, *Aedes* e *Culex* (HARBACH, 2007; HARBACH; HOWARD, 2007). *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Linnaeus, 1762) é uma espécie considerada cosmopolita originária do Velho Mundo encontrada em regiões tropicais e subtropicais, tendo sido introduzida no Brasil durante o período colonial (CONSOLI; OLIVEIRA, 1994). Nesse contexto, o mosquito *A. aegypti* é conhecido por ser vetor primário de doenças emergentes e re-emergentes como a febre amarela, Chikungunya, dengue e Zika (BLACK et al., 2002; BURT et al., 2012; CHRISTOPHERS, 1960; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; NENE et al., 2007; ZANLUCA et al., 2015). No entanto, além do papel desse inseto hematófago como vetor para transmissão de doenças, o fato do mosquito se alimentar de sangue pode desencadear reações no tecido do hospedeiro (FEINGOLD; BENJAMIN; MICHAELI, 1967).

Os machos e as fêmeas do mosquito *A. aegypti* necessitam de açúcares, principalmente néctar, que servem como fonte de energia para o voo e metabolismo basal. No entanto, este tipo de alimentação contribui pouco para a fertilidade (FOSTER, 1995) e nesse sentido, a alimentação sanguínea realizada pelas fêmeas é importante para que ocorra o desenvolvimento dos ovos (CHRISTOPHERS, 1960). Desse modo, para se alimentar com sucesso, o mosquito necessita localizar os vasos sanguíneos de seus hospedeiros vertebrados e, antes de localizá-los, eles frequentemente fazem várias tentativas, às vezes, mudando o local da picada ou até mesmo o hospedeiro, processo conhecido como “*probing*”. Uma vez localizado o vaso, a alimentação pode ocorrer no vaso dilacerado ou no hematoma a sua volta (JAMES; ROSSIGNOL, 1991). Por conseguinte, o primeiro desafio encontrado pelo mosquito após a ruptura física da pele é a barreira da hemostasia, um sistema complexo e redundante do qual fazem parte os processos de coagulação sanguínea, agregação plaquetária e vasoconstrição que rapidamente inibem a absorção de sangue pelo mosquito. Contudo, durante o processo evolutivo junto aos seus hospedeiros vertebrados, os artrópodes hematófagos desenvolveram um coquetel salivar com componentes anticoagulantes, antiagregante de plaquetas e vasodilatadores que

neutralizam os efeitos da hemostasia do hospedeiro, tornando possível que ocorra a alimentação sanguínea (RIBEIRO, 1987, 2000)

A secreção das glândulas salivares é depositada no tecido do hospedeiro durante o “*probing*” e durante o repasto sanguíneo. Assim, além do trauma causado pela inserção peças bucais do inseto durante a alimentação, a reação cutânea à picada do mosquito ocorre principalmente devido aos efeitos da saliva inoculada durante o repasto sanguíneo (FEINGOLD; BENJAMIN; MICHAELI, 1967). As primeiras evidências de que a reação à picada de mosquito é de natureza imunológica foram reportadas por Mellanby em 1946 e Mckiel em 1959. Ademais, Hudson et al. (1960) mostraram que mosquitos cujos dutos das glândulas salivares foram cortados ainda foram capazes de se alimentar de sangue, mas sem provocar reação alérgica, mostrando assim que a saliva é essencial para o desenvolvimento das reações cutâneas. Repetidas picadas do mosquito podem provocar uma sequência definida de eventos na pele do hospedeiro (MELLANBY, 1946). A descrição clássica da evolução natural das reações decorrentes das picadas compreende cinco etapas nos seres humanos (MELLANBY, 1946):

- a) período de indução de hipersensibilidade com resposta clínica normal;
- b) reação cutânea tardia;
- c) reação cutânea imediata seguida de reação tardia;
- d) reação cutânea imediata;
- e) tolerância imunológica ou dessensibilização.

Peng e Simons (1998) reproduziram estas etapas de sensibilização e dessensibilização expondo naturalmente indivíduos saudáveis e coelhos a 100-140 picadas de mosquito a cada duas semanas por 10 meses.

No período de indução da hipersensibilidade, ao se alimentar, o mosquito injeta saliva no local da picada e pode sensibilizar o hospedeiro para proteínas salivares específicas (HORSMANHEIMO et al., 1996). Na primeira exposição, a resposta localizada é caracterizada pela associação de prurido seguido de pápula eritematosa que ocorre em minutos e desaparece dentro de algumas horas. Esta reação ocorre por um fenômeno associado à liberação de histamina, mas independente dos mecanismos alérgicos (FEUILLET-DASSONVAL et al., 2006). No entanto, este estímulo antigênico inicial ativa os mecanismos imunes adaptativos e, posteriormente, leva a síntese de anticorpos (FEINGOLD; BENJAMIN; MICHAELI, 1967). Os mecanismos imunes que envolvem a reação a picada de mosquito não

estão completamente esclarecidos, mas existem evidências que envolvem reações de hipersensibilidades do tipo I, III e IV (SINGH; MANN, 2013). García et al. (2004) também sugerem que a resposta cutânea a picada de artrópodes é mediada por mais de um mecanismo imune ao mostrar a presença de eosinófilos, células T auxiliares, padrão de resposta de imunoglobulina E (IgE) e de IgG na urticária papular ou prurido estrófulo causada pela picada de pulga

A terceira etapa da evolução natural das reações alérgicas em humanos possuem sinais da hipersensibilidade do tipo I, pois é mediado por IgE que reconhece substâncias presentes na saliva do inseto (MIOT; LIMA, 2014). Peng e Simons (1998) encontraram que o aumento de IgE saliva-específico inicia na etapa de sensibilização a picada de mosquito. A reação imediata pode ser seguida por uma reação de fase tardia (SOLLEY et al., 1976). Por fim, na última etapa do processo da reação alérgica ocorre a dessensibilização natural devido a exposição regular e contínua ao alérgeno. Larrivee et al. (1964) avaliou as alterações histopatológicas na pele durante as etapas da evolução natural das reações alérgicas proposta por Mellanby (1946). Durante o período de indução não foram observadas alterações da pele; no entanto, o segundo momento que compreende a reação tardia foi caracterizado por um infiltrado difuso de célula mononuclear na derme e, em menor grau, na epiderme no local da picada; na etapa seguinte, a reação imediata foi caracterizada pelo infiltrado de eosinófilos na derme no local da picada, enquanto células mononucleares estavam presentes na fase tardia. A quarta etapa, caracterizada apenas pela reação imediata, apresentou infiltrado eosinofílico. Por último, no processo de dessensibilização, a histologia apresentou-se praticamente normal.

No caso do *A. aegypti*, já foram identificadas algumas proteínas que provocam reações de hipersensibilidade em decorrência das picadas do mosquito. A Tabela 1 mostra um apanhado geral desses alérgenos e algumas de suas características bioquímicas e funcionais (ALLERGEN, 2003; 2016; ALLERGOME, 2015; 2016)

**Tabela 1 - Alérgenos presentes na saliva do mosquito *A. aegypti*.**

<b>Alérgeno</b>	<b>Nome</b>	<b>Massa molecular</b>	<b>Função biológica</b>	<b>Referência</b>
<b>Aed a 1</b>	Apirase	68 kDa	Inibe a agregação plaquetária	CHAMPAGNE et al., 1995; PENG et al., 2001
<b>Aed a 2</b>	D7	37 kDa	Desconhecida	PENG; LI; SIMONS, 1998; SIMONS; PENG, 2001
<b>Aed a 3</b>	Aegyptina	30 kDa	Inibe a agregação plaquetária	CALVO et al., 2007
<b>Aed a 4</b>	Glicosidase	67 kDa	Digestão de açúcar	JAMES; BLACKMER; RACIOPPI, 1989

## 1.2 JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS

A reação à picada de mosquito e outros artrópodes hematófagos é um modelo natural para estudar as células inflamatórias presentes na pele durante a reação cutânea alérgica. Na resposta às picadas de mosquitos, algumas das características observadas em humanos também podem ser reproduzidas em modelos murinos após sensibilização natural pela picada de mosquitos ou após sensibilização realizada com alérgenos recombinantes (CHEN; SIMONS; PENG, 1998). O modelo de exposição às picadas e aos antígenos salivares também pode ser particularmente relevante para investigar os mecanismos envolvidos na reação eosinofílica cutânea em resposta à exposição aos mosquitos.

Assim, no presente trabalho, tivemos como objetivo **avaliar o infiltrado inflamatório na pele após a picada de *A. aegypti* em camundongos sensibilizados ou não com os componentes salivares do mosquito.**

### 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou na Lei Federal nº 11.794/2008 (Lei Arouca) (BRASIL, 2008), no Decreto nº 6.899/2009 (BRASIL, 2009) e nas Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP), cujo certificado foi registrado sob o nº. 121, na folha 24 do livro 03 para uso de animais em experimentação.

#### 1.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c fêmeas com idade entre 6-12 semanas, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos no mesmo biotério, em estantes ventiladas e em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a água e alimento.

#### 1.3.2 Mosquitos e obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS)

Mosquitos *A. aegypti* machos e fêmeas foram mantidos a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa do ar de  $80\% \pm 10\%$  e sob um fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro no Biotério de Insetos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, coordenado pela Prof. Dr. Margareth de Lara Capurro, onde foram alimentados com solução de sacarose 10% [p/v] e acasalados. Glândulas salivares de fêmeas com 5-8 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  $\mu\text{L}$  de PBS gelado.

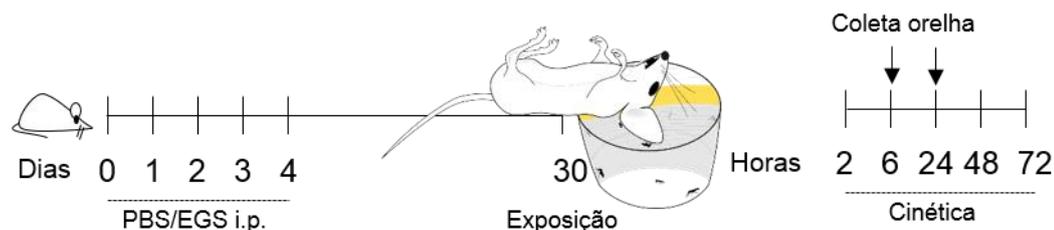
Para o preparo do extrato da glândula salivar (EGS), os tubos contendo as glândulas salivares foram sonicados para liberação do material solúvel e centrifugados a 14.000 g por 10 minutos à temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para remoção do material particulado. O sobrenadante resultante, referido como EGS, foi reunido e esterilizado por passagem através de um filtro contendo uma membrana de nitrocelulose com poros

de 0,22 µm Millex (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda). A concentração proteica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo 8 Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA) e alíquotas foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

### 1.3.3 Sensibilização dos animais com EGS e desafio de camundongos com picadas do mosquito *A. aegypti*

Resultados prévios de nosso grupo mostram que camundongos expostos repetidamente às picadas do mosquito *A. aegypti* apresentam uma peritonite com grande influxo de eosinófilos. Além disso, foi observado que quando camundongos *naïve* são injetados com esse mesmo EGS na cavidade peritoneal, há uma forte produção de IL-5 por células de baço estimuladas *in vitro* por concanavalina A após 30 dias dessa inoculação (Ramos, 2014).

Animais foram sensibilizados com EGS e desafiados com a picada do mosquito *A. aegypti* de acordo com o seguinte protocolo: inoculação intraperitoneal de EGS (5 µg/animal/dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos. Após 30 dias da primeira inoculação os animais foram anestesiados por inoculação subcutânea de cetamina (80 mg/Kg) e xilazina (10 mg/Kg) e a região dorsal de cada orelha foi exposta a 5 mosquitos *A. aegypti* adultos fêmeas por 30 minutos. Para tanto, os mosquitos foram colocados em um recipiente plástico coberto por uma tela sintética (filó ou tule), conforme metodologia adaptada de Maciel et al. (2014). A região da tela onde a cabeça dos animais anestesiados foi colocada foi protegida por uma fita, de modo que apenas as orelhas ficassem expostas aos mosquitos (Figura 1). Um grupo controle da sensibilização recebeu inoculação intraperitoneal de PBS por 5 dias (0,5 mL/animal/dia) e foi submetido ao mesmo procedimento de exposição aos mosquitos. Um outro grupo (controle negativo) não recebeu inoculação e não foi exposto aos mosquitos.



**Figura 1 - Protocolo experimental utilizado para a caracterização do infiltrado celular após picada de mosquitos *A. aegypti*.** Camundongos receberam injeção intraperitoneal de EGS (5 µg/animal/dia) durante 5 dias consecutivos. Trinta dias após a primeira injeção os animais foram anestesiados e desafiados na orelha com picadas de mosquito (5 mosquitos fêmeas em cada orelha) durante 30 minutos. A cinética do edema da reação cutânea foi avaliada 2, 6, 24, 48 e 72 horas após o desafio. A avaliação do infiltrado celular na orelha foi realizada 6 e 24 horas após ao desafio, por citometria de fluxo. Animais controles da sensibilização receberam PBS (0,5 mL/animal/dia) por 5 dias e foram expostos aos mosquitos como descrito em Material e Métodos. O grupo controle negativo não recebeu inoculação nem foi exposto aos mosquitos.

#### 1.3.4 Cinética do edema e análise histopatológica da orelha após a picada de mosquito *A. aegypti*

Após a sensibilização intraperitoneal (i.p.) com o EGS ou com PBS, os animais tiveram suas orelhas expostas às picadas do mosquito *A. aegypti*. A espessura das orelhas foi medida para avaliar a cinética do edema decorrente da exposição aos mosquitos. O resultado foi avaliado por meio da diferença entre a medida da espessura da orelha antes da exposição e após 2, 6, 24, 48 e 72 horas da mesma. Animais controles (não sensibilizados pelo EGS) foram expostos a picada do mosquito. A medida foi realizada com um paquímetro de precisão (Mitutoyo 7301, Kawasaki, Kanagawa, Japão).

As orelhas dos animais sensibilizados ou não e expostas às picadas do mosquito *A. aegypti* foram removidas e fixadas em solução de formalina 10% antes do tecido ser embebido em parafina. Cortes histológicos transversal de 4-5 µm foram produzidos e corados com hematoxilina e eosina (H&E) e os principais tipos celulares infiltrados no tecido foram avaliados por microscopia óptica.

#### 1.3.5 Caracterização do infiltrado celular por citometria de fluxo (“*Fluorescence-Activated Cell Sorting*” – FACS)

Em um outro grupo de experimentos, as orelhas dos animais expostos aos mosquitos (sensibilizados ou não com EGS) foram removidas 6 e 24 horas após a

exposição e processadas para fenotipagem celular por citometria de fluxo. As orelhas removidas foram separadas em folhas ventral e dorsal e cortadas em pequenos fragmentos. Para separação das células da orelha, o “*pool*” das orelhas de cada grupo foi digerido em uma solução de PBS contendo 10% de soro fetal bovino (SFB) inativado, 10 mg/mL de colagenase tipo IV (Sigma) e 1 mg/mL de desoxirribonuclease 1 (DNase) (Sigma) e incubadas a 37 °C, durante 40 minutos, sob agitação de 1250 rpm. Decorrido o tempo de incubação, a folha da derme foi separada da epiderme e, esta suspensão contendo as células e os fragmentos da orelha foi transferida para uma peneira de nylon com poro de 40 µm e macerada com êmbolo de seringa. A suspensão resultante foi centrifugada a 1500 rpm, durante 5 minutos. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de meio completo (RPMI 1640 suplementado com 10% SFB, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 25 mM HEPES e  $2,5 \times 10^{-5}$  M 2-mercaptoetanol). Orelhas de animais *Naïve*, foram processadas da mesma maneira. Essa metodologia foi adaptada de Belkaid, Jouin e Milon (1996).

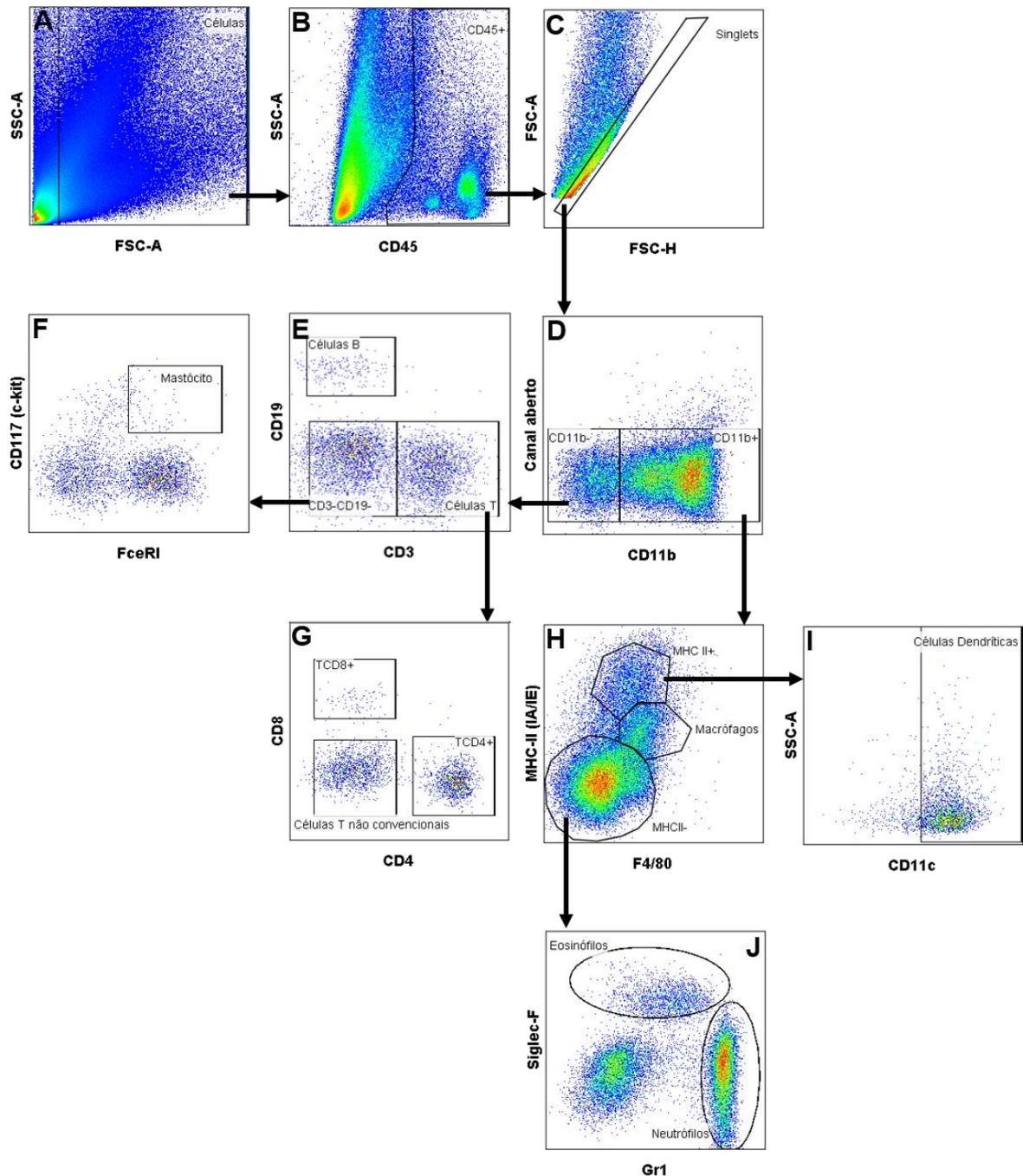
As suspensões de células das orelhas descritas acima foram centrifugadas e ressuspensas em tampão de FACS (PBS contendo 1% de SFB) contendo anticorpo anti-CD16/CD32 (diluição final 1:1000) para bloqueio dos receptores Fc presentes em fagócitos. Após contagem, o mesmo número de células de cada grupo foi adicionado em tubos de polipropileno de 12 x 75 mm e incubadas por 30 minutos à 4 °C, protegidos da luz, com os seguintes anticorpos monoclonais para os marcadores de superfície de camundongos e em diluições apropriadas: anti-CD45 (clone: 30-F 11 ), anti-CD11b, anti-MHC classe II (I-A/I-E) (clone:M5/114.15.2), anti-F4/80 (clone: Cl:A3-1), anti-Siglec-F (clone: E5O-2440), anti-Gr-1 (clone: 1A8), anti-CD11c, anti-CD19 (clone: 1D3), anti-CD3 (clone: 145-2C11), anti-CD4 (clone: GK-1.5 ), anti-CD8 (clone: 53-6.7), anti-CD117 (clone: 2B8) e anti-FcεRI (clone: MAR-1), para caracterizar as principais populações celulares desse infiltrado (macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, células dendríticas, mastócitos, linfócitos B e linfócitos T). Após nova lavagem e centrifugação, as células foram ressuspensas em tampão de FACS e adquiridas no citômetro FACSCanto II, do Serviço de Citometria do Departamento de Imunologia do IBC/USP. A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão X.0.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

Para análise das células presentes na orelha, foi feita, primeiramente, a exclusão de células potencialmente mortas e debris celulares que normalmente

aparecem na região inferior esquerda da representação em “*dot plot*”, que mostra o tamanho relativo (FSC) e a complexidade interna ou granulosidade (SSC) dos eventos adquiridos (Figura 3A). Em seguida, as células foram analisadas em função da expressão da molécula CD45 (Figura 3B), uma proteína tirosina quinase expressa nas células hematopoiéticas (NAKANOS; HARADA; MORIKAWA, 1990). Após a exclusão de eventos duplos (“*doublets*” – Figura 3C), a expressão de CD11b foi utilizada para separar as populações linfoides e mastócitos (CD11b<sup>-</sup>) das populações mieloides (CD11b<sup>+</sup>) (Figura 2D).

Para as populações linfoides e mastócitos, os eventos foram analisados em função da expressão das moléculas CD19 e CD3 (Figura 2E): as que expressam apenas CD19 foram consideradas linfócitos B (CD3<sup>-</sup>/CD19<sup>+</sup>); as que expressam apenas CD3 foram consideradas linfócitos T (CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>-</sup>). Dentre estas últimas, as células foram analisadas em função da expressão de CD4 e CD8 na sua superfície (Figura 2G) para diferenciar as duas populações majoritárias de linfócitos T (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> e CD3<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>) (PETRIE et al., 1990) e aquelas que não apresentaram expressão de nenhum desses dois marcadores (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>), foram consideradas células T não convencionais. As células que não expressam na sua superfície CD19 ou CD3 foram selecionadas e analisadas em função da expressão de CD117 e FcεRI (Figura 2F). Trabalhos de outros grupos demonstraram que a população CD117 positiva/FcεRI positiva (CD117<sup>+</sup>/FcεRI<sup>+</sup>) são mastócitos (MASHIKO et al., 2015).

Para as populações mieloides, as células foram analisadas em função da expressão da molécula MHC-II (I-A/I-E) e F4-80 em sua superfície (Figura 2H). Células com expressão intermediária para MHC II e positivas para F4/80 foram consideradas macrófagos (MHC II<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>). Células com alta expressão de MHC II e de CD11c foram consideradas células dendríticas (MHC II<sup>hi</sup>/CD11c<sup>+</sup>) (Figura 2I) e os eventos que apresentavam fluorescência negativa para estes dois marcadores foram então selecionadas e analisadas em função da expressão de Siglec-F e Gr-1 na sua superfície (Figura 2J). Trabalhos prévios demonstraram que a população Siglec-F positiva/Gr-1 intermediária são eosinófilos (Siglec-F<sup>hi</sup>/Gr-1<sup>int</sup>) e a população Siglec-F intermediária/Gr-1 high são neutrófilos (Siglec-F<sup>int</sup>/Gr-1<sup>hi</sup>) (LEE et al., 2013).



**Figura 2 - Estratégia de “gating” para identificar células imunes presentes na orelha baseada nas moléculas de superfície.** As células das orelhas de camundongos BALB/c sensibilizados ou não com EGS e picados foram processadas conforme descrito em Material e Métodos. (A) Exclusão de debris celulares; (B) Exclusão de leucócitos CD45 positiva; (C) Seleção de singlets; (D) Exclusão de células CD11b positivas e negativas e dos eventos autofluorescentes em um canal do citometro que não possui fluorocromo para ser detectado; (E) Avaliação da expressão das moléculas CD3 e CD19 e exclusão do duplo negativo para estas moléculas; (F) Avaliação das moléculas CD117 e FcεRI; (G) Avaliação da expressão das moléculas CD4 e CD8; (H) Exclusão de células MHC II e F4/80 positivas e negativas; (I) Avaliação da expressão da molécula CD11c e; (J) Avaliação da expressão das moléculas Siglec-F e Gr-1.

### 1.3.6 Análise estatística

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  $p \leq 0,05$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico (GraphPad Prism).

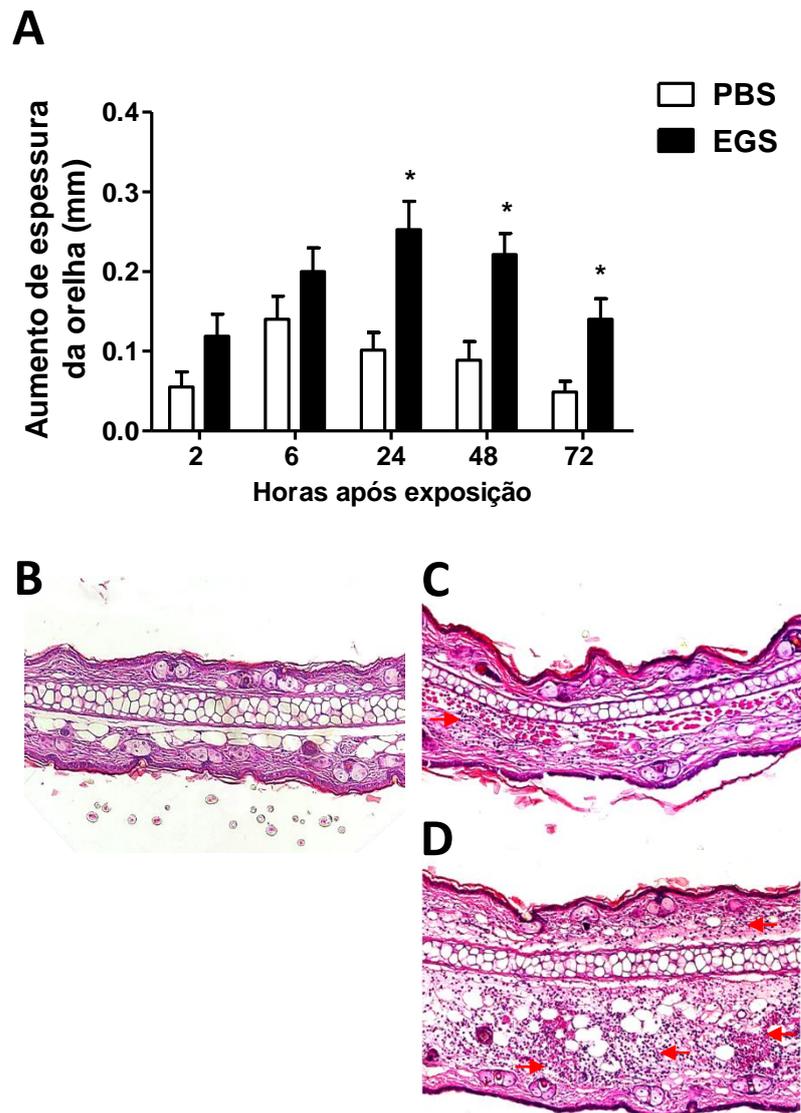
## 1.4 RESULTADOS

### 1.4.1 Cinética do edema e histopatologia do infiltrado celular na orelha em resposta a picada do mosquito *A. aegypti*

No presente estudo, inicialmente avaliamos a cinética temporal do edema no local da picada do mosquito *A. aegypti* para determinar o momento adequado da avaliação do infiltrado celular. Animais sensibilizados com EGS e expostos a picada do mosquito (**grupo “EGS”**) foram comparados com animais não sensibilizados e também expostos a picada do mosquito (**grupo “PBS”**). Orelhas de animais controles não picados foram utilizadas para a caracterização celular do tecido normal (**grupo “Naïve”**). A cinética do edema foi mensurada 2, 6, 24, 48 e 72 horas após a picada do mosquito.

Foi observado aumento da espessura das orelhas após a exposição aos mosquitos, tanto nos animais do grupo EGS quanto do grupo PBS. Entretanto, enquanto o pico do edema ocorreu após 6 horas no grupo PBS, o mesmo só ocorreu após 24 horas no grupo EGS (Figura 3A). A comparação entre os dois grupos mostra que a diferença dos tratamentos não produziu diferença significativa na espessura da orelha entre 2 e 6 horas após a picada. Porém, nos animais do grupo EGS, a picada induziu um aumento significativo na espessura da orelha após 24 horas comparado aos animais do grupo PBS ( $0,25 \pm 0,1$  mm *versus*  $0,10 \pm 0,06$  mm, respectivamente;  $p \leq 0,01$ ). Embora o edema tenha diminuído ao longo do tempo, a diferença entre os grupos se manteve significativa após 48 horas ( $0,22 \pm 0,08$  mm *versus*  $0,09 \pm 0,07$  mm;  $p \leq 0,01$ ) e 72 horas ( $0,14 \pm 0,07$  mm *versus*  $0,048 \pm 0,04$  mm;  $p \leq 0,01$ ).

Cortes histopatológicos foram preparados após 24 horas da exposição aos mosquitos e comparados com orelhas de camundongos *Naïve* (não sensibilizados/não expostos aos mosquitos). É possível observar um discreto infiltrado inflamatório na orelha dos animais que receberam PBS e foram expostos aos mosquitos (Figura 3C) em comparação ao grupo controle (Figura 3B). Por outro lado, nos animais sensibilizados com EGS e desafiados com picadas de mosquitos, a orelha apresenta um significativo infiltrado inflamatório e hiperplasia comparada com os demais grupos (Figura 3D). Essas imagens corroboram os dados de edema avaliados nos diferentes grupos experimentais.



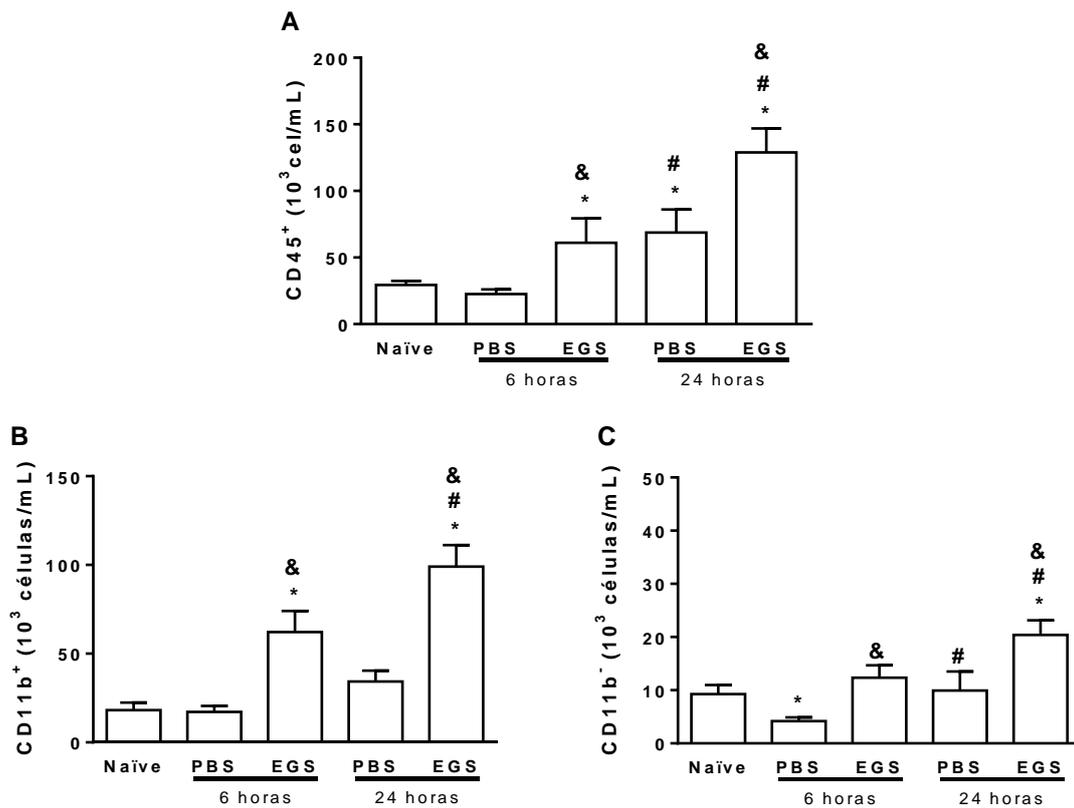
**Figura 3 - Cinética do edema da orelha e histopatologia após picada do mosquito *A. aegypti*.** Camundongos BALB/c receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5 $\mu$ g/animal/dia) durante 5 dias consecutivos para sensibilização. Trinta dias após a primeira inoculação os animais foram desafiados *in vivo* na orelha com 10 mosquitos fêmeas de *A. aegypti* (5 em cada orelha). Animais controles picados receberam i.p. PBS (0,5 mL). (A) A cinética do edema foi determinada por meio da diferença entre a medida da espessura da orelha antes da exposição e 2, 6, 24, 48 e 72 horas após o desafio. Após 24 horas da exposição aos mosquitos, a orelha foi coletada para análise histológica conforme descrito em Material e Métodos. As lâminas foram coradas com Hematoxilina/eosina. (B) Camundongos *Naïve*, (C) Camundongos inoculados com PBS por 5 dias e expostos naturalmente ao mosquito *A. aegypti* 30 dias após a primeira injeção e eutanasiados após 24 horas e, (D) Camundongos sensibilizados com EGS (5  $\mu$ g/animal/dia) por 5 dias consecutivos e desafiados pela exposição natural ao mosquito *A. aegypti* 30 dias após a primeira injeção e eutanasiados após 24 horas. Aumento de 100 x. Setas vermelhas indicam células infiltradas. Resultado representativo da cinética do edema expressos como média  $\pm$  SEM. \* $p \leq 0,01$  versus respectivo grupo PBS (n=8).

#### 1.4.2 Imunofenotipagem do infiltrado celular na orelha em resposta a picada do mosquito *A. aegypti* por citometria de fluxo

Uma vez determinado o pico do edema causado pela picada de *A. aegypti* tanto nos animais não sensibilizados quanto naqueles sensibilizados com EGS (6 e 24 horas após exposição, respectivamente), utilizamos esses tempos para fenotipagem do infiltrado celular no tecido por citometria de fluxo.

A Figura 4A apresenta o número absoluto de leucócitos totais nas orelhas, avaliados pela expressão de CD45 em sua superfície. Comparados aos animais controles (**grupo “Naïve”**), os animais não sensibilizados e expostos aos mosquitos (**grupo “PBS”**) não apresentaram diferença significativa no número de leucócitos em suas orelhas após 6 horas da exposição. Por outro lado, os animais sensibilizados com EGS e expostos aos mosquitos (**grupo “EGS”**) já apresentaram uma diferença significativa no número de células CD45<sup>+</sup> após 6 horas da exposição quando comparados com os grupos anteriores ( $p \leq 0,01$ ). Após 24 horas de exposição o grupo PBS apresentou um número significativamente mais alto de leucócitos em sua orelha quando comparado aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e ao mesmo grupo após 6 horas de exposição ( $p \leq 0,01$ ). O mesmo ocorreu, com o grupo EGS, que apresentou um número significativamente maior de leucócitos do que todos os demais grupos, corroborando com os dados observados no edema e na histopatologia da orelha.

A pele da orelha do camundongo é composta, dentre outras células, por células imunes de origem linfóide e mieloide. Os leucócitos presentes na pele e na microcirculação da orelha dos camundongos apresentam aproximadamente o dobro de população CD11b<sup>+</sup> em relação à população CD11b<sup>-</sup> e após a picada do mosquito, seja em 6 ou 24 horas, nos animais sensibilizados ou não com EGS, apresentam população CD11b<sup>+</sup> de 3 a 5 vezes maior que a população CD11b<sup>-</sup> (Figura 4B e 4C).



**Figura 2 -** Imunofenotipagem do infiltrado celular na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. As células das orelhas dos grupos acima descritos foram marcadas com anticorpos (A) anti-CD45 e (B e C) anti-CD11b e, em seguida, foram analisadas por citometria de fluxo. Células/mL refere-se ao pool de células da orelha ressuspensionado em 1 mL conforme descrito em Material e Métodos. Resultado representativo de 3 experimentos realizados nas mesmas condições experimentais, expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,01$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,01$  versus 6 horas do mesmo grupo e & $p \leq 0,01$  versus respectivo grupo PBS (n=3).

A Figura 5A apresenta uma representação em *dot plot* das populações CD11b<sup>-</sup> quanto a expressão dos marcadores CD3 e CD19. As células B (CD3<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>) são pouco abundantes no tecido, representando ao redor de 0,1% dos leucócitos totais e menos de 0,4% das células CD11b<sup>-</sup> nos animais *Naïve* (Figura 5A, primeiro painel). Não foram observadas diferenças significativas na porcentagem ou no número de células B da orelha dos animais do grupo PBS após 6 ou 24 horas da exposição, quando comparados aos animais *Naïve*. Por outro lado, o grupo EGS apresentou um aumento tanto no número quanto na porcentagem de células B após 6 horas de exposição quando comparado aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e ao grupo PBS após 6 horas ( $p \leq 0,01$ ). Após 24 horas, o número e porcentagem de células B do grupo EGS diminuiu para o mesmo nível do grupo *Naïve* e do respectivo grupo PBS (Figura 5B e 5C).

Nos animais *Naïve*, as células T da orelha (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>) representam aproximadamente 19% dos leucócitos totais e 62% das células CD11b<sup>-</sup> (Figura 5A, primeiro painel). Após 6 horas de exposição aos mosquitos, os animais do grupo PBS não apresentam diferença na porcentagem de células T em relação aos animais *Naïve*, embora o número absoluto dessas células seja significativamente menor ( $p \leq 0,01$ ). O inverso é observado no grupo EGS, onde sua porcentagem relativa é significativamente menor do que nos animais *Naïve* e o grupo PBS, mas o número absoluto dessas células não difere dos demais grupos. Após 24 horas de exposição, tanto o grupo PBS quanto o grupo EGS apresentam porcentagens relativas significativamente menores de células T em suas orelhas do que nos animais *Naïve*, entretanto, o número absoluto dessas células no grupo PBS não diferem do grupo *Naïve*. O grupo EGS, após 24 horas de exposição, também apresentou um número significativamente maior de células do que o grupo EGS após 6 horas de exposição e do que o grupo PBS após 24 horas de exposição (Figura 5D e 5E).

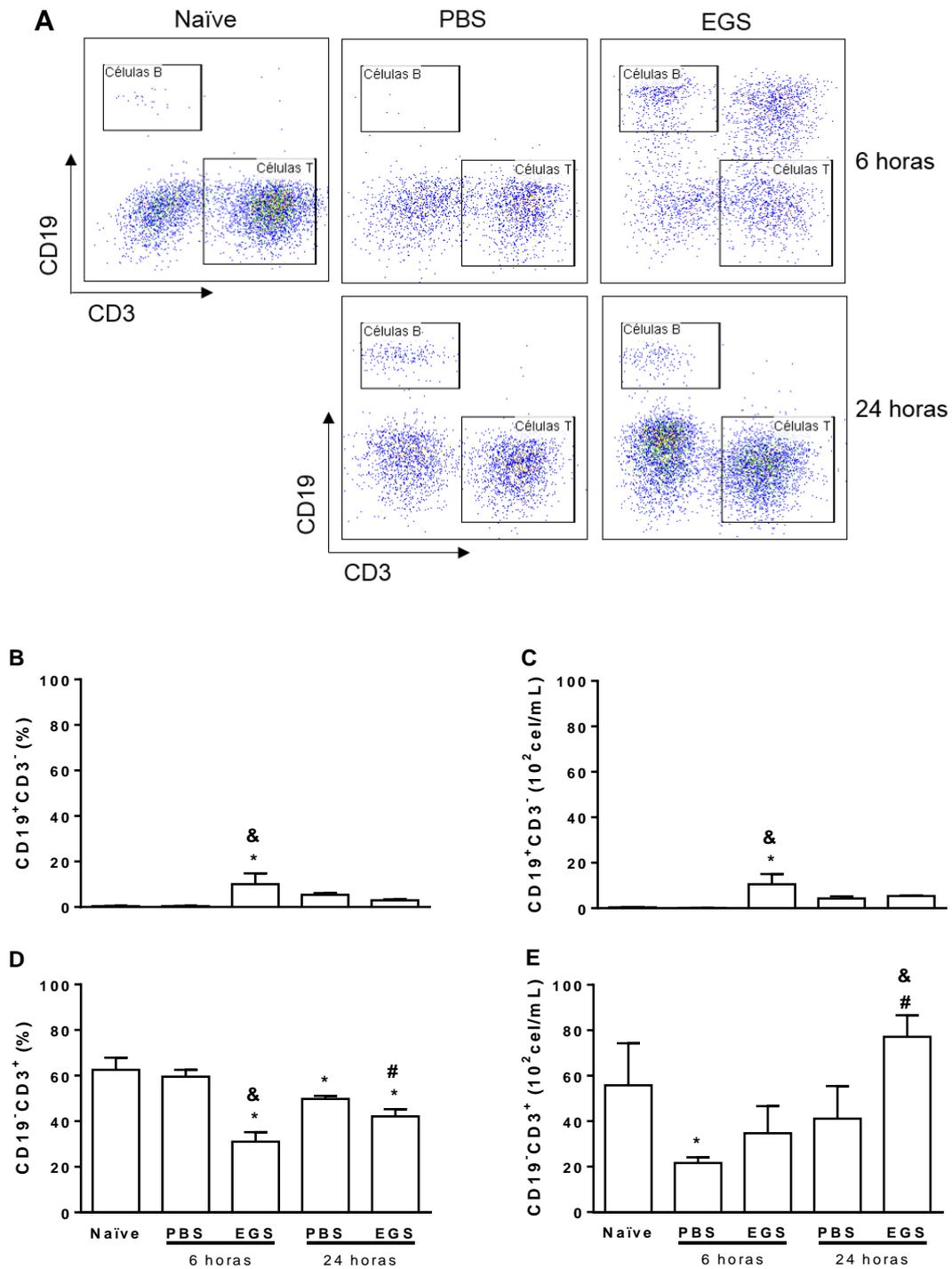
Vale ressaltar que dentro da população CD11b<sup>-</sup> nós encontramos um subtipo celular que apresentou dupla marcação (CD19<sup>+</sup>CD3<sup>+</sup>), presente somente na orelha de animais do grupo EGS após 6 horas da exposição ao mosquito *A. aegypti* (Figura 5A, terceiro painel). Algumas possibilidades para essa marcação inesperada serão comentadas na discussão.

Dentre as células T (CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>), nós fenotipamos ainda três populações: células T simples positivas para CD4 (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>), células T simples positivas para CD8 (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) e uma população negativa para ambos os marcadores (CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>),

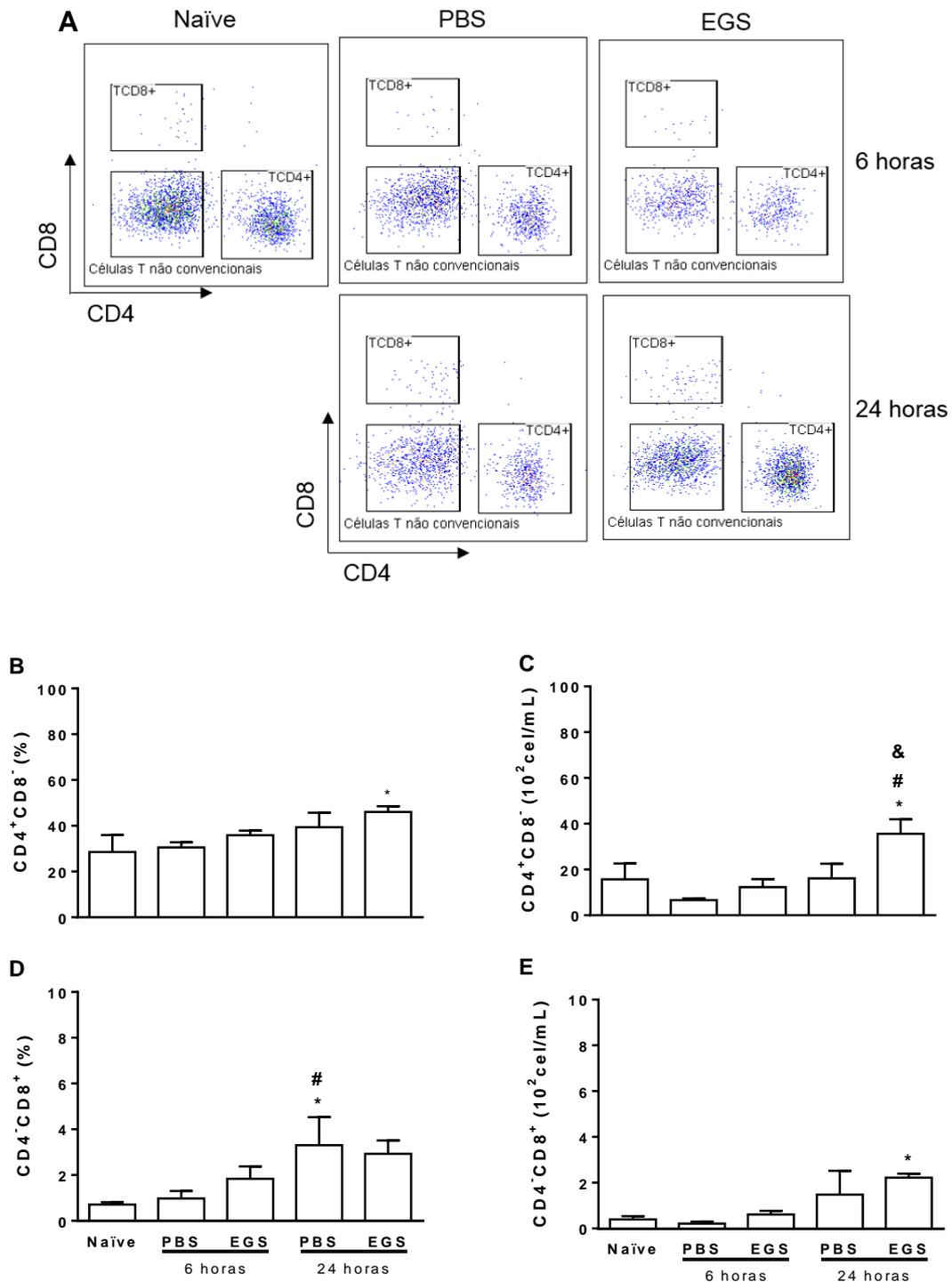
que provavelmente engloba células NKT e células T não convencionais. As células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> representaram aproximadamente 5% dos leucócitos totais e 28,5% das células T na orelha de camundongos *Naïve* (Figura 6A, painel 1). Dentre todos os grupos experimentais, o grupo EGS após 24 horas da exposição aos mosquitos, foi o único que apresentou um pequeno aumento na porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> em relação ao grupo *Naïve* (Figura 6B). Esse aumento se refletiu em maior número dessas células presentes na orelha, quando comparado aos demais grupos (Figura 6C).

As células T CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> representam menos de 1% dos leucócitos totais e 0,39% das células T da orelha dos animais *Naïve* (Figura 6A, painel 1). A Figura 6D mostra que em termos percentuais, o único aumento significativo dessas células ocorreu 24 horas após a picada do mosquito nos animais do grupo PBS, tanto em relação ao grupo *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) quanto em relação ao grupo PBS após 6 horas de exposição ( $p \leq 0,01$ ). Já a Figura 6E mostra que o número total de células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> foi semelhante entre todos os grupos, e apenas o grupo EGS após 24 horas de exposição ao mosquito apresentou diferença significativa em relação ao grupo *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ).

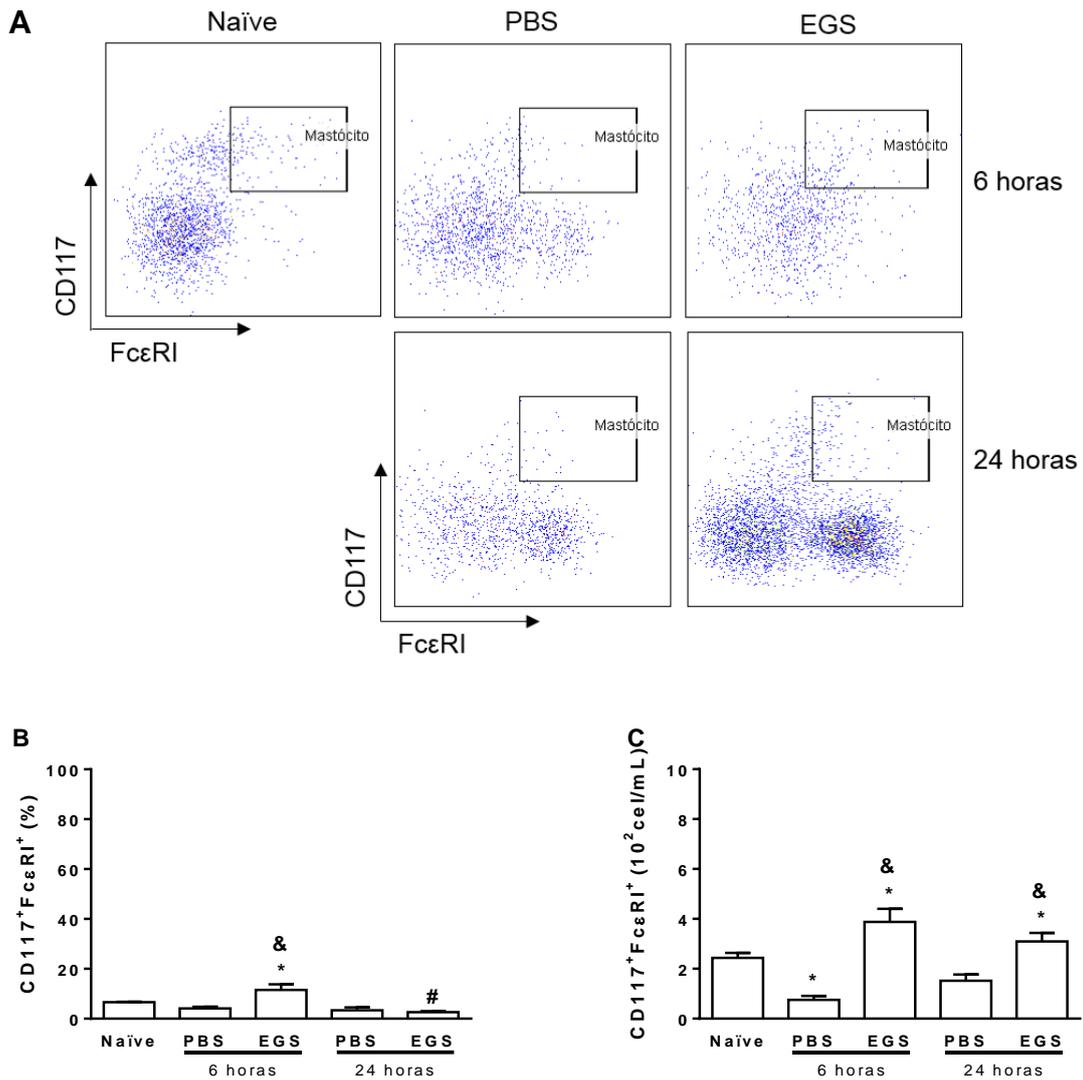
Em nossa análise, consideramos os mastócitos as células CD11b<sup>-</sup>/CD19<sup>-</sup>/CD3<sup>-</sup>, que apresentaram co-expressão de cKit (CD177) e FcεRI (Figura 7). A porcentagem de mastócitos é significativamente maior nos animais do grupo EGS após 6 horas da exposição, em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ). No entanto, a quantidade destas células presentes no local diminui significativamente 6 horas após a picada nos animais do grupo PBS e aumenta significativamente 6 e 24 horas após a picada nos animais do grupo EGS, em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ). O grupo EGS também apresenta número significativamente maior de mastócitos na orelha tanto após 6 horas quanto após 24 horas, quando comparado com o grupo PBS ( $p \leq 0,01$  – Figura 7B e 7C).



**Figura 3 -** Quantificação das populações de linfócitos T e linfócitos B na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Células B foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> e células T como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD19<sup>-</sup> (A). Porcentagem de células B e T (B e D), respectivamente. O número de células B e T (C e E) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem dos marcadores CD19<sup>+</sup>CD3<sup>-</sup> e CD19<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>, respectivamente. Resultado representativo expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).



**Figura 4 -** Quantificação das populações de linfócitos TCD4 e linfócitos TCD8 na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Células TCD4 foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e células TCD8 como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (A). Porcentagem de células TCD4 e TCD8 (B e D), respectivamente. O número de células TCD4 e TCD8 (C e E) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem dos marcadores CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup>, respectivamente. Resultado representativo expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).



**Figura 5 -** Quantificação das populações de mastócito na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Mastócitos foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>CD117<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup> (A). Porcentagem de mastócito (B). O número de mastócito (C) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem dos marcadores CD117<sup>+</sup>FcεRI<sup>+</sup>. Resultado representativo expressos como média ± SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).

A análise de alguns marcadores na população de células CD11b<sup>+</sup> dos leucócitos totais possibilitou encontrar quatro tipos celulares mieloides que diferem no fenótipo dos marcadores de superfície, a saber: macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos.

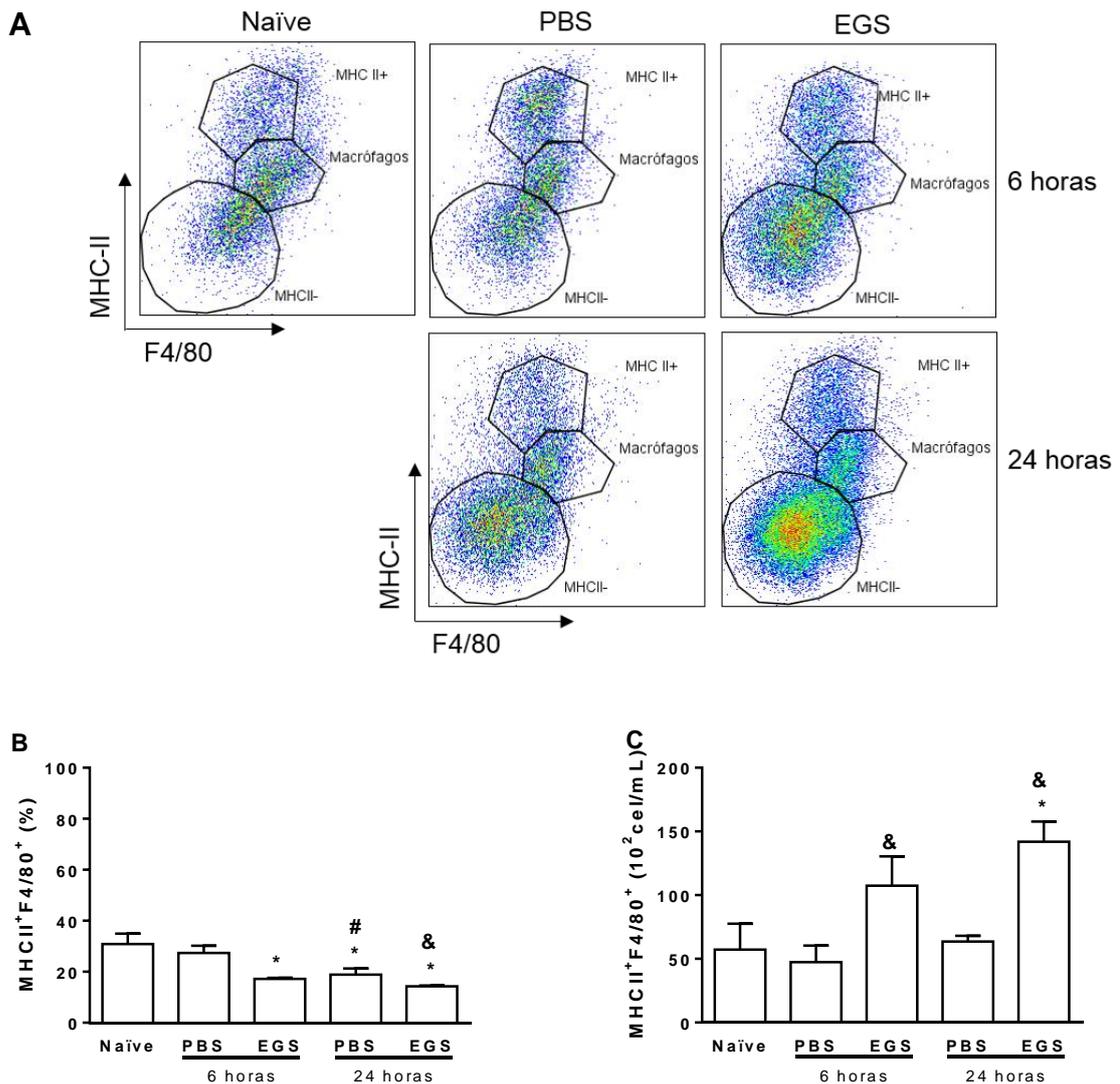
Os macrófagos foram os leucócitos mais abundantes encontrados na orelha dos animais *Naïve*, representando aproximadamente 19% dos leucócitos totais e 31% das células CD11b<sup>+</sup> (Figura 8A, painel 1). Os animais do grupo PBS apresentaram porcentagem semelhante de macrófagos após 6 horas da exposição aos mosquitos e uma pequena, mas significativa, redução dessa porcentagem após 24 horas da exposição, quando comparados ao grupo *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ). Porém o número absoluto dessas células foi semelhante em ambos os tempos quando comparados os dois grupos. Já o grupo EGS apresentou uma diminuição da porcentagem relativa de macrófagos após 6 e 24 horas da exposição em relação aos animais *Naïve*. Entretanto, em termos absolutos, o número dessas células estava aumentado após 24 horas da exposição aos mosquitos quando comparados os dois grupos. Além disso, ambos os grupos EGS apresentaram significativamente mais macrófagos do que os respectivos grupos PBS após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos (Figura 8B e 8C).

Foram considerados células dendríticas os eventos que apresentaram alta expressão de MHC de classe II e baixa expressão de F4/80 (Figura 8A). Para confirmar esse fenótipo, foi avaliada a expressão da molécula CD11c nessa população, mostrando que praticamente toda a população era positiva para esse marcador (Figura 9A). Dentre as células de origem mielóide, as células dendríticas estão entre as mais abundantes encontradas na orelha dos animais controles, representando, aproximadamente, 13% dos leucócitos totais e 12,5% das células CD11b<sup>+</sup> (Figura 10A, painel 1). Considerando as células CD11c<sup>+</sup> selecionadas dentro da população MHC-II<sup>hi</sup>, a porcentagem destas células foi semelhante entre os animais de todos os grupos, com exceção do grupo EGS 6 horas, que apresentou porcentagem menor de células CD11c<sup>+</sup> em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e em relação ao grupo PBS ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 9B). Entretanto, o número absoluto de células dendríticas não se altera entre os grupos, exceção feita ao grupo EGS após 24 horas da exposição aos mosquitos, que apresentou número significativamente maior de células CD11c<sup>+</sup> em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ), respectivo grupo PBS ( $p \leq$

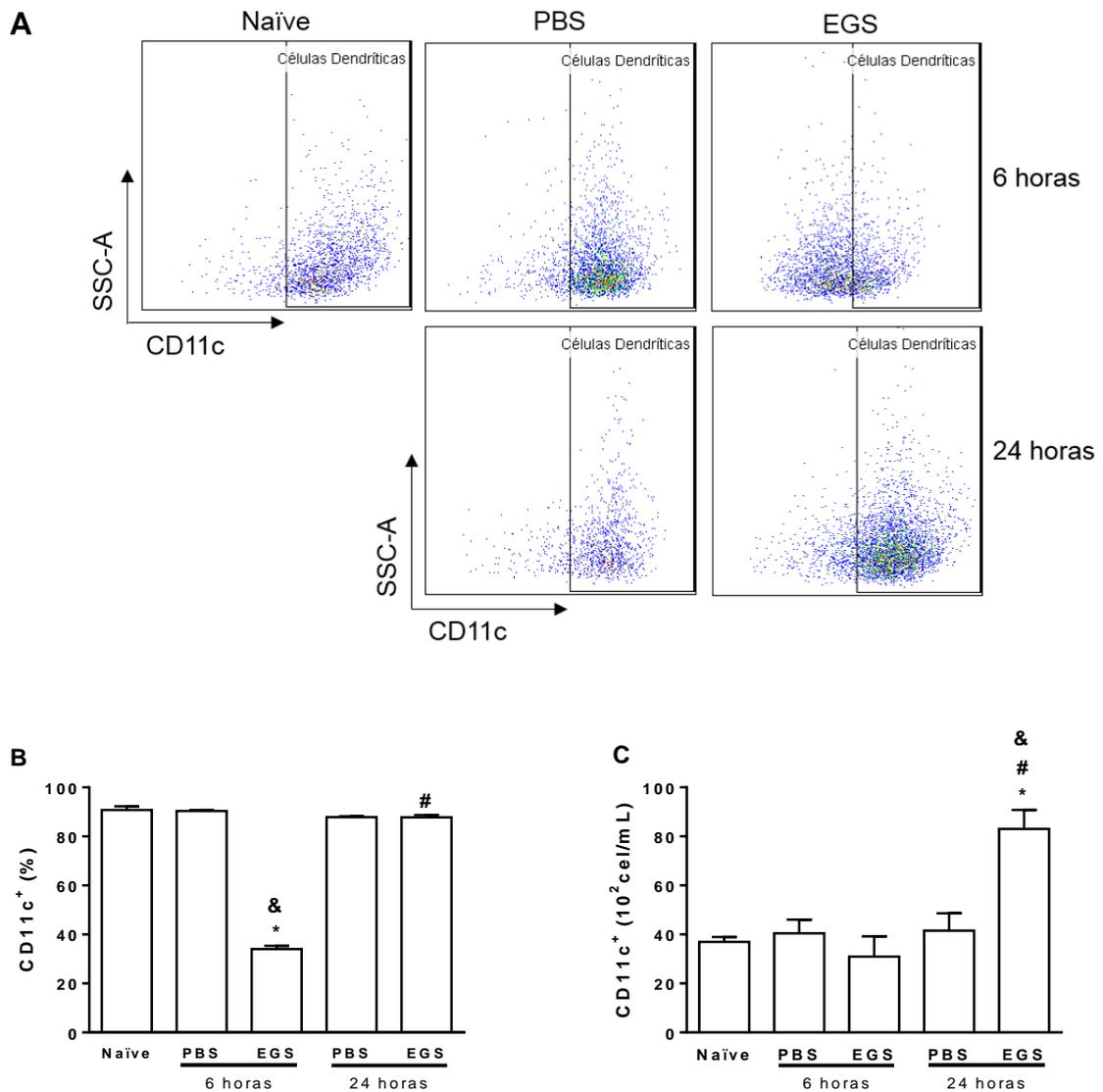
0,01) e ao grupo EGS após 6 horas da exposição aos mosquitos ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 9C).

As populações de eosinófilos e neutrófilos foram caracterizadas no conjunto de células CD11b<sup>+</sup>/MHC-II<sup>-</sup>, através da expressão de Siglec-F e Gr-1. Os neutrófilos são células Siglec-F<sup>int</sup>/Gr-1<sup>hi</sup> e os eosinófilos são células Siglec-F<sup>hi</sup>/Gr-1<sup>int</sup> (Figura 10A). Aproximadamente 4% dos leucócitos totais e 22% das células MHC-II<sup>-</sup> na orelha dos animais controles são neutrófilos (Figura 10A, painel 1). A porcentagem relativa de neutrófilos aumenta significativamente 6 e 24 horas após a picada do mosquito, tanto no grupo PBS quanto no grupo EGS, em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 10B). Apesar disso, a quantidade de neutrófilos presentes na orelha aumenta significativamente no grupo EGS 6 e 24 horas após a picada em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e aos respectivos grupos PBS ( $p \leq 0,01$ ). Além disso, nos animais do grupo EGS, a quantidade de neutrófilos presente no local após 24 horas da picada é significativamente maior que a quantidade dessas células presentes após 6 horas da picada ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 10C).

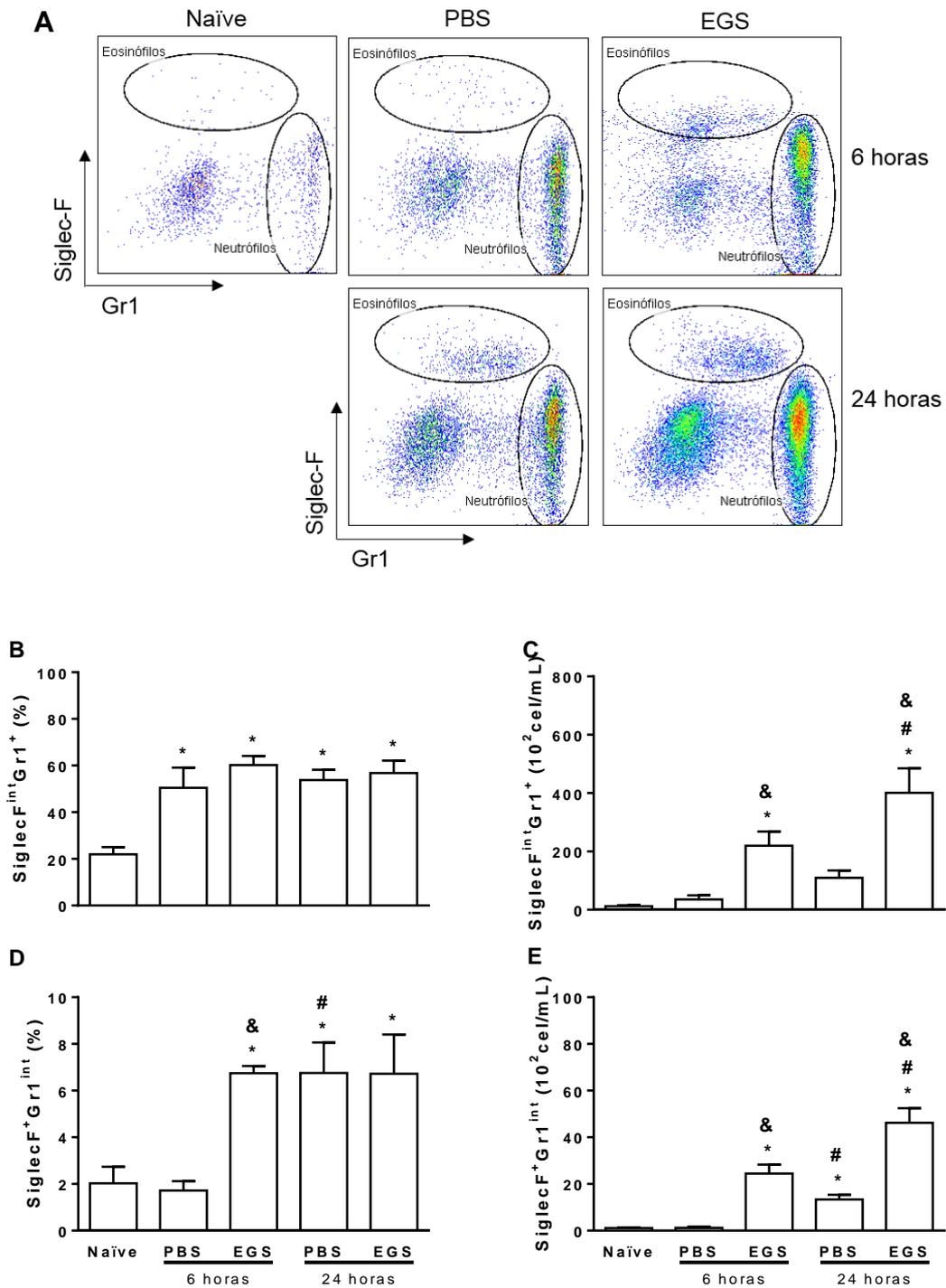
Dentre as populações celulares mieloides fenotipadas, os eosinófilos foram as células mais raras presentes nos animais controle, representando aproximadamente 0,5% dos leucócitos totais e 2% das células MHC-II<sup>-</sup> (Figura 10A, painel 1). Nos animais do grupo PBS não houve diferença na porcentagem dessas células após 6 horas da exposição, mas após 24 horas, essa porcentagem relativa foi significativamente mais alta do que nos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e do que no grupo PBS após 6 horas da exposição aos mosquitos ( $p \leq 0,01$ ). O percentual de eosinófilos presentes 6 horas após a picada nos animais do grupo EGS foi significativamente maior que nos animais *Naïve* ( $*p \leq 0,01$ ) e no respectivo grupo PBS ( $p \leq 0,01$ ). No grupo EGS após 24 horas da exposição aos mosquitos, a porcentagem relativa de células foi diferente apenas ao dos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 10D). Já a quantidade dessas células presentes no local da picada após 6 ou 24 horas aumentou significativamente no grupo EGS em relação aos animais *Naïve* ( $p \leq 0,01$ ) e em relação aos respectivos grupos PBS ( $p \leq 0,01$ ). Ainda, a migração dessas células para o local da picada nos animais do grupo EGS é maior 24 horas após a picada do que em 6 horas ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 10E).



**Figura 6 -** Quantificação das populações de macrófagos na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Macrófagos foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC-II<sup>int</sup>F4/80<sup>+</sup> (A). Porcentagem de macrófago (B). O número de macrófago (C) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem dos marcadores MHC-II<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>. Resultado representativo expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).



**Figura 7 -** Quantificação das populações de células dendríticas na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Células dendríticas foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC-II<sup>hi</sup>F4/80<sup>lo</sup>CD11c<sup>+</sup> (A). Porcentagem de células dendríticas (B). O número de células dendríticas (C) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem do marcador CD11c<sup>+</sup>. Resultado representativo expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).



**Figura 8 -** Quantificação das populações de neutrófilos e eosinófilos na orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. Neutrófilos foram identificadas como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>Siglec-F<sup>int</sup>Gr-1<sup>hi</sup> e eosinófilos como CD45<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>Siglec-F<sup>hi</sup>Gr-1<sup>int</sup> (A). Porcentagem de neutrófilos e eosinófilos (B e D), respectivamente. O número de neutrófilo e eosinófilo (C e E) foi obtido através da multiplicação do número total das células na orelha pela porcentagem dos marcadores Siglec-F<sup>int</sup>/Gr-1<sup>hi</sup> e Siglec-F<sup>hi</sup>/Gr-1<sup>int</sup>, respectivamente. Resultado representativo expressos como média  $\pm$  SD. \* $p \leq 0,05$  versus grupo *Naïve*, # $p \leq 0,05$  versus 6 horas do respectivo grupo e & $p \leq 0,05$  versus respectivo grupo PBS (n=3).

### 1.4.3 Alterações quantitativa e qualitativa das populações celulares presentes na orelha dos camundongos em resposta a picada do mosquito *A. aegypti*

A Figura 11 aponta as proporções das diferentes populações celulares presentes na orelha de camundongos *Naïve* de animais previamente sensibilizados ou não com EGS após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos *A. aegypti*.

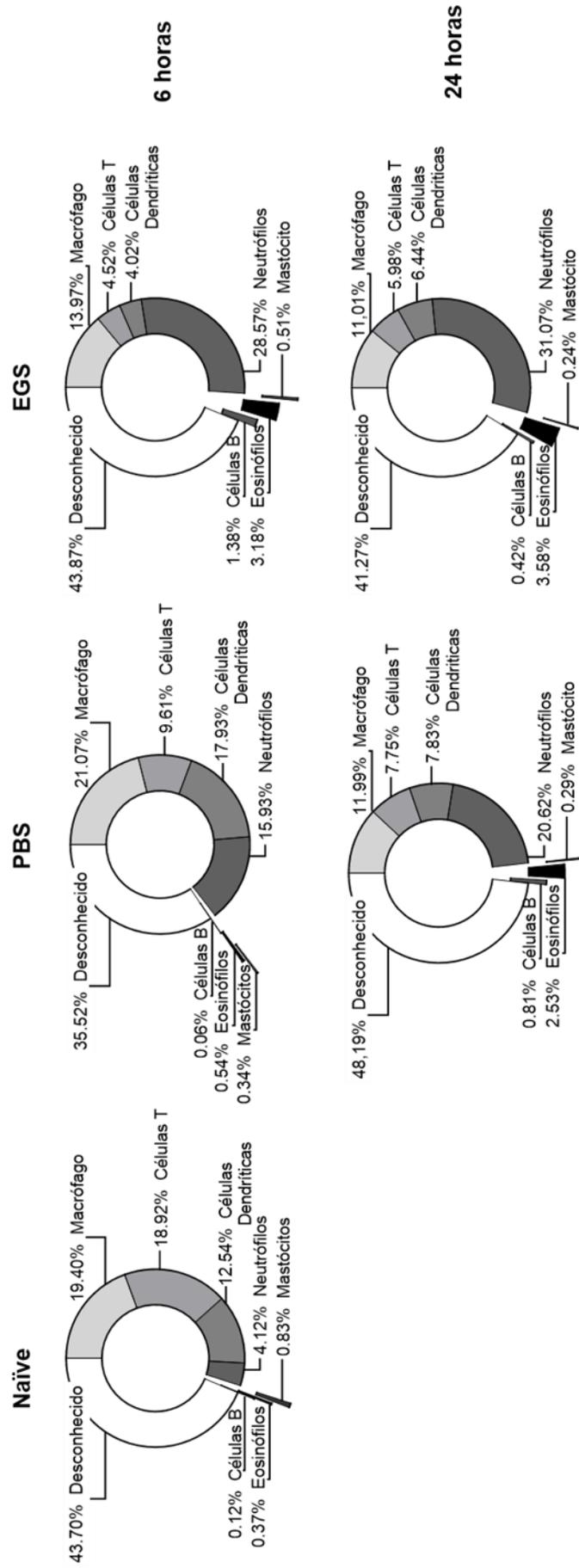
Nosso painel de marcadores permitiu a determinação de 7 populações celulares, todas positivas para o marcador CD45 (células T, células B, mastócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, e eosinófilos) e 2 subtipos de células T (células T CD4<sup>+</sup> e células T CD8<sup>+</sup>). Nos animais *Naïve*, os macrófagos (CD11b<sup>+</sup>/MHC-II<sup>int</sup>/F4/80<sup>+</sup>) e as células T (CD11b<sup>-</sup>/CD3<sup>+</sup>) foram os tipos celulares mais abundantes, cada um representando aproximadamente 19% dos leucócitos totais identificados na orelha. A imunofenotipagem das células T revelou as populações clássicas de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>) e linfócitos T CD8<sup>+</sup> (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>) e também uma população de linfócitos T não convencionais (CD3<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>), representando aproximadamente 5,3%, 0,13% e 13%, respectivamente, do total de células CD45<sup>+</sup> (dados não mostrados). As células dendríticas presentes na orelha desses animais representaram a terceira população mais abundante, com aproximadamente 12,5% da população total de leucócitos. Os mastócitos, eosinófilos e as células B juntos representaram aproximadamente 0,83%, 0,37% e 0,12% dos leucócitos, respectivamente. Mesmo utilizando 13 marcadores para diferentes moléculas de superfície e os parâmetros de tamanho e complexidade, aproximadamente 44% dos leucócitos não foram classificados dentro de alguma população celular identificada (Figura 11, painel 1).

Uma análise comparativa global das populações celulares dos animais expostos ao mosquito, tanto do grupo PBS quando do grupo EGS, mostra que apesar de células T, macrófagos e células dendríticas continuarem sendo populações majoritárias na orelha, suas proporções relativas foram menores do que nos animais *Naïve*, exceção feita aos macrófagos e células dendríticas do grupo PBS após 6 horas de exposição. Em todos esses grupos, seja 6 ou 24 horas após a exposição, destaca-se o aumento de neutrófilos, que se tornou o tipo celular majoritário, com exceção novamente ao grupo PBS após 6 horas da exposição, onde macrófagos e células dendríticas ainda apresentaram-se proporcionalmente mais abundantes (Figura 11). Dentre as populações minoritárias (mastócitos, eosinófilos e células B), valem aqui

alguns destaques. Enquanto a porcentagem de mastócitos foi muito parecida entre todos os grupos, no caso de eosinófilos e linfócitos B, houve uma grande variação da proporção relativa dessas células. Para eosinófilos, observamos o crescimento da proporção relativa dessas células em relação aos animais *Naïve*, que foi quase 7 vezes maior nos animais grupo PBS após 24 horas da picada, mais de 8 vezes maior nos animais do grupo EGS após 6 horas da picada e quase 10 vezes maior nos animais do grupo EGS após 24 horas da picada (Figura 11). Situação parecida ocorreu com os linfócitos B, cuja proporção relativa em relação aos animais *Naïve* também foi quase 7 vezes maior nos animais grupo PBS após 24 horas da picada, 11,5 vezes maior nos animais do grupo EGS após 6 horas da picada e 3,5 vezes maior nos animais do grupo EGS após 24 horas da picada (Figura 11).

Para mostrar o que essas diferenças nas proporções de cada população celular representam em termos absolutos para cada grupo, preparamos a Tabela 2 mostrando uma relação entre o número total dessas células, normalizando o valor dos animais *Naïve* para 1. Nessas condições, o grupo PBS após 6 horas da exposição aos mosquitos apresentou quantidades semelhantes ou menores de cada população celular em comparação grupo *Naïve*, com exceção dos neutrófilos, cuja quantidade foi 3 vezes maior. Por outro lado, o grupo EGS após 6 horas da exposição apresentou grande aumento no número de linfócitos B (30 vezes), neutrófilo (18,1 vezes) e eosinófilos (22,3 vezes).

Para os grupos expostos aos mosquitos, as diferenças foram ainda maiores após 24 horas, quando comparados aos animais *Naïves* e aos respectivos grupos após 6 horas de exposição. No grupo PBS, houve aumento do número de células B (12 vezes), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (3,7 vezes), neutrófilos (9 vezes) e eosinófilos (12,1 vezes) em relação ao grupo controle. Já o grupo EGS apresentou aumento de células B (15,2 vezes), células T CD4<sup>+</sup> (2,3 vezes), linfócitos T CD8<sup>+</sup> (5,6 vezes), macrófagos (2,5 vezes), células dendríticas (2,2 vezes), neutrófilos (33 vezes) e eosinófilos (42,3 vezes), também em relação ao grupo controle (Tabela 2).



**Figura 9 - Porcentagem relativa dos leucócitos presentes na orelha animais Naive e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo "PBS") ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo "EGS"), baseada nas moléculas de superfície.** Camundongos BALB/c receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5 µg/animal) durante 5 dias consecutivos para sensibilização. Trinta dias após a primeira inoculação os animais foram desafiados *in vivo* na orelha com 10 mosquitos fêmeas de *A. aegypti* (5 em cada orelha). Animais controles picados receberam i.p. PBS (0,5 mL). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. A porcentagem (%) utilizada para análise representa cada tipo celular em relação ao número total de leucócitos de cada grupo.

**Tabela 2 - Quantificação relativa das populações de leucócitos da orelha de animais *Naïve* e animais expostos a picada de *A. aegypti* após receberem PBS (grupo “PBS”) ou serem sensibilizados com o EGS do mosquito (grupo “EGS”).**

População	Naïve	6 horas		24 horas	
		PBS	EGS	PBS	EGS
<b>Células B</b>	1	0,4	30,0	12,1	15,2
<b>Células T</b>	1	0,4	0,6	0,7	1,4
<b>T CD4<sup>+</sup></b>	1	0,4	0,8	1,0	2,3
<b>T CD8<sup>+</sup></b>	1	0,5	1,6	3,7	5,6
<b>Mastócitos</b>	1	0,3	1,1	0,6	1,3
<b>Macrófagos</b>	1	0,8	1,9	1,1	2,5
<b>Células Dendríticas</b>	1	1,1	0,8	1,1	2,2
<b>Neutrófilos</b>	1	3,0	18,1	9,0	33,0
<b>Eosinófilos</b>	1	1,1	22,3	12,1	42,3

Camundongos BALB/c receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5µg/animal) durante 5 dias consecutivos para sensibilização. Trinta dias após a primeira inoculação os animais foram desafiados *in vivo* na orelha com 10 mosquitos fêmeas de *A. aegypti* (5 em cada orelha). Animais controles picados receberam i.p. PBS (0,5 mL). Após 6 e 24 horas da exposição aos mosquitos, as orelhas foram coletadas para fenotipagem por citometria conforme descrito em Material e Métodos. O valor dos animais *Naïve* foi normalizado para 1. A relação do número total das células de cada grupo para cada tipo celular foi dividida pela quantidade presente no *Naïve*.

## 1.5 DISCUSSÃO

O modelo de inflamação na pele utilizando a orelha é uma metodologia que requer pequenas quantidades de inóculo/estímulo e representa um modelo próximo do hospedeiro homem, sendo por isso empregada por diversos grupos de pesquisa (ASHRAF; SHAHZAD; SHABBIR, 2015; COCHEZ et al., 2016; MOON et al., 2016; POHIN et al., 2016). No presente trabalho, a orelha de animais sensibilizados ou não com EGS foi exposta à picada do mosquito *A. aegypti*, seguida pela avaliação da cinética do edema local. Em ambos os grupos, animais não sensibilizados (grupo PBS) ou sensibilizados (grupo EGS) já apresentam um pequeno edema de intensidade semelhante após 2 horas da exposição aos mosquitos, assumindo a partir disso uma cinética particular para cada grupo. Nos animais do grupo PBS, o pico do edema ocorreu após 6 horas da exposição, regredindo nos tempos subsequentes. Por outro lado, os animais do grupo EGS apresentam um aumento da espessura da orelha que atinge o pico após 24 horas da exposição aos mosquitos, que vai regredindo lentamente, mas ainda mantendo-se alto mesmo após 48 e 72 horas. Nesses 3 períodos (24, 48 e 72 horas após a exposição aos mosquitos), o edema do grupo EGS foi significativamente maior do que no grupo PBS (Figura 2A). Como discutiremos abaixo o infiltrado é composto por células da imunidade inata e adaptativa, no entanto, a persistência do edema no grupo EGS provavelmente é devido a presença da resposta imune adaptativa de maneira mais intensa.

Os dados descritos acima são visualizados nos cortes histológicos de orelhas que mostram migração celular 24 horas após a picada do mosquito *A. aegypti* em ambos os grupos (PBS e EGS), mas de aspecto mais intenso no grupo EGS, contrastando com a orelha de animais *Naïve* que apresentam proporcionalmente menor número de células do sistema imune (Figura 2B). Com base nesses dados escolhemos os períodos de 6 e 24 horas após a picada para estudar o infiltrado inflamatório presente no local da picada, utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Nosso primeiro passo foi avaliar quantitativamente a presença dos leucócitos nas orelhas, sendo que observamos respostas distintas em termos de migração celular após 6 e 24 horas da picada quando comparamos os animais sensibilizados e não sensibilizados com EGS. Ao avaliar o período de 6 horas após exposição aos mosquitos, percebemos que somente o grupo EGS apresentou aumento significativo dos leucócitos totais em comparação com animais *Naïve* (células CD45<sup>+</sup> - Figura 4A).

Já no período de 24 horas após a exposição, ambos os grupos (PBS e EGS) apresentaram aumento significativo de leucócitos totais em relação aos animais *Naïve*, sendo que o grupo EGS apresentou ainda um aumento significativamente maior do que o grupo PBS. Analisados em conjunto esses dados e a avaliação do edema local, concluímos que o aumento da espessura da orelha do grupo PBS após 6 horas da exposição (pico do edema nesse grupo) provavelmente possui um forte componente de extravasamento plasmático e não de migração celular, uma vez que não foi observada diferença significativa do número de leucócitos nesse período. Após injúria o efeito imediato dos mediadores inflamatórios produzidos é iniciar um exsudato no tecido extravascular local por proteínas do plasma e, em seguida, por leucócitos que normalmente estão restritos aos vasos sanguíneos (MEDZHITOV, 2008). Os dados de migração celular 24 horas após a exposição estão em concordância com os dados do edema, uma vez que ambos grupos apresentaram aumento de ambos os parâmetros, especialmente o grupo EGS.

A seguir, avaliamos por citometria de fluxo quais populações de leucócitos estavam presentes nas orelhas dos animais sensibilizados ou não com EGS e comparamos com os leucócitos encontrados na orelha de animais não picados. Assim, investigamos o fenótipo da reação inflamatória induzida pela picada de mosquitos e a diferença quantitativa e qualitativa dessa resposta em animais que nunca entraram em contato com mosquitos e daqueles que já estavam sensibilizados pelos componentes salivares, como uma maneira de mimetizar a resposta encontrada na população humana. A pele possui tipos celulares considerados residentes do tecido e que contribuem para a função da imunidade inata e adaptativa, dentre elas destacam-se: células T  $\alpha\beta$  de memória, células de Langerhans (células dendríticas epiteliais), células T  $\gamma\delta$  e macrófagos (DAVIES et al., 2013; HEATH; CARBONE, 2013). Tong et al. (2015) determinaram a densidade de células de Langerhans, células dendríticas da derme, mastócitos, célula T epiteliais e macrófagos presentes na orelha de camundongos C57BL/6. Estes autores encontraram a proporção de leucócitos presente na derme, sendo as células dendríticas da derme e os macrófagos as células predominantes. Os achados de nosso estudo corroboram com essas observações iniciais, sendo que macrófagos, células CD3<sup>+</sup> (linfócitos T) e as células dendríticas foram as principais células encontrada no tecido da orelha normal.

Os neutrófilos foram as principais células presentes 6 horas após a picada do mosquito nos animais não sensibilizados. Já é bem sabido que os neutrófilos são os

primeiros leucócitos recrutados para o local inflamado (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Portanto, embora a quantidade de leucócitos não tenha aumentando, verificamos o perfil alterado de células presentes na orelha caracterizado pela migração de neutrófilos para o local da picada e diminuição de outros tipos celulares. Esses dados reforçam que o edema encontrado nos animais desse grupo não foi decorrente do aumento do número de neutrófilos e sim por extravasamento plasmático. De fato, picadas de mosquito normalmente causam reações inflamatórias cutâneas com pápulas, edema e vermelhidão (DEMEURE et al., 2005).

Na literatura científica, encontramos análises histológicas da pele da orelha de camundongos BALB/c após 36 horas da picada de mosquitos *A. aegypti* infectados com o vírus *West Nile*, que revelou um pequeno infiltrado inflamatório local nesses animais. No entanto, animais sensibilizados pela picada do mosquito não infectado, uma vez por semana por quatro semanas, apresentou um infiltrado 200% maior após exposição aos mosquitos infectados. Este edema no local da alimentação nos animais sensibilizados foi caracterizado pelo infiltrado células mononucleares e neutrófilos (SCHNEIDER et al., 2007). Trabalho recentemente publicado por Schmid et al. (2016) utilizando camundongos C57BL/6 deficientes do receptor IFN- $\alpha/\beta$  mostra que o EGS do mosquito *A. aegypti* aumenta o recrutamento de monócito e neutrófilo para a derme da orelha 14 horas após receberem injeção intra-dérmica do vírus DENV concomitante com o EGS. Teixeira et al. (2005) utilizando modelo de “*air pouch*” para estudar o recrutamento de leucócito *in vivo* em resposta ao homogenato da glândula salivar do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* observaram um aumento no recrutamento de macrófago e eosinófilo em animais BALB/c 12 horas após infecção. A orelha dos camundongos possui uma variedade de população de células imunes de origem linfóide e mieloide e a sua proporção, bem como a quantidade de célula presente, podem se alterar devido ao recrutamento celular em resposta a picada do mosquito *A. aegypti*. Além disso, no presente trabalho o infiltrado celular no local da picada difere de animal sensibilizado com os componentes salivares para um não sensibilizado.

Nos animais não sensibilizados, 24 horas após a exposição, a migração de neutrófilos foi intensificada. Porém, nesse caso observamos também a presença de eosinófilos, células B e células T CD8<sup>+</sup>. Ainda no contexto da picada nos animais não sensibilizados, tanto 6 como 24 horas após a picada, os dados mostraram diminuição no número de mastócitos. Por outro lado, estas células apresentaram um pequeno

aumento nos animais sensibilizados. No entanto, em todos os casos estas células representam menos de 1% dos leucócitos. Demeure et al. (2005) mostraram que a picada do mosquito *Anopheles stephensi* ativa os mastócitos da pele. Os autores injetaram corante Azul de Evans intravenoso (i.v.) em camundongos normal (WBB6F1-<sup>+/+</sup>) e deficientes de mastócitos (WBB6F1-Kit<sup>W</sup>/Kit<sup>W-v</sup>) e expuseram os camundongos aos mosquitos por 1 hora, avaliando a seguir a coloração na lesão causada pelo mosquito. Eles concluíram que a reação observada foi dependente de mastócitos devido a presença de coloração apenas nos animais normais e não nos animais deficientes. Além disso, esta coloração foi restabelecida nos animais deficientes quando os mastócitos foram reconstituídos com injeção intra-dérmica de mastócitos do tecido conjuntivo ou intravenosa de mastócito derivado da medula óssea. Embora nossos resultados mostrem que os mastócitos estão entre os leucócitos menos abundantes, estas células participam dos eventos iniciais da resposta após a picada. Quando os mastócitos são ativados liberam aminas vasoativas pré-formadas e posteriormente, mediadores lipídicos recém-formados como os leucotrienos, citocinas como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-13 (HOGAN; SCHWARTZ, 1997). Em condições inflamatórias a IL-5, as eotaxinas e os leucotrienos participam da migração dos eosinófilos (CARLOS et al., 2011; JOSE et al., 1994; ROTHENBERG; LUSTER; LEDER, 1995). Assim, o maior número dos mastócitos nos animais sensibilizados provavelmente contribuiu para intensificar a resposta. Vale ressaltar que durante a análise dos mastócitos, tivemos dificuldades em observar células duplo-positivas CD117<sup>+</sup>/Fc $\epsilon$ RI<sup>+</sup>. Optamos por não considerar como mastócitos as células para apenas um dos marcadores, embora essas populações simples positivas tenham aparecido consistentemente na análise de alguns grupos, o que não faz sentido do ponto de vista teórico. Apesar dessa questão ter ficado em aberto no presente material, pretendemos explorar futuramente mais a fundo o fenótipo de mastócitos do tecido com outros marcadores de superfície para entender nossos resultados.

Dentre os leucócitos que migraram no local da picada, o eosinófilo foi o tipo celular que mais aumentou no grupo de animais sensibilizados 24 horas após a picada e o segundo tipo 6 horas após a picada. Embora o neutrófilo e as células B provavelmente desempenhem papel importante na resposta a picada nestes animais, a presença de eosinófilos sugere o desenvolvimento de uma fase tardia da reação de hipersensibilidade do tipo I, uma vez que trata-se de resposta inflamatória antígeno-

específica. Estudo realizado por Chen, Simons e Peng (1998) demonstrou que após exposição natural de camundongos BALB/c ao mosquito *A. aegypti*, os camundongos desenvolveram reação imediata e tardia na pele associadas ao aumento de IgE e IgG1 e proliferação de linfócitos T, sugerindo uma resposta predominantemente Th2. Barros et al. (2016) caracterizaram um modelo murino de alergia com exposição natural ao mosquito *A. aegypti* e mostraram que após desafio com EGS aumenta o número de eosinófilos e citocinas Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) no lavado da cavidade broncoalveolar.

Um outro resultado intrigante foi a presença de células duplo positivas para CD3 e CD19 na orelha de animais sensibilizados, 6 horas após a picada do mosquito. Este fenótipo pode ser um artefato da citometria ou pode refletir na migração de células B imaturas para o local da picada. Milosevits et al. (1995) encontraram células CD19<sup>+</sup>/CD3<sup>+</sup> ao estudar os leucócitos presente no sangue do cordão umbilical, inferindo, assim, a presença de células B imaturas. No entanto, Nagel et al. (2014) estudando amostras de sangue humano sugerem que a presença de CD3 nas células B é resultado da troca dessa molécula no contato antígeno-dependente com a célula T e não devido a produção endógena dessas moléculas pelas células B. Considerando que de fato estar havendo interação entre estas células no contexto do tecido onde a picada do mosquito ocorreu, avaliaremos esse fenômeno com mais atenção futuramente para definir se foi um artefato ou se de fato essa população duplo-positiva é real durante a cinética de migração celular na pele após a picada do mosquito *A. aegypti*.

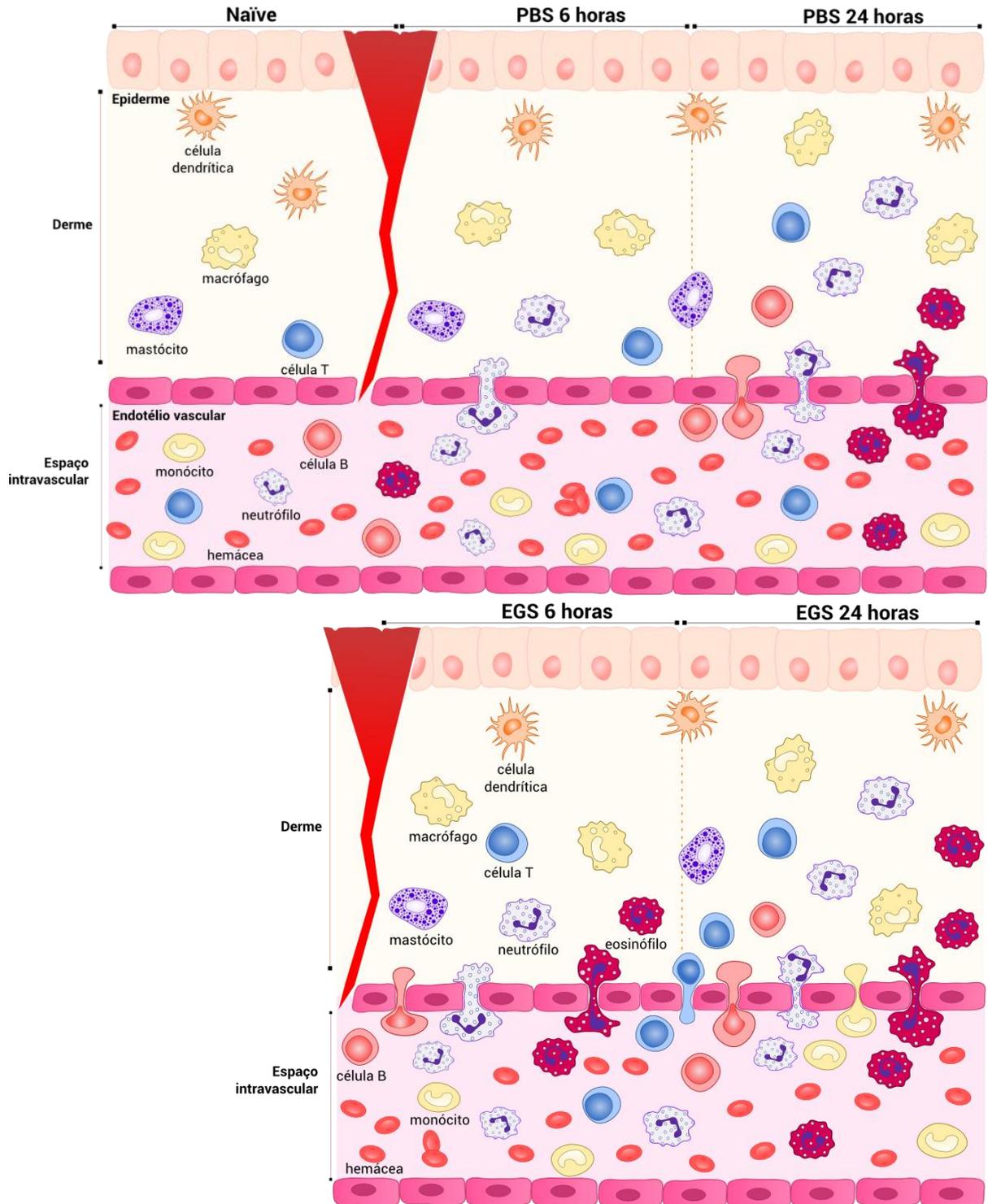
A caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório da pele usando citometria de fluxo nos permite entender a dinâmica das mudanças celulares durante a inflamação induzida pela picada de mosquitos, além de abrir caminhos para desvendar os acontecimentos que facilitam a infecção viral durante o repasto sanguíneo. O mosquito *A. aegypti* é conhecido por ser vetor primário de doenças emergentes e re-emergentes como a febre amarela, febre Chikungunya, dengue e Zika (BLACK et al., 2002; BURT et al., 2012; CHRISTOPHERS, 1960; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; NENE et al., 2007; ZANLUCA et al., 2015). Pinggen et al. (2016) mostraram que a picada ou a saliva do mosquito é importante para a infecção viral. Estes autores encontraram um influxo inflamatório de neutrófilos 6 horas após a picada do mosquito e da infecção. Eles sugerem que estas células coordenam a resposta imune localizada programando a imunidade inata de modo a facilitar a entrada e infecção de vírus em células mieloides susceptíveis. Na verdade vários

autores já descreveram aumento da infecção viral na presença dos componentes salivares (AGARWAL et al., 2016; STYER et al., 2011). Nossos resultados mostram o influxo de neutrófilos 6 e 24 horas após a picada tanto nos animais sensibilizados como nos animais não sensibilizados com EGS, no entanto, nos animais sensibilizados essas células estão presentes no contexto de uma resposta alérgica, dessa forma, seria interessante investigar se neste contexto a infecção viral é potencializada ou atenuada. Estudo realizado em Garbão na África Central, onde ocorreu um surto de Chikungunya em 2007, mostrou que seguida da resposta inata, inicia a ativação da imunidade adaptativa pela ativação e proliferação das células T CD8<sup>+</sup> nos estágios iniciais da doença (WAUQUIER et al., 2011). Drake et al. (2016) estudaram o papel dos eosinófilos na atividade antiviral contra o vírus Parainfluenza, sendo capaz de inibir o vírus via produção de óxido nítrico. Considerando os trabalhos dos grupos acima citados, possivelmente os animais sensibilizados com EGS no presente trabalho fossem capazes de atenuar a infecção viral devido à presença destes tipos celulares no local da picada.

Existem poucos dados na literatura que caracterizaram populações celulares da pele de indivíduos ou animais experimentais expostos aos mosquitos, assim há necessidade de estudos descritivos como o nosso para elucidar a dinâmica das células recrutadas após a picada de mosquitos em indivíduos com pouca ou nenhuma exposição prévia aos mosquitos e aqueles já sensibilizados por anos de exposições. Esse conhecimento poderá ser útil no entendimento da interação do mosquito com o hospedeiro vertebrado e também fornecerá subsídios para compreender o contexto do microambiente encontrado pelos vírus potencialmente transmitidos pelo mosquito durante o repasto sanguíneo.

## 1.6 CONCLUSÕES

As três populações de leucócitos mais abundantes identificadas na orelha de animais *Naïve* foram macrófagos, células T e células dendríticas. No entanto, após a picada do mosquito *A. aegypti* ocorreu migração celular e alterou o perfil de leucócitos presente na orelha após 6 e 24 horas da picada, sendo mais intensa em animais sensibilizados, principalmente 24 horas após a picada. Os tipos celulares envolvidos, baseado na quantidade do tipo celular em relação ao controle, na resposta a picada do mosquito *A. aegypti* nos animais não sensibilizados foram neutrófilos 6 horas após a picada e células B, células T CD8<sup>+</sup>, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos 24 horas após a picada. Nos animais sensibilizados migraram células B, células T CD8<sup>+</sup>, neutrófilos e eosinófilos 6 horas após a picada enquanto 24 horas após a picada células B, células T CD8<sup>+</sup>, célula T CD4<sup>+</sup>, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e eosinófilos. Entretanto, os eosinófilos são as células que proporcionalmente mais aumentam dentre todas as células avaliadas, 24 horas após a exposição aos mosquitos; em comparação aos animais *Naïve*: 12 vezes nos animais não sensibilizados (grupo PBS) e 42 vezes nos animais sensibilizados (EGS). A figura abaixo ilustra a presença dos leucócitos nos diferentes momentos após a picada de cada grupo (Figura 12).



**Figura 12 - Representação esquemática da presença dos tipos celulares após 6 e 24 horas da picada do mosquito *A. aegypti* na orelha.** Nos animais não sensibilizados (grupo PBS) após 6 horas da picada do mosquito ocorreu aumento de neutrófilos e 24 horas após a picada, além dos neutrófilos foi encontrado a presença de células B e eosinófilos na orelha. Já os animais sensibilizados, ou seja, que receberam inoculação intraperitoneal do EGS por 5 dias consecutivos (grupo EGS), após 6 horas da picada do mosquito foi encontrado a presença de células B e eosinófilos e 24 horas após a picada praticamente todos os tipos celulares estudados foram encontrados em maior quantidade em relação ao controle.

## REFERÊNCIAS\*

- AGARWAL, A. et al. Mosquito saliva induced cutaneous events augment Chikungunya virus replication and disease progression. **Infect. Genet. Evol.**, v. 40, p. 126–135, 2016.
- ALLERGEN. Lincoln Allergen Nomenclature Sub-committee, 2003. Disponível em: <<http://www.allergen.org/search.php?allergenname=&allergensource=Aedes+aegypti&TaxSource=&TaxOrder=&foodallerg=all&bioname=>>>. Acesso em: 6 Jan 2016.
- ALLERGEN. Lincoln Allergen Nomenclature Sub-committee, 2016 Disponível em: <http://www.allergen.org/viewallergen.php?aid=856>>. Acesso em: 6 Jan 2016.
- ALLERGOME. Latina: A Database of Allergenic Molecules, 2015. Disponível em: <[http://www.allergome.com/script/search\\_step2.php](http://www.allergome.com/script/search_step2.php)>. Acesso em: 6 Jan 2016.
- ALLERGOME. Latina: A Database of Allergenic Molecules, 2016. Disponível em: <[http://www.allergome.com/script/dettaglio.php?id\\_molecole=1293](http://www.allergome.com/script/dettaglio.php?id_molecole=1293)>. Acesso em: 6 Jan 2016.
- ASHRAF, M. I.; SHAHZAD, M.; SHABBIR, A. Oxyresveratrol ameliorates allergic airway inflammation via attenuation of IL-4 , IL-5 , and IL-13 expression levels. **Cytokine**, v. 76, n. 2, p. 375–381, 2015.
- BARROS, M. S. et al. Exposure to *Aedes aegypti* Bites Induces a Mixed-Type Allergic Response following Salivary Antigens Challenge in Mice. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155454, 2016.
- BELKAID, Y.; JOUIN, H.; MILON, G. A method to recover, enumerate and identify lymphomyeloid cells present in an inflammatory dermal site: A study in laboratory mice. **J. Immunol. Methods.**, v. 199, n. 1, p. 5–25, 1996.
- BLACK, W. C. et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Arch. Med. Res.**, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.
- BRASIL, Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 31 Out 2016.
- BRASIL, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 31 Out 2016.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, 2012.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin 2beta1, and von willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 26928–26938, 2007.

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

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.**, v. 92, n. 3, p. 694–698, 1995.

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

CHRISTOPHERS, S. R. *Aedes aegypti*: the yellow fever mosquito. **J. Natl. Med. Assoc.**, v. 54, n. 1, p. 132, 1960.

COCHEZ, P. M. et al. AhR modulates the IL-22-producing cell proliferation / recruitment in imiquimod-induced. **Eur. J. Immunol.**, v. 46, p. 1449–1459, 2016.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. DE. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1994.

DAVIES, L. C. et al. Tissue-resident macrophages. **Immunology**, v. 144, n. 4, p. 541–548, 2013.

DEMEURE, C. E. et al. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. **J. Immunol.**, v. 174, n. 7, p. 3932–3940, 2005.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DRAKE, M. G. et al. Human and mouse eosinophils have antiviral activity against parainfluenza virus. **Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.**, v. 55, n. 3, p. 387–394, 2016.

FEINGOLD, B. B. E. N. F.; BENJAMIN, E. I.; MICHAELI, D. The allergic responses to insect bites. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 13, p. 137–158, 1967.

FEUILLET-DASSONVAL, C. et al. Réactions allergiques aux piqûres de moustiques, quelle prévention? **Arch. Pediatr.**, v. 13, n. 1, p. 93–99, 2006.

FOSTER, W. A. Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 40, p. 443–474, 1995.

GARCÍA, E. et al. Immune and histopathologic examination of flea bite-induced papular urticaria. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 92, n. 4, p. 446–452, 2004.

GRAPHPAD PRISM. Versão 6.01. GraphPad Software Inc.

HARBACH, R. E. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa**, v. 1668, p. 591–638, 2007.

HARBACH, R. E.; HOWARD, T. M. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). **European Mosquito Bulletin**, v. 23, p. 1–66, 2007.

HEATH, W. R.; CARBONE, F. R. The skin-resident and migratory immune system in steady state and memory: innate lymphocytes, dendritic cells and T cells. **Immunology**, v. 14, n. 10, p. 978–985, 2013.

HOGAN, A. D.; SCHWARTZ, L. B. Markers of mast cell degranulation. **Methods**, v. 13, n. 1, p. 43–52, 1997.

HORSMANHEIMO, L. et al. Histamine and leukotriene C4 release in cutaneous mosquito-bite reactions. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 98, n. 2, p. 408–411, 1996.

HUDSON, A.; BOWMAN, L.; ORR, C. W. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. **Science**, v. 131, n. 3415, p. 1730–1731, 1960.

JAMES, A. A.; BLACKMER, K.; RACIOPPI, J. V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 75, n. 1, p. 73–83, 1989.

JAMES, A. A.; ROSSIGNOL, P. A. Mosquito Salivary-Glands - Parasitological and Molecular Aspects. **Parasitol. Today.**, v. 7, n. 10, p. 267–271, 1991.

JOSE, P. J. et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 881–887, 1994.

KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.

LARRIVEE, D. H. et al. Histologic stages studies of allergic of guinea reactivity pig to skin: flea different bites. **Exp. Parasitol.**, v. 15, p. 491–502, 1964.

LEE, J. J. et al. Human vs. Mouse Eosinophils: “That which we call an eosinophil, by any other name would stain as red”. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 130, n. 3, p. 572–584, 2012.

MACIEL, C. et al. Evans blue as a simple method to discriminate mosquitoes' feeding choice on small laboratory animals. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e110551, 2014.

MASHIKO, S. et al. Atopic dermatitis and skin disease human mast cells are major IL-22 producers in patients with psoriasis and atopic dermatitis. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 136, n. 2, p. 351–359, 2015.

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

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

MILOSEVITS, J. et al. Immunophenotypic and functional characteristics of haemopoietic cells from human cord blood. **Scand. J. Immuno.**, v. 42, p. 493–500, 1995.

MIOT, H. A.; LIMA, H. C. Allergy to hematophagous arthropods bites. **Curr. Derm. Rep.**, v. 3, n. 1, p. 6–12, 2014.

MOON, P. D. et al. A novel compound 2-(4-{2-[(phenylthio)acetyl]carbonohydrizonoyl}phenoxy)acetamide downregulates TSLP through blocking of caspase-1/NF- $\kappa$ B pathways. **Int. Immunopharmacol.**, v. 38, p. 420–425, 2016.

NAGEL, A. et al. CD3-Positive B cells : a storage-dependent phenomenon. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. e110138, 2014.

NAKANOS, A.; HARADA, T.; MORIKAWA, S. Expression of leukocyte common antigen ( CD45 ) on various human leukemia / lymphoma cell lines. **Acta. Pathol. Jpn.**, v. 40, n. 2, p. 107–115, 1990.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, 2007.

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

PENG, Z.; LI, H.; SIMONS, F. E. R. Immunoblot analysis of salivary allergens in 10 mosquito species with worldwide distribution and the human IgE responses to these allergens. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 101, n. 4 I, p. 498–505, 1998.

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

PETRIE, H. T. et al. Lineage relationships and developmental kinetics of immature thymocytes: CD3, CD4, and CD8 acquisition in vivo and in vitro. **J. Exp. Med.**, v. 172, n. 6, p. 1583–8, 1990.

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

POHIN, M. et al. Oncostatin M overexpression induces skin inflammation but is not required in the mouse model of imiquimod-induced psoriasis-like inflammation. **Eur. J. Immunol.**, v. 46, p. 1737–1751, 2016.

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, 2014.

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

RIBEIRO, J. M. C. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med. Vet. Entomol.**, v. 14, n. 2, p. 142–148, 2000.

ROTHENBERG, M. E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. **Proc. Natl. Acad.**, v. 92, n. 19, p. 8960–8964, 1995.

SCHMID, M. A. et al. Mosquito saliva increases endothelial permeability in the skin, immune cell migration, and dengue pathogenesis during antibody-dependent enhancement. **PLoS ONE**, v. 12, n. 6, p. e1005676, 2016.

SCHNEIDER, B. S. et al. Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted west nile virus infection. **PLoS ONE**, v. 2, n. 11, p. e1171, 2007.

SIMONS, F. E. R.; PENG, Z. Mosquito allergy: recombinant mosquito salivary antigens for new diagnostic tests. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 124, n. 1–3, p. 403–405, 2001.

SINGH, S.; MANN, M. K. Insect bite reactions. **Indian J. Dermatol. Venereol. Leprol.**, v. 79, n. 2, p. 151–164, 2013.

SOLLEY, G. O. et al. The late phase of the immediate wheal and flare skin reaction. Its dependence upon IgE antibodies. **J. Clin. Invest.**, v. 58, n. 2, p. 408–420, 1976.

STYER, L. M. et al. Mosquito Saliva Causes Enhancement of West Nile Virus Infection in Mice. **J. Virol.**, v. 85, n. 4, p. 1517–1527, 2011.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2005.

TONG, P. L. et al. The skin immune atlas: three-dimensional analysis of cutaneous leukocyte subsets by multiphoton microscopy. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 1, p. 84–93, 2015.

WAUQUIER, N. et al. The acute phase of Chikungunya virus infection in humans is associated with strong innate immunity and T CD8 cell activation. **J. Infect. Dis.**, v. 204, n. 1, p. 115–123, 2011.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

## **CAPÍTULO 2**

**Participação da interleucina-5 e da 5-lipoxigenase na eosinofilia aguda peritoneal causada pelos componentes salivares do mosquito *Aedes aegypti***

## 2.1 INTRODUÇÃO

Wharton Jones descreveu pela primeira vez o eosinófilo no sangue como uma célula de grânulos grosseiros (“*coarse granule cells*”) em 1846 (HORVATHOVA, 2004). Porém, somente em 1879, Paul Ehrlich fez uma descrição completa dessa célula (VENGE, 2001). Em um esfregaço de sangue, o cientista notou a capacidade dos grânulos de algumas células se corarem com o corante ácido eosina, daí seu nome “eosinófilo” (HIRSCH; HIRSCH, 1980 apud GLEICH; LOEGERING, 1984<sup>2</sup>). Desde então, muito se tem aprendido sobre a biologia dessa célula (BOCHNER, 2004) e seu papel na patogênese da alergia (HAMELMANN; GELFAND, 2001), de distúrbios gastrointestinais eosinofílicos (ROTHENBERG, 2004) e na síndrome hipereosinofílica (LEIFERMAN; GLEICH, 2004). Historicamente, o eosinófilo tem sido indicado como a célula envolvida na proteção contra parasitas. Entretanto, numerosas linhas de evidências têm mudado esta perspectiva, mostrando que os eosinófilos são leucócitos multifuncionais pleiotrópicos envolvidos também na iniciação e na propagação de diversas respostas inflamatórias, assim como na modulação da imunidade adaptativa pela ativação direta de células T (ROTHENBERG; HOGAN, 2006).

Eosinófilos são células residentes em órgãos hematopoiéticos e linfáticos, tais como medula óssea, baço, linfonodos, timo (STRAUMANN; SIMON, 2004), e outros tecidos como glândulas mamárias, útero e intestino (BLANCHAR; ROTHENBERG, 2009). Elas podem ser identificadas pelo seu núcleo bilobado ou trilobado e pelos grandes grânulos específicos, representando de 1% a 5% dos leucócitos no sangue de uma pessoa saudável (BEHM; OVINGTON, 2000; ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2012). Eosinófilos maduros contêm até quatro diferentes tipos de organelas secretoras (grânulos cristaloides, grânulos primários, grânulos pequenos e vesículas secretoras), mas a maior delas é o grânulo cristalóide compostos por proteínas com carga básica (HOGAN et al., 2008), cujo núcleo é composto pela proteína básica principal (MBP) e cuja matriz é composta pelas proteínas catiônica do eosinófilo (ECP), peroxidase do eosinófilo (EPO) e a neurotoxina derivada do eosinófilo (EDN) (ACHARYA; ACKERMAN, 2014). Estes grânulos são capazes de induzir dano tecidual

---

<sup>2</sup> HIRSCH; HIRSCH apud GLEICH; LOEGERING, 1984, p. 429.

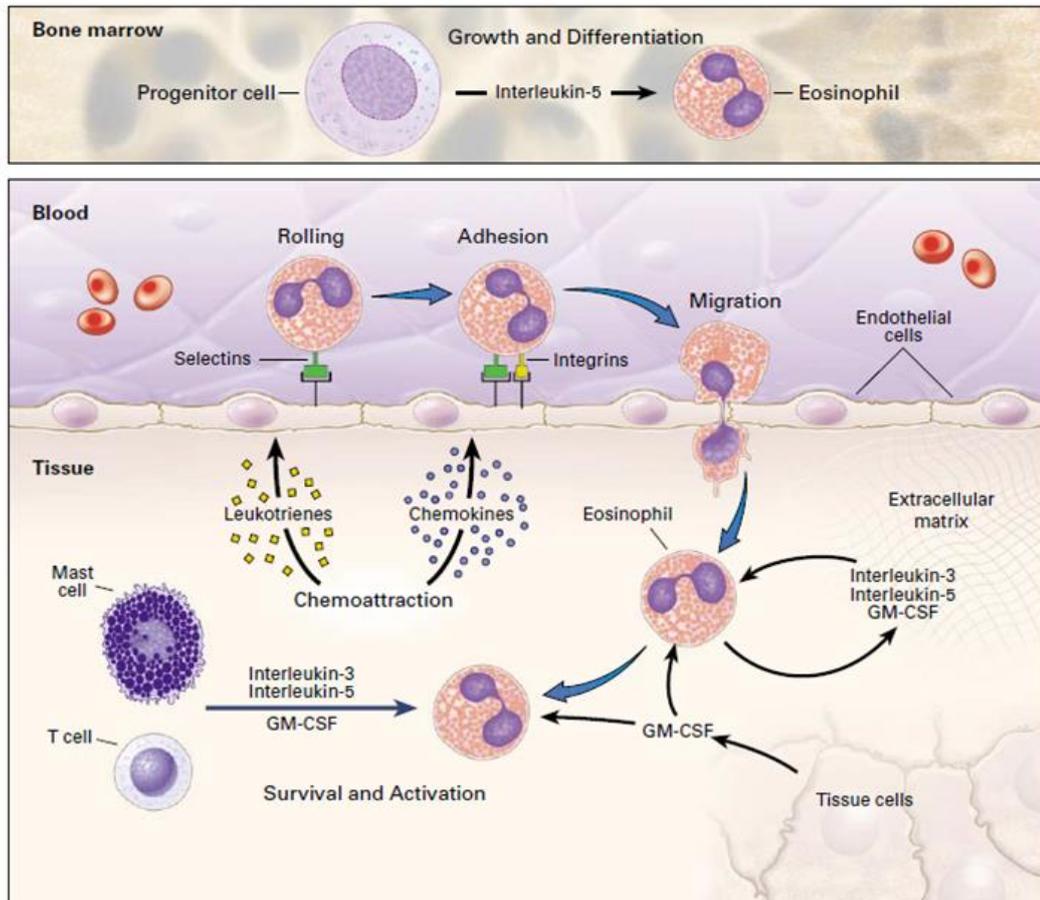
HIRSCH, J. G., HIRSCH, B. I. Paul Ehrlich and the discovery of the eosinophil. 1980.

uma vez que possuem atividade citotóxica e também estocam numerosas citocinas, enzimas e fatores de crescimento (VENGE, 2001).

Durante um processo inflamatório que tenha a participação de eosinófilos, essas células se multiplicam na medula óssea e migram para o sangue, um processo chamado de eosinofilia, e desse compartimento para os tecidos. A eosinofilia ocorre como resultado de quatro processos (ROTHENBERG, 1998):

- a) diferenciação das células progenitoras e proliferação dos eosinófilos na medula óssea;
- b) interação entre o eosinófilo e a célula endotelial;
- c) quimiotaxia do eosinófilo;
- d) ativação e desgranulação de eosinófilo.

A seguir, a Figura 1 ilustra os processos pontuados acima.



**Figura 1 - Processos envolvidos na eosinofilia.** Eosinófilos se desenvolvem na medula óssea em resposta a estimulação das células progenitoras pela IL-5. Eosinófilos maduros no sangue periférico aderem nas células endoteliais por meio da interação de selectinas e integrinas com os receptores endoteliais destas moléculas. Exposto a mediadores quimioatraentes, os eosinófilos transmigram entre as células endoteliais e migram para dentro dos tecidos. O acúmulo dos eosinófilos é regulado pela geração de fatores de ativação e de sobrevivência (IL-3, IL-5 e GM-CSF) pelas células T e por mastócitos. Em resposta aos componentes da matriz extracelular os eosinófilos podem gerar citocinas que prolongam sua sobrevivência. Fonte: (ROTHENBERG, 1998).

A diferenciação das células progenitoras e proliferação dos eosinófilos, também conhecida como eosinofiloiose, primeiro momento do processo de eosinofilia, ocorre na medula óssea a partir de células-tronco pluripotentes (MISHRA et al., 1999) que diferenciam-se primeiro em um precursor híbrido com propriedades de basófilo e eosinófilo (DENBURG et al., 1985). A partir dessas células, os progenitores mielóides comum CD34<sup>+</sup> estimulados pelas citocinas IL-3, IL-5 e GM-CSF e por fatores de transcrição como o GATA-1 dão origem ao granulócito eosinófilo maduro (SEHMI et al., 1997; YU et al., 2002). De fato, essas citocinas estão bem caracterizadas por estimular a eosinofiloiose *in vitro* (CAMPBELL et al., 1987; LOPEZ et al., 1987; METCALF et al., 1986). Enquanto a IL-3 e o GM-CSF não são

específicas para eosinófilo, pois também induzem a diferenciação de outras células mielóides como os mastócitos (YAMAGUCHI et al., 1988), conjuntamente com a IL-5, são capazes de direcionar a diferenciação para eosinófilos (SANDERSON, 1992). Destas, a IL-5 (previamente conhecida como fator de diferenciação do eosinófilo), é a principal citocina que estimula especificamente a proliferação e a diferenciação do eosinófilo (WARREN; MOORE, 1988), bem como estimula a saída do eosinófilo da medula óssea para a circulação periférica em um estado completamente maduro (FACCIOLI; MOKWA; SILVA, 1996). Os eosinófilos permanecem pouco tempo no sangue periférico - meia vida de aproximadamente 18 horas (STEINBACH et al., 1979) e então migram para os tecidos periféricos (FACCIOLI; MOKWA; SILVA, 1996) onde permanecem de 8 a 12 dias na ausência de estimulação (SORICE; SIMONE, 1986).

No segundo momento do processo de eosinofilia ocorre a interação entre o eosinófilo e as células endoteliais. Neste momento são observados os mecanismos de rolamento, adesão e migração dessas células. Inicialmente, no rolamento, o eosinófilo adere ao endotélio. A P-selectina (CD62P) presente nas células endoteliais reconhece sua glicoproteína ligante (CD162) no eosinófilo (BOCHNER; GLEICH, 2010; SYMON et al., 1994). Após essa etapa, ocorre uma exposição do eosinófilo a quimioatraentes, descritos logo abaixo, gerando a firme adesão no endotélio das moléculas da família das integrinas (BROIDE; SRIRAMARAO, 2001; ROTHENBERG, 1998), seguida de sua migração para o tecido. Os quimioatraentes são provavelmente os responsáveis pela quimiotaxia, terceiro momento do processo de eosinofilia, resultando no recrutamento do eosinófilo para os tecidos inflamados (ROTHENBERG, 1998). Nesse recrutamento, a eotaxina-1 (CCL11), eotaxina-2 (CCL24) e eotaxina-3 (CCL26) são as principais quimiocinas envolvidas no tráfego de eosinófilos (DOMBROWICZ; CAPRON, 2001; PROVOST et al., 2013), embora também participem desse processo RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13) e MIP-1 $\alpha$  (CCL3) (JOSE et al., 1994; ROTHENBERG; LUSTER; LEDER, 1995; ZIMMERMANN et al., 2003). Durante esse processo, ocorre ainda a interação com o receptor 3 de quimiocina CC (CCR3), um receptor acoplado a proteína G, principalmente expresso em eosinófilo e que reconhece boa parte das quimiocinas descritas acima (DAUGHERTY et al., 1996). Embora a maioria dos estudos mostrarem o papel da IL-5 e das eotaxinas na migração dos eosinófilos, os mediadores lipídicos também participam desse processo. Dentre os mediadores lipídicos foram descritos que o Fator de Ativação de Plaquetária (PAF) e os

eicosanoides como os leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), os cisteinil-leucotrienos e prostaglandina D<sub>2</sub> são capazes de ativar e recrutar eosinófilos (LUNA-GOMES; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2013).

Por fim, na última etapa do processo de eosinofilia, ocorre a ativação do eosinófilo, onde participam os receptores de superfície celular como os receptores de imunoglobulina (FcR) e de complemento, que são importantes para o reconhecimento do antígeno; receptores de quimiocinas, para a regulação da migração celular; e receptores para citocinas e fatores de crescimento, para a regulação do crescimento (VENGE, 2001). Dentre os principais receptores que definem a biologia única do eosinófilo estão IL-5R $\alpha$ , o CCR3 e o Siglec-8 em humanos e Siglec-F (também conhecido como Siglec-5) em camundongos (ROSENBERG; DYER; FOSTER, 2012). A desgranulação é vista como um evento importante na ativação dos eosinófilos. Em doenças alérgicas, acredita-se que a liberação do produto dos seus grânulos é um componente essencial no início e na fase tardia da resposta dos tecidos da mucosa ao desafio alérgico. Essa desgranulação também ocorre em reações alérgicas cutâneas (VENGE, 2001).

As reações alérgicas cutâneas, assim como outras manifestações de hipersensibilidade imediata, em geral são caracterizadas pelas fases imediata e tardia, embora alguns autores reconheçam a reação crônica como uma possível terceira fase (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008). A fase imediata ocorre dentro de minutos após a exposição ao antígeno e compreende processos decorrentes da desgranulação de mastócitos dependente de IgE, como a vasodilatação (que causa eritema/vermelhidão) e o aumento da permeabilidade vascular (levando ao inchaço/edema). A fase tardia, em geral se inicia após 2-6 horas da exposição ao antígeno, possui um pico entre 6-9 horas e apresenta uma diminuição gradual nas 24-48 horas seguintes, desde que não haja persistência do desafio antigênico. Essa fase tardia é dependente também da dose do antígeno sendo caracterizada por dor, sensação de calor, eritema e endurecimento da pele com eventual formação de pápulas e vesículas/bolhas (GALLI; TSAI; PILIPONSKY, 2008; LEE et al., 2014). Nessa fase, a migração e ativação de eosinófilos, basófilos e outros leucócitos é bastante proeminente.

## 2.2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVO

As picadas dos artrópodes hematófagos representam uma fonte de novos antígenos/alérgenos ao ambiente (PLATTS-MILLS; COMMINS, 2013) que freqüentemente geram reações cutâneas imediatas e de fase tardia, resultando no influxo de eosinófilos (KARPPINEN et al., 1996). De fato, há várias décadas os eosinófilos têm sido reportados em biópsias de picadas de diversos artrópodes hematófagos, incluindo mosquitos, flebótomos e carrapatos (BROWN; WORMS; ASKENASE, 1983; COLLIN et al., 2009; REUNALA; BRUMMER-KORVENKONTIO; PALOSUO, 1994). Como mencionado, este infiltrado de eosinófilos nos tecidos é uma característica importante de doenças alérgicas, incluindo a dermatite atópica (OYOSHI et al., 2012), embora novas doenças alérgicas possam surgir como decorrência da exposição a essas picadas (PLATTS-MILLS; COMMINS, 2013). Estas doenças alérgicas são comumente associadas com inflamação crônica caracterizada pela infiltração e o acúmulo de eosinófilos, células T e mastócitos (SOUWER et al., 2010). Assim, as picadas de mosquito causam reações imunologicamente mediadas que compreendem o local da picada e podem eventualmente provocar reações sistêmicas alérgicas (CRISP; JOHNSON, 2013).

Assim, tivemos como objetivo neste trabalho, avaliar o início da resposta aos componentes salivares do mosquito *Aedes aegypti* no modelo de inflamação peritoneal, bem como o papel da IL-5 e dos leucotrienos no desenvolvimento da inflamação eosinofílica em resposta aos componentes salivares. Para tanto, tivemos como objetivos específicos:

- a) identificar os leucócitos presentes na cavidade peritoneal após inoculação dos componentes salivares;
- b) identificar se o infiltrado inflamatório é causado pela presença do LPS no EGS, bem como se é dependente do estrutura tridimensional das proteínas do mesmo;
- c) determinar a produção de IL-5 no lavado da cavidade peritoneal;
- d) determinar a participação da IL-5 e dos leucotrienos sobre a migração de eosinófilo para a cavidade peritoneal.

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou na Lei Federal nº 11.794/2008 (Lei Arouca) (BRASIL, 2008), no Decreto nº 6.899/2009 (BRASIL, 2009) e nas Resoluções Normativas publicadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA-ICB/USP), cujo certificado foi registrado sob o nº. 121, na folha 24 do livro 03 para uso de animais em experimentação.

### 2.3.1 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, 129 ALOX 5 (B6.129S2-Alox5<sup>tm1Fun</sup>) (CHEN et al., 1994) e 129 SvE fêmeas com idade entre 6-12 semanas, provenientes do Biotério de Camundongos Isogênicos do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB/USP). Os animais foram mantidos no Biotério de Camundongos Isogênicos do Departamento de Imunologia em estantes ventiladas em estantes ventiladas e em condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas), com livre acesso a água e alimento.

### 2.3.2 Mosquitos e obtenção do Extrato da Glândula Salivar (EGS)

Mosquitos *A. aegypti* machos e fêmeas foram mantidos a  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ , com umidade relativa do ar de  $80\% \pm 10\%$  e sob um fotoperíodo de 12 horas luz e 12 horas escuro no Biotério de Insetos do Departamento de Parasitologia do ICB/USP, coordenado pela Professora Doutora Margareth de Lara Capurro, onde foram alimentados com solução de sacarose 10% [p/v] e acasalados. Glândulas salivares de fêmeas com 5-8 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  $\mu\text{L}$  de PBS gelado.

Para o preparo do extrato da glândula salivar (EGS), os tubos contendo as glândulas salivares foram sonicados para liberação do material solúvel e centrifugados a 14.000 *g* por 10 minutos à temperatura de  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  para remoção do material particulado.

O sobrenadante resultante, referido como EGS, foi reunido e esterilizado por passagem através de um filtro contendo uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,22 µm Millex (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda). A concentração proteica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo 8 Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e alíquotas foram armazenadas a -80 °C até o momento de uso.

### 2.3.3 Inoculação intraperitoneal do EGS de *A. aegypti* e obtenção do lavado da cavidade peritoneal (LCP)

O modelo de inflamação peritoneal é utilizado para estudos de migração celular, pois, após um estímulo, um grande número de leucócito migram para esse compartimento (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010). Assim, camundongos das linhagens descritas no item 2.3.1 receberam inoculação intraperitoneal com EGS (5 µg/animal/dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos. Um grupo controle consistiu na inoculação intraperitoneal de PBS (0,5 mL/animal) também por 5 dias consecutivos. A obtenção do LCP foi realizada 24 horas após a última inoculação de PBS ou EGS por meio da lavagem da cavidade com 3 mL de PBS gelado. As células recuperadas foram centrifugadas a 300 g (5 minutos/4 °C), o sobrenadante foi coletado e liofilizado e as células foram ressuspendidas em PBS para contagem em câmara de Neubauer. Suspensões celulares contendo  $4 \times 10^4$  células foram preparadas em alíquotas de 200 µL e, em seguida, citocentrifugadas a 500 rpm por 5 minutos em lâminas para microscopia de 2,6 x 7,6 cm (BIO Research, São Paulo, SP, Brasil). As lâminas foram então coradas com o kit “3 Step Staining Set” (Richard Allan Scientific, Kalamazo, MI, EUA). Células mononucleares, eosinófilos e neutrófilos foram identificados segundo coloração e características morfológicas. Com o auxílio de um microscópio óptico, as populações celulares foram contadas (100 células/lâmina) utilizando a lente objetiva de imersão (aumento final de 1000 vezes). Após realização da contagem diferencial, o número total de cada tipo celular foi calculado em função de sua porcentagem em relação ao número total de células.

### 2.3.4 Avaliação do potencial papel de LPS e da integridade dos componentes salivares na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti*

Para determinar a concentração de endotoxina presente no EGS de *A. aegypti*, utilizamos o ensaio cinético quantitativo para detecção de endotoxinas de bactérias Gram-negativas *in vitro* O Kinetic-QCL™ (Lonza Group Ltd, Muenchensteinerstrasse, Basel, Switzerland), seguindo instruções do fabricante. O ensaio utiliza um preparado de lisado de amebócitos de límulo (LAL), que é usado para detectar endotoxinas por método colorimétrico empregando uma leitora de microplacas. Para isso, um volume de 100 µL contendo diferentes concentrações do EGS (10 e 40 µg/mL) foram dispensadas em placa de 96 poços pré-incubada por 10 minutos a 37 °C ± 1 °C no leitor de microplaca. O LAL foi reconstituído imediatamente antes do uso e 100 µL do reagente LAL foi adicionado a cada amostra (substrato). A microplaca com o reagente LAL/substrato foi colocada em uma leitora de microplacas sob incubação e monitorada ao longo do tempo para detectar o surgimento de coloração amarela. A absorbância dos poços individuais foi determinada no comprimento de onda 405 nm no espectrofotômetro. A concentração de endotoxina presente no EGS foi calculada com base em curva padrão do controle padrão de endotoxina, produzida na mesma placa do ensaio.

Como diferentes preparações de LPS das diversas companhias produtoras variam em sua atividade de endotoxina, estimamos essa atividade nas amostras utilizadas em nosso laboratório (LPS-EB ultrapure, Invivogen, San Diego, CA, EUA), utilizando o mesmo ensaio. Após determinada as concentrações de endotoxina nas amostras, foi estimado o volume de LPS equivalente presente no EGS da seguinte forma:

$$V_{LPS} = \frac{C_{EGS} \times V_{uso}}{C_{LPS}}$$

onde,  $V_{LPS}$  é o volume de LPS equivalente;  $C_{EGS}$  é a concentração de endotoxina presente no EGS (EU/mL);  $V_{uso}$  é o volume necessário para um grupo de animal; e  $C_{LPS}$  é a concentração de endotoxina presente no LPS estoque (EU/mL).

Para descartar que o influxo de eosinófilos para a cavidade peritoneal tenha sido efeito do LPS presente no EGS, camundongos da linhagem BALB/c receberam inoculação intraperitoneal com 10 vezes o volume de LPS equivalente presente no EGS por 5 dias consecutivos e 24 horas após a última inoculação o LCP foi coletado. Animais sensibilizados e controles receberam EGS (5 µg/animal/dia, diluído em 0,5 mL de PBS) e PBS (0,5 mL/animal), respectivamente, durante os mesmos 5 dias.

Para avaliar se a eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti* é dependente da integridade estrutural de suas proteínas, o extrato foi aquecido à temperatura de 95 °C por 5 minutos em banho seco.

#### 2.3.5 Quantificação de IL-5 por ensaio imuno-enzimático (“*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*” - ELISA)

Para dosagem da IL-5 presente no LCP utilizamos o “BD OptEIA ELISA Set” (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA), seguindo instruções do fabricante como descrito a seguir. Placas de 96 poços foram sensibilizadas com anticorpos de captura diluídos em solução de “*coating*” (tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5). Após incubação “*overnight*” a 4 °C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% (300 µL/poço) e, em seguida, incubadas com solução de bloqueio (200 µL/poço de PBS/soro fetal bovino - SFB 10%) por 1 hora a temperatura ambiente. A seguir, as placas foram lavadas 3 vezes e o LCP liofilizado, ressuspendido em 100 µL de água Milli-Q®, foi adicionado à placa (100 µL/poço). Uma curva padrão de IL-5 recombinante foi preparada e também adicionada à placa (100 µL/poço). Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes e 100 µL do reagente de detecção (anticorpo secundário biotinizado e estreptavidina conjugada com peroxidase) diluído em PBS/SFB 10% foram adicionados em cada poço. Após incubação por 1 hora a temperatura ambiente e mais um ciclo de 9 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço de uma solução reveladora consistindo numa mistura volume/volume de 3,3',5,5' tetramethylbenzidine (TMB) e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), seguido de incubação no escuro por no máximo 30 minutos. A reação colorimétrica desenvolvida foi bloqueada com a adição de 50 µL/poço da solução de parada (1 M de ácido fosfórico - H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). A absorbância dos poços individuais foi determinada no comprimento de onda 450 nm no espectrofotômetro. As concentrações de IL-5 presentes nos sobrenadantes do lavado da cavidade peritoneal foram calculadas com base em curva padrão desta citocina, produzida na mesma placa a cada ensaio.

#### 2.3.6 Participação da IL-5 na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti*

Para avaliar a participação da IL-5 na eosinofilia peritoneal induzida pela inoculação do EGS de *A. aegypti*, camundongos da linhagem BALB/c receberam intraperitonealmente 50 µg do anticorpo monoclonal anti-IL-5 (clone TRFK5) diluído em 0,5 mL de PBS. Animais do grupo controle receberam a mesma quantidade do isotipo controle (IgG1 de rato – clone RTK2071), diluído da mesma maneira. Após 24 horas, os animais foram inoculados intraperitonealmente com EGS (5 µg/animal/ dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos e o LCP foi coletado e preparado como descrito no item 2.3.

### 2.3.7 Análise estatística

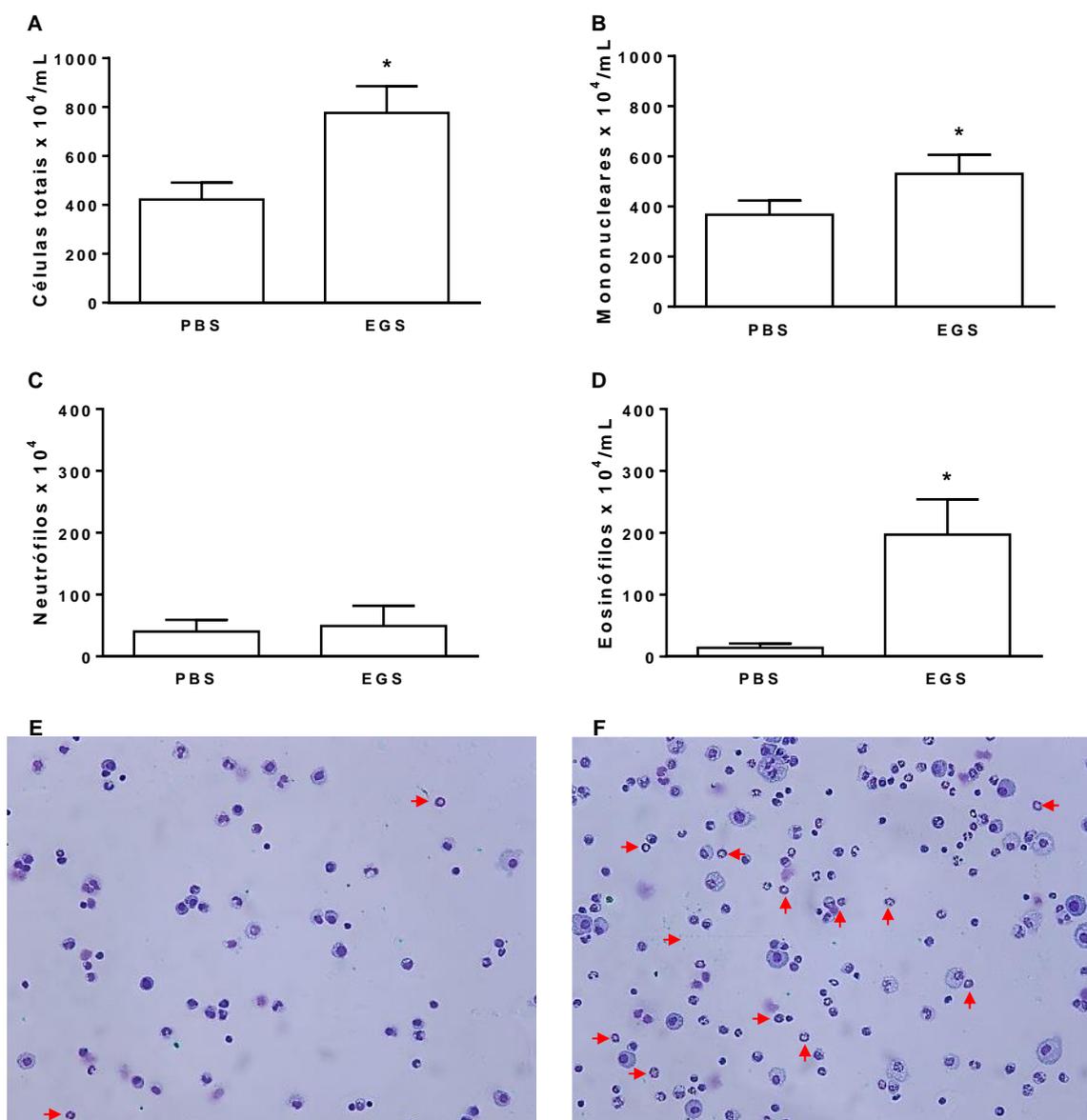
A análise estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi feita utilizando-se teste *t* de Student ou análise de variância (ANOVA) seguido do pós-teste Tukey, com significância mínima estabelecida em  $p \leq 0,01$ . Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 6.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA).

## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Eosinofilia peritoneal aguda induzida pela inoculação de EGS de *A. aegypti*

O recrutamento celular é um evento importante na inflamação. Após um estímulo, o número e os tipos celulares envolvidos nos estágios iniciais de um recrutamento inflamatório influenciam no desenvolvimento das respostas futuras e da imunidade adquirida (TEIXEIRA et al., 2005). Assim, como mostrado na primeira parte deste trabalho, a picada do *A. aegypti* induz um perfil de migração celular diferente em animais previamente sensibilizados e em animais que tiveram a primeira exposição ao mosquito. Dessa forma, pareceu-nos pertinente estudar o perfil inflamatório nos eventos iniciais da sensibilização e as moléculas envolvidas nesse processo. Para isso, os animais receberam EGS (5 µg/animal) intraperitonealmente por 5 dias consecutivos e 24 horas após a última inoculação, o LCP foi coletado para quantificação de células totais e diferenciais. Essas contagens foram comparadas com as de um grupo controle, que recebeu PBS (0,5 mL/animal) durante os mesmos 5 dias.

A Figura 2 apresenta o infiltrado celular na cavidade peritoneal. Houve um aumento significativo na migração total de células para cavidade induzida pelo EGS comparado ao grupo PBS ( $p \leq 0,01$  - Figura 1A). Para caracterizar o tipo celular predominante no infiltrado inflamatório, foi realizada também a contagem diferencial das células recuperadas do LCP em lâminas preparadas em citocentrífuga. Foi observado um aumento significativo de células mononucleares e de eosinófilos (Figura 1B e D) presentes no LCP de animais do grupo EGS em relação ao grupo PBS ( $p \leq 0,01$ ). Os neutrófilos presente nos LCP não apresentaram diferença significativa entre os grupos. A migração robusta de eosinófilos para a cavidade peritoneal dos animais que receberam os componentes salivares de *A. aegypti* fica evidente quando observadas as imagens das lâminas preparadas com o material proveniente dos animais do grupo EGS (Figura 1F) em comparação ao grupo PBS (Figura 1E). A quantidade de mastócitos não diferente entre os grupos (dados não mostrados). Tomados em conjunto, estes resultados mostram que o aumento do número de células totais presentes no LCP de animais sensibilizados com EGS foi constituído principalmente pelo influxo de eosinófilos.

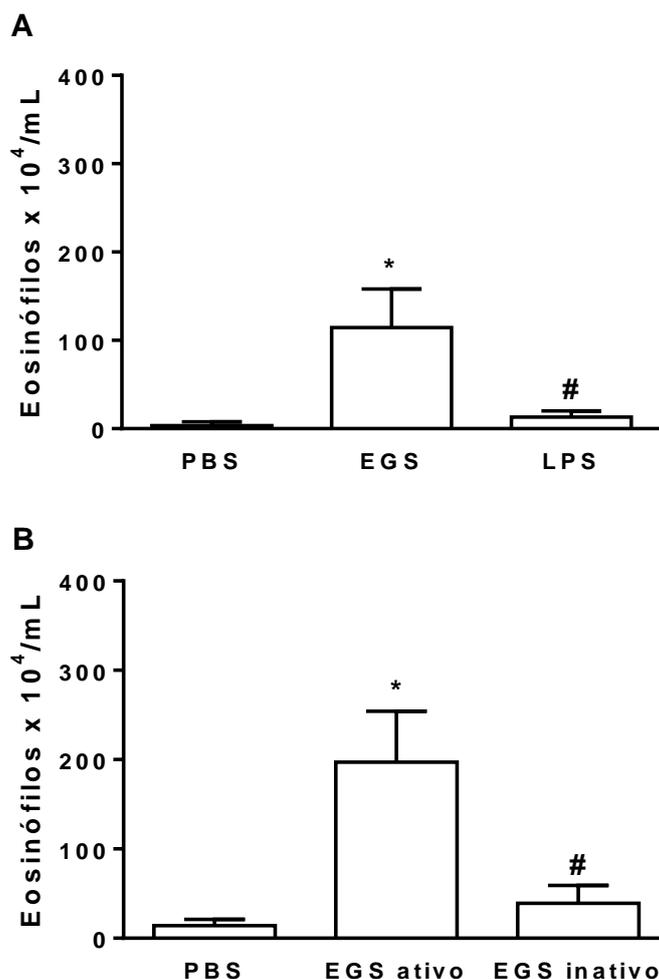


**Figura 2 - Infiltrado inflamatório no LCP de camundongos BALB/c que receberam PBS ou EGS do mosquito *A. aegypti*.** Os animais receberam inoculação intraperitoneal de PBS (0,5 mL/animal) ou EGS (5 µg diluídos em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos. Após 24 horas da última inoculação, o LCP foi coletado e o número de células totais e diferenciais foi determinado conforme descrito em Material e Métodos: (A) Células totais, (B) células mononucleares, (C) neutrófilos, (D) eosinófilos. Fotomicrografias das células do LCP coradas com corantes hematológicos para caracterização das células inflamatórias: (E) PBS e (F) EGS. Setas vermelhas indicam os eosinófilos. Resultado representativo expressos como média ± SD. \* $p \leq 0,01$  versus grupo PBS (n=5).

#### 2.4.2 Papel de LPS e da integridade dos componentes salivares na eosinofilia peritoneal induzida pelo EGS de *A. aegypti*

Como o EGS foi obtido a partir de mosquitos fêmeas adultos de *A. aegypti* em condições não estéreis, conforme descrito em Material e Métodos, realizamos uma avaliação para determinar se a contaminação do EGS por LPS seria capaz de induzir uma resposta imune de inflamação eosinofílica e, portanto, confirmar que o influxo de eosinófilos para a cavidade peritoneal é realmente efeito dos componentes salivares do mosquito. A concentração de endotoxina foi determinada no EGS e o volume de LPS equivalente presente foi estimado. Animais receberam EGS (5 µg/animal) ou LPS intraperitonealmente, por 5 dias consecutivos e 24 horas após a última inoculação o LCP foi coletado. Animais controles receberam PBS (0,5 mL/animal) durante os mesmos 5 dias. Como esperado, a administração EGS aumentou significativamente a migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal ( $p \leq 0,01$ ) em relação ao grupo PBS. Já o LPS, mesmo em concentração 10 vezes maior do que aquela presente no extrato, não induziu migração significativa deste tipo celular em relação ao grupo PBS ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 3A).

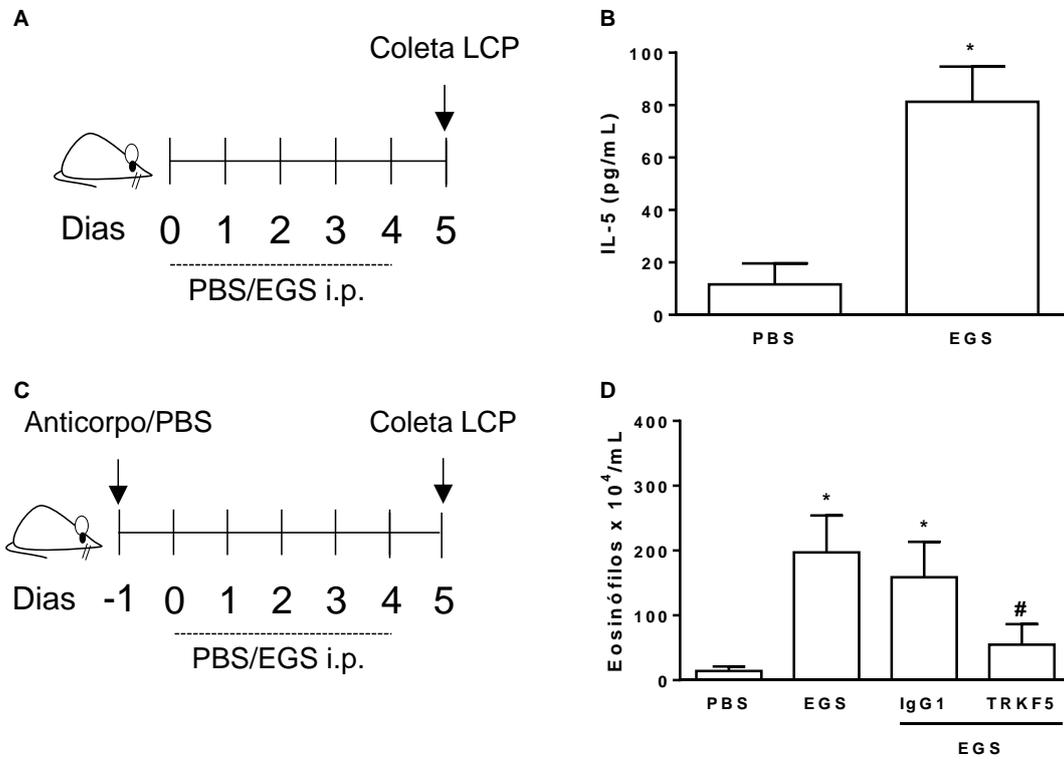
Uma vez determinado que a inflamação eosinofílica presente na cavidade peritoneal é de fato decorrente da atividade do EGS, realizamos um tratamento térmico para desnaturar suas proteínas e investigar se o desenvolvimento da inflamação eosinofílica dependia da integridade da estrutura tridimensional dessas proteínas. Animais receberam o EGS desnaturado ou não (5 µg/animal) intraperitonealmente por 5 dias consecutivos e após 24 horas a última inoculação, o lavado da cavidade peritoneal foi coletado e a contagem de eosinófilos foi comparada com aquela de animais que receberam apenas PBS pelo mesmo período. A Figura 3B mostra que a desnaturação das proteínas causada pelo calor nas proteínas do EGS inibiu o recrutamento de eosinófilos de maneira significativa quando comparada ao grupo que recebeu EGS não tratado ( $p \leq 0,01$ ). Avaliamos ainda a migração de mononucleares e neutrófilos e, embora de maneira não significativa, esses tipos celulares também se apresentaram diminuídos no grupo que recebeu o EGS desnaturado (dados não mostrados).



**Figura 3 – A presença de LPS e a desnaturação térmica das proteínas do EGS não induzem migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal.** Camundongos BALB/c receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5 µg/animal/dia, diluídos em 0,5 mL de PBS) ativo ou inativado a temperatura de 95 °C por 5 minutos e LPS 10 vezes concentrado ao equivalente de endotoxina (EU/mL) encontrada no EGS, por 5 dias consecutivos. Após 24 horas da última inoculação, o LCP foi coletado. (A) Número de eosinófilos presentes no LCP de animais que receberam EGS e LPS e (B) número de eosinófilos presentes no LCP de animais sensibilizados com EGS ativo ou inativo. Animais controles receberam i.p. PBS. Resultado representativo expressos como média ± SD. \* $p \leq 0,01$  versus grupo PBS e # $p \leq 0,01$  versus o grupo EGS ativo (n=5).

### 2.4.3 Efeito da neutralização de IL-5 sobre a migração de eosinófilos na cavidade peritoneal induzida por EGS

Como a citocina IL-5 é o principal mediador envolvido na maturação, sobrevivência e saída de eosinófilos da medula óssea, bem como, em condições inflamatórias, participa do recrutamento do eosinófilo (FACCIOLI; MOKWA; SILVA, 1996; SANDERSON, 1992; SEHMI et al., 1997), utilizamos os protocolos de inoculação e tratamento apresentados na Figura 4A e 4C para avaliar a presença dessa citocina no sobrenadante do LCP e seu papel na reação peritoneal eosinofílica. A Figura 4D mostra que as células presentes no LCP de animais inoculados com EGS por 5 dias consecutivos produziram níveis significativamente maiores da IL-5 do que as células dos animais que receberam PBS ( $p \leq 0,01$ ). O pré-tratamento intraperitoneal dos animais com o anticorpo monoclonal anti-IL-5 (TRFK5, 50  $\mu\text{g}/\text{animal}$ ) 24 horas antes das inoculações do EGS afetou significativamente o recrutamento de eosinófilos para a cavidade peritoneal em relação aos animais sensibilizados com EGS que receberam isotipo controle (IgG1 de rato) ou PBS no mesmo período ( $p \leq 0,01$ ), reduzindo em 72,2% a migração deste tipo celular. Entretanto, o pré-tratamento dos animais com TRFK5 não afetou significativamente o recrutamento celular total e de outros tipos celulares para cavidade peritoneal induzido pelo EGS, mostrando assim que o tratamento inibiu seletivamente a migração de eosinófilos.

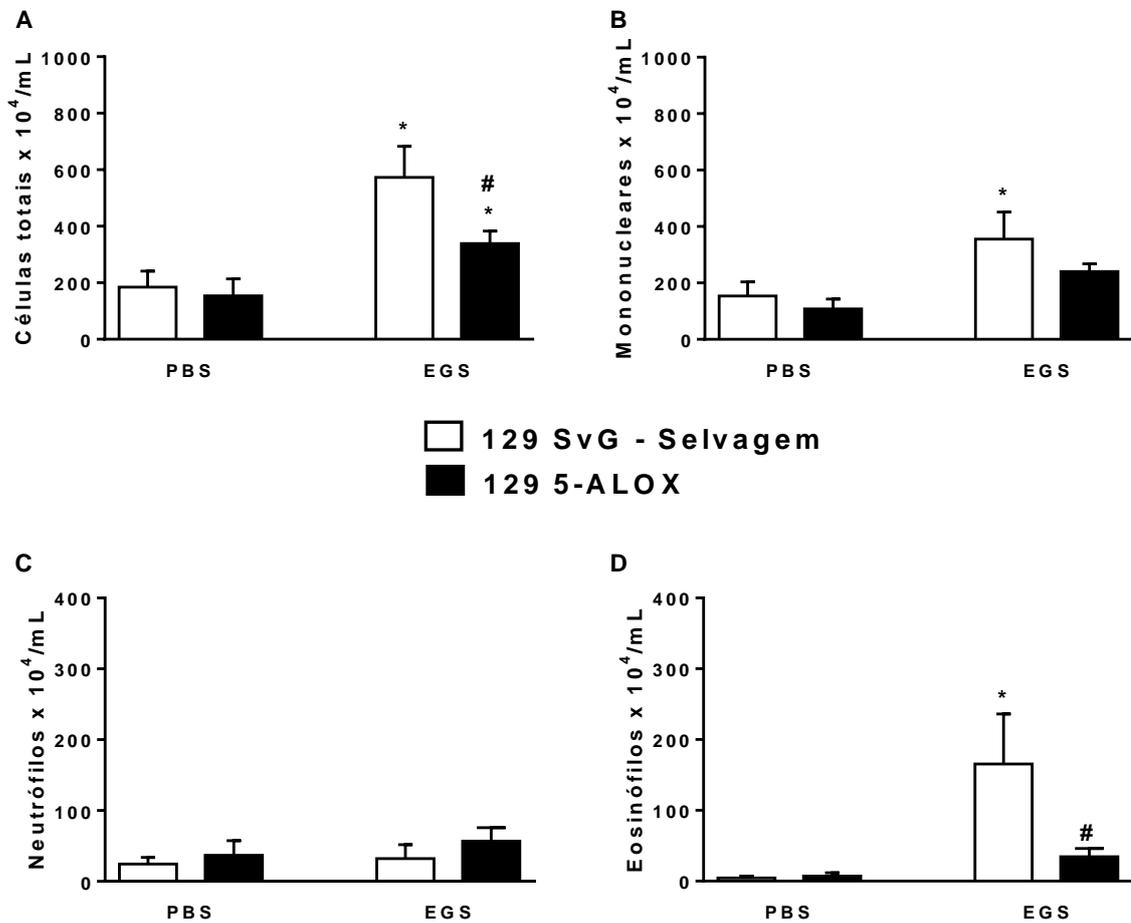


**Figura 4 - Presença da IL-5 no sobrenadante do LCP e efeito da neutralização dessa citocina no modelo de reação inflamatória eosinofílica induzida por EGS de *A. aegypti*.** Camundongos BALB/c receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5 µg/animal/dia, diluído em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos. Após 24 horas da última inoculação, o LCP foi realizado (A). Produção de IL-5 determinada por ELISA (B). Outro grupo de animais receberam inoculação intraperitoneal de 50 µg dos anticorpos anti-IL-5 (TRKF5) ou IgG1 de rato (k isotipo) 24 horas antes das inoculações de EGS. Após 24 horas da última inoculação de EGS foi realizado o LCP (C). Número de eosinófilos (D) presentes nos animais sensibilizados e que receberam pré-tratamento com anticorpos anti-IL-5 e IgG1. Animais controles receberam PBS i.p. Resultado representativo expressos como média ± SD. \* $p \leq 0,01$  versus grupo PBS e # $p \leq 0,01$  versus grupo EGS (n=5).

#### 2.4.4 Efeito na migração de eosinófilos para a cavidade peritoneal induzida por EGS em animais com disrupção do gene da 5-lipoxigenase (5-LO)

Em condições inflamatórias, além das eotaxinas 1, 2 e 3 e a IL-5, outros mediadores como o leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) também participam do recrutamento de eosinófilos (CARLOS et al., 2011). Assim, verificamos o efeito da depleção dos leucotrienos na migração dos eosinófilos. Animais deficientes da enzima 5-LO (ALOX 5) e animais da linhagem selvagem 129 SvG foram inoculados intraperitonealmente com PBS ou EGS e o LCP foi coletado conforme descrito em Material e Métodos e nos itens anteriores.

A deficiência da enzima diminuiu significativamente a migração de células totais na cavidade peritoneal em resposta ao EGS nos animais ALOX 5 quando comparado ao grupo SvG ( $p \leq 0,01$ ) (Figura 5A). Entretanto, o EGS induziu migração de células para a cavidade peritoneal quando comparado ao grupo PBS ( $p \leq 0,01$ ). A deficiência da enzima 5-LO teve efeito sobre as células mononucleares e eosinófilos, que apresentaram tendência no aumento em relação aos seus controles, mas diminuíram em relação aos animais selvagens. Assim, a redução no número total de células refletiu na redução das células mononucleares e principalmente na redução da migração de 79,2% dos eosinófilos. O número de neutrófilos manteve-se sem diferença estatística entre os grupos e os tratamentos (Figura 5).



**Figura 5 - Papel dos metabólitos derivados da via da 5-LO no infiltrado inflamatório peritoneal de camundongos 129 ALOX 5 e SvG inoculados com PBS ou com o EGS do mosquito *A. aegypti*.** Camundongos 129 SvG e ALOX receberam inoculação intraperitoneal de EGS (5 µg/animal/dia, diluídos em 0,5 mL de PBS) por 5 dias consecutivos. Após 24 horas da última inoculação, o LCP foi coletado. (A) Células totais, (B) células mononucleares, (C) neutrófilos e (D) eosinófilos. Animais controles receberam PBS i.p. Resultado representativo expressos como média ± SD. \* $p \leq 0,01$  versus respectivo controle e # $p \leq 0,01$  versus o grupo 129 SvG (n=5).

## 2.5 DISCUSSÃO

Para entender os tipos celulares envolvidos nos estágios iniciais da resposta aos componentes salivares do mosquito *A. aegypti* que influenciam no desenvolvimento das respostas futuras, nós investigamos o recrutamento celular causado pelo EGS do mosquito na cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, bem como o papel da IL-5 e da 5-LO nesse recrutamento. Vários autores utilizaram o modelo de inflamação peritoneal para estudar a migração de leucócitos e os mediadores envolvidos nesta migração em resposta ao extrato ou lisado da glândula salivar do flebótomo *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010; MONTEIRO et al., 2005, 2007).

A inoculação intraperitoneal do EGS induziu uma resposta inflamatória local caracterizada influxo celular de células mononucleares e eosinófilos. Em circunstâncias normais, a migração de eosinófilos é regulada pela expressão constitutiva de eotaxina-1 (CCL11) (MISHRA et al., 1999). Em condições inflamatórias porém, a IL-5 coopera com as eotaxinas 1, 2 e 3 (CCL11, CCL24 e CCL26) no recrutamento de eosinófilos, embora outros mediadores como RANTES (CCL5), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), MIP-1 $\alpha$  (CCL3), LTB<sub>4</sub> e cisteinil leucotrienos também participem desse processo (CARLOS et al., 2011; CHAN et al., 1990; JOSE et al., 1994; ROTHENBERG; LUSTER; LEDER, 1995). Nossos resultados mostraram que este influxo de eosinófilos na cavidade peritoneal após a inoculação do EGS está associado ao aumento da produção da IL-5 observada no local. Assim, verificamos o efeito da neutralização da IL-5 com o anticorpo monoclonal TRFK-5 e confirmamos que o recrutamento de eosinófilos para a cavidade peritoneal dos animais que receberam EGS é significativamente diminuído após o pré-tratamento com esse anticorpo. Portanto, há fortes evidências da participação da IL-5 no recrutamento dos eosinófilos para a cavidade peritoneal no modelo utilizando o EGS do mosquito *A. aegypti*.

Já foi demonstrado que o EGS de *L. longipalpis* induz inflamação na cavidade peritoneal com intenso infiltrado de eosinófilos após 2 dias da inoculação, que persiste até o sétimo dia. No entanto, duas horas após a inoculação, os neutrófilos são as células que mais migram para a cavidade (MONTEIRO et al., 2007). O EGS desse flebótomo também é capaz de induzir migração de eosinófilos para cavidade peritoneal 48 horas após o desafio de animais sensibilizados com OVA, quando pré-

tratado com EGS 48 horas antes do desafio (MONTEIRO et al., 2005). O recrutamento específico da população de leucócito durante a resposta inflamatória é mediado por quimiocinas. Estudo com uma fração álcali-insolúvel da parede do fungo *Histoplasma capsulatum*, também demonstrou uma eosinofilia peritoneal aguda IL-5-dependente (SÁ-NUNES; MEDEIROS; FACCIOLI, 2004). McCracken et al. (2014) inocularam uma proteína presente na saliva do mosquito *A. aegypti* (aegyptin) na orelha de camundongos C57BL/6 IRF-3/7<sup>-/-</sup> e notaram o aumento na concentração da IL-5 no local, após 48 horas.

Os animais deficientes da enzima 5-LO apresentaram migração de eosinófilos inibida na cavidade peritoneal após inoculação do EGS. Isto mostra que mediador(es) lipídico(s) dependente(s) da via desta enzima está envolvido na migração dos eosinófilos para a cavidade. A partir destes resultados, seria interessante investigar se esta via está relacionada com o aumento da produção da IL-5 e/ou diretamente com a quimiotaxia dos eosinófilos, ou então se a IL-5 age sobre a 5-LO, aumentando sua expressão, conseqüentemente, aumentando a produção do(s) mediador(es) lipídico(s) quimioatraente(s) de eosinófilos, como sugerido por alguns autores (COWBURN et al., 2016; LUNA-GOMES; BOZZA; BANDEIRA-MELO, 2013).

Recentemente, Jablonka et al. (2016) mostraram que a saliva do triatomíneo *Rhodnius prolixus*, o vetor do patógeno *Trypanosoma cruzi*, contém uma proteína da família das lipocarpinas que sequestra cisteinil leucotrienos durante a alimentação para inibir a resposta inflamatória. De modo geral, na saliva dos mosquitos estão presentes proteínas da família D7 que também são capazes de se ligar a cisteinil leucotrienos e antagonizar a resposta inflamatória do hospedeiro (CALVO et al., 2009). Czarnetzki e Mertensmeier (1985) mostraram o papel LTB<sub>4</sub> na quimiotaxia de eosinófilos e neutrófilos na cavidade peritoneal em cobaias. Munoz et al. (1997) já haviam mostrado que a inibição seletiva da 5-LO e o bloqueio do receptor de LTB<sub>4</sub> inibem a migração de eosinófilos. Estudo com o EGS de *L. longipalpis* mostrou aumento na migração de macrófago e neutrófilo, bem como a produção de LTB<sub>4</sub> pelas células que migraram para peritônio após 3 e 6 horas da injeção (ARAÚJO-SANTOS et al., 2010).

No presente trabalho a resposta inflamatória ficou comprometida na ausência de leucotrienos devido a deficiência na enzima 5-LO, indicando que os leucotrienos participam da migração dos eosinófilos e de células mononucleares, mas não de neutrófilo, para a cavidade peritoneal em resposta ao EGS do mosquito *A. aegypti*. No

entanto, supomos que nas primeiras horas o neutrófilo, macrófagos e mastócitos tem um papel importante, participando na produção dos leucotrienos que induz a quimiotaxia dos primeiros eosinófilos, e depois, juntamente com a IL-5, intensifica esta migração fazendo com que após 24 horas, os eosinófilos sejam as principais células inflamatória nesse modelo.

Como a obtenção do EGS do mosquito *A. aegypti* não pode ser realizada em condições estéreis e existem evidências de que o LPS é capaz de induzir o acúmulo de eosinófilos em pele de cobaias *in vivo* (WEG et al., 1995), resolvemos investigar se a migração de eosinófilos observados em nosso modelo poderia ser causada pela contaminação do EGS com LPS. No entanto, nossos resultados mostram que o LPS, mesmo em uma concentração 10 vezes superior àquela encontrada no EGS, não foi capaz de induzir a migração do eosinófilo para a cavidade peritoneal em nossas condições. Assim, a inflamação eosinofílica no peritônio parece ter sido causada pela atividade dos componentes salivares do mosquito.

A saliva do mosquito *A. aegypti* contém fatores que podem afetar vários componentes do sistema imune e da homeostasia do hospedeiro. Dentre estes fatores estão: o inibidor do fator Xa que pode inibir a ativação do complemento e a migração do leucócito para o local da picada (STARK; JAMES, 1998); a apirase que inibe a agregação plaquetária (CHAMPAGNE et al., 1995); as sialocininas que são moléculas vasodiladoras (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994); as proteínas D7 que previnem a agregação plaquetária, vasoconstrição e dor (CALVO et al., 2006); a aegyptin que se liga ao colágeno e inibe a agregação plaquetária (CALVO et al., 2007) e a SAAG-4 que programa as células T para produzir IL-4 (BOPPANA et al., 2009). Além disso, recentemente foi demonstrado que o EGS de *A. aegypti* é capaz de matar linfócitos T *naïves*, mas não linfócitos T de memória (BIZZARRO et al., 2013). Dentre essas atividades biológica dos componentes salivares, nosso grupo já mostrou que camundongos sensibilizados pela picada de *A. aegypti* desenvolvem inflamação eosinofílica no pulmão após desafio intranasal com EGS do mosquito (BARROS et al., 2016). No presente trabalho mostramos, no modelo de inflamação peritoneal, que as proteínas salivares do mosquito *A. aegypti* são capazes de induzir uma inflamação eosinofílica aguda de forma dependente de sua estrutura e atividade biológica, uma vez que a desnaturação do EGS reduziu a migração de eosinófilos para o peritônio. Enfim, os resultados obtidos no modelo de inflamação peritoneal sugerem que a IL-5

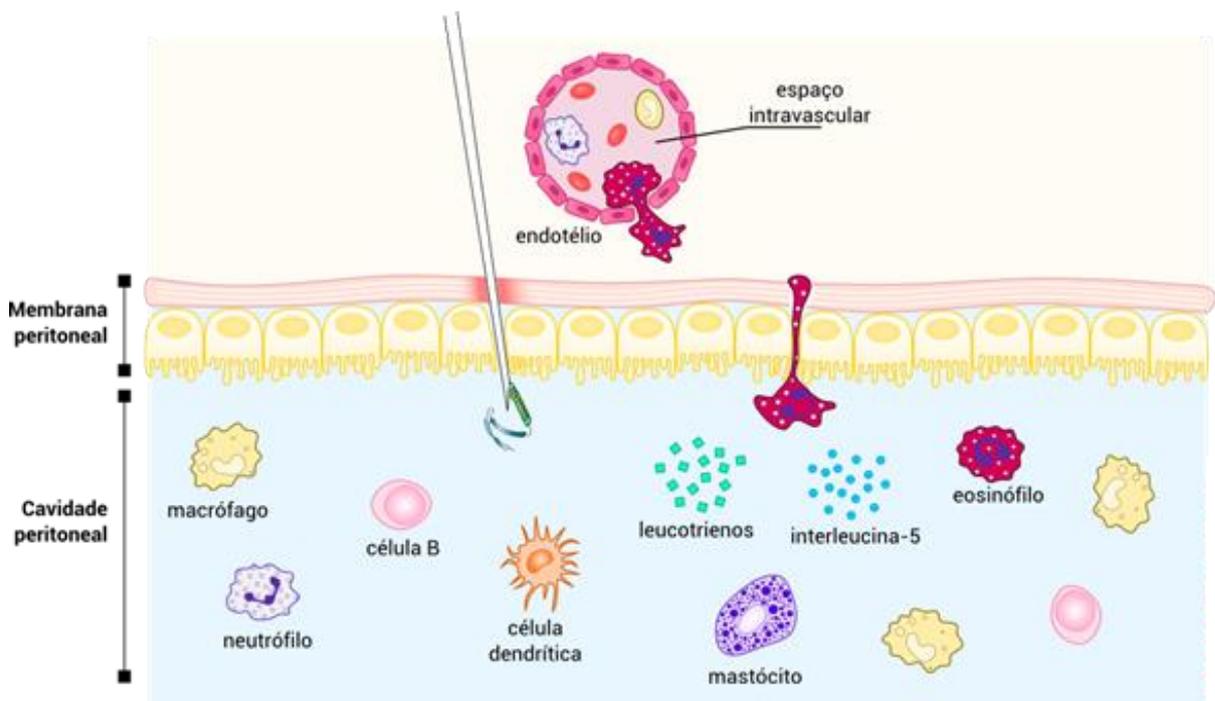
e o(s) produto(s) da 5-LO participam dessa inflamação eosinofílica aguda na cavidade peritoneal.

Estudos anteriores demonstraram que a picada do mosquito *A. aegypti* regula negativamente citocinas do padrão Th1 (IFN- $\gamma$ ) e regula positivamente citocinas do padrão Th2 (IL-4 e IL-10) nos esplenócitos de camundongos C3H/HeJ (ZEIDNER et al., 1999). Eosinófilos e citocinas do padrão Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13) foram detectadas no lavado broncoalveolar de camundongos sensibilizados pela picada do mosquito e desafiados intranasalmente com EGS (BARROS et al., 2016). E pelo menos uma proteína salivar (SAAG-4) já foi demonstrada como sendo capaz de induzir a produção de IL-4 por células T. O presente trabalho acrescenta mais uma peça nesse quebra-cabeça, mostrando que o EGS de *A. aegypti* é capaz de induzir a produção de IL-5, que juntamente com mediadores lipídicos derivados da 5-LO e provavelmente quimiocinas não avaliadas nesse trabalho, são capazes de induzir migração eosinofílica. Essa potencial capacidade dos componentes salivares de polarizar a resposta imune para o perfil Th2 poderá ser explorada em modelos de doenças inflamatórias de padrão Th1/Th17, como por exemplo doenças autoimunes. De fato, nosso grupo vem tratando com sucesso animais com encefalomielite autoimune experimental (Barros, tese em andamento) e com doença inflamatória intestinal (SALES-CAMPOS et al., 2015) e nosso trabalho pode gerar hipóteses sobre os mecanismos de ação do EGS nesses casos.

## 2.6 CONCLUSÕES

- O EGS de *A. aegypti* induz inflamação eosinofílica aguda no peritônio de camundongos.
- A presença de endotoxinas no EGS não afeta o fenótipo observado, que é dependente da integridade estrutural/funcional das proteínas presentes no extrato.
- A inoculação intraperitoneal de EGS induz a produção de IL-5.
- A inflamação eosinofílica é dependente de IL-5 e 5-LO.

A Figura 6 ilustra o cenário no peritônio 24 horas após a última inoculação intraperitoneal de EGS do mosquito *A. aegypti* por 5 dias consecutivos.



**Figura 6 - Representação esquemática do EGS do mosquito *A. aegypti* modulando a imunidade na cavidade peritoneal.** A inoculação intraperitoneal do EGS com estrutura tridimensional das proteínas preservada por 5 dias consecutivos é capaz de induzir a produção de IL-5 na cavidade peritoneal, a qual junto com os leucotrienos participa da migração de eosinófilos.

## REFERÊNCIAS\*

ACHARYA, K. R.; ACKERMAN, S. J. Eosinophil Granule Proteins: Form and Function. **J. Biol. Chem.**, v. 289, n. 25, p. 17406–17415, 2014.

ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E 2 production in murine macrophages. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 4, n. 11, p. e873, 2010.

BARROS, M. S. et al. Exposure to *Aedes aegypti* bites induces a mixed-type allergic response following salivary antigens challenge in mice. **PLoS One**, v. 11, n. 5, p. e0155454, 2016.

BEHM, C. A.; OVINGTON, K. S. The role of eosinophils in parasitic helminth infections: insights from genetically modified mice. **Parasitol. Today.**, v. 16, n. 5, 2000.

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

BLANCHAR, C.; ROTHENBERG, M. E. Biology of the eosinophil. **Adv. Immunol.**, v. 101, p. 81–121, 2009.

BOCHNER, B. S. Verdict in the case of therapies versus eosinophils: the jury is still out. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 113, n. 1, p. 3–10, 2004.

BOCHNER, B. S.; GLEICH, G. J. What targeting eosinophils has taught us about their role in diseases. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 126, n. 1, p. 16–25, 2010.

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

BRASIL, Decreto nº. 6.899, de 15 de julho de 2009. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 31 Out 2016.

BRASIL, Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais. Disponível em: <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2008/lei/l11794.htm)>. Acesso em: 31 Out 2016.

BROIDE, D.; SRIRAMARAO, P. Eosinophil trafficking to sites of allergic inflammation. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 163–172, 2001.

---

\* De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BROWN, S. J. *Rhipicephalus appendiculatus*: larval feeding sites in guinea pigs actively sensitized and receiving immune serum. **Exp. Parasitol.**, v. 55, n. 1, p. 111–120, 1983.

CALVO, E. et al. Function and evolution of a mosquito salivary protein family. **J. Biol. Chem.**, v. 281, n. 4, p. 1935–1942, 2006.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin 2beta1, and von willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 26928–26938, 2007.

CALVO, E. et al. Multifunctionality and mechanism of ligand binding in a mosquito antiinflammatory protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 106, n. 10, p. 3728–3733, 2009.

CAMPBELL, H. D. et al. Molecular cloning, nucleotide sequence, and expression of the gene encoding human eosinophil differentiation factor (interleukin 5). **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, n. 19, p. 6629–6633, 1987.

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

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.**, v. 92, n. 3, p. 694–698, 1995.

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

CHAN, C. C. et al. Eosinophil-eicosanoid interactions: inhibition of eosinophil chemotaxis in vivo by a LTD4-receptor antagonist. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 191, n. 3, p. 273–280, 1990.

CHEN, X. S. et al. Role of leukotrienes revealed by targeted disruption of the 5-lipoxygenase gene. **Nature**, v. 372, n. 6502, p. 179–182, 1994.

COLLIN, N. et al. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathog.**, v. 5, n. 5, p. e1000441, 2009.

COWBURN, A. S. et al. IL-5 increases expression of 5-Lipoxygenase-activating protein and translocates 5-Lipoxygenase to the nucleus in human blood eosinophils. **J. Immunol.**, v. 163, p. 456–465, 1999.

CRISP, H. C.; JOHNSON, K. S. Mosquito allergy. **Ann. Allergy. Asthma Immunol.**, v. 110, n. 2, p. 65–69, 2013.

CZARNETZKI, B. M.; MERTENSMEIER, R. *In vitro* and *in vivo* chemotaxis of guinea pig leukocytes toward Leucotriene B<sub>4</sub> and its w-oxidation products. **Prostaglandins**, v. 30, n. 1, p. 5–11, 1985.

DAUGHERTY, B. L. et al. Cloning, expression, and characterization of the human eosinophil eotaxin receptor. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 5, p. 2349–2354, 1996.

DENBURG, J. A. et al. Heterogeneity of human peripheral blood-type colonies: evidence for a common basophil-eosinophil progenitor. **Blood**, v. 66, n. 2, p. 312–318, 1985.

DOMBROWICZ, D.; CAPRON, M. Eosinophils, allergy and parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 13, n. 6, p. 716–720, 2001.

FACCIOLI, L. H.; MOKWA, V. F.; SILVA, C. L. Marrow to blood and tissues in a pig model of visceral larva migrans syndrome. **Mediators of Inflammation**, v. 31, p. 24–31, 1996.

GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445–454, 2008.

GLEICH, G. J.; LOEGERING, D. A. Immunobiology of eosinophils. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 3, p. 429–459, 1984.

HAMELMANN, E.; GELFAND, E. W. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma?. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 182–91, 2001.

HOGAN, S. P. et al. Eosinophils: biological properties and role in health and disease. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 38, n. 5, p. 709–750, 2008.

HORVATHOVA, M. Human eosinophils as potent inflammatory cells and their apoptosis. **Bratisl. Lek. Listy.**, v. 105, p. 359–361, 2004.

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

JOSE, P. J. et al. Eotaxin: a potent eosinophil chemoattractant cytokine detected in a guinea pig model of allergic airways inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 179, p. 881–887, 1994.

KARPPINEN, A. et al. Effect of cetirizine on the inflammatory cells in mosquito bites. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 26, n. 6, p. 703–709, 1996.

LEE, M.F. et al. The development of a murine model for *Forcipomyia taiwana* (biting midge) allergy. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e91871, 2014.

LEIFERMAN, K. M.; GLEICH, G. J. Hypereosinophilic syndrome: case presentation and update. **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 113, n. 1, p. 50–58, 2004.

LOPEZ, A. F. et al. Stimulation of proliferation, differentiation and function of human-cells by primate Interleukin-3. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 84, p. 2761–2765, 1987.

LUNA-GOMES, T.; BOZZA, P. T.; BANDEIRA-MELO, C. Eosinophil recruitment and activation : the role of lipid mediators. **Front. Pharmacol.**, v. 4, n. 24, p. 1–8, 2013.

MCCRACKEN, M. K. et al. *Aedes aegypti* salivary protein “ aegyptin ” co-inoculation modulates dengue virus infection in the vertebrate host. **Virology.**, v. 468, p. 133–139, 2014.

METCALF, B. D. et al. Biologic properties *in vitro* of a recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. **Blood**, v. 67, n. 1, p. 37–45, 1986.

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

MONTEIRO, M. C. et al. Effect of salivary gland extract of *Leishmania* vector, *Lutzomyia longipalpis* , on leukocyte migration in OVA-induced immune peritonitis. **Eur. J. Immunol.**, v. 35, n. 8, p. 2424–2433, 2005.

MONTEIRO, M. C. et al. Effect of *Lutzomyia longipalpis* salivary gland extracts on leukocyte migration induced by *Leishmania major*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 1, p. 88–94, 2007.

MUÑOZ, N. M. et al. Eosinophil chemotaxis inhibited by 5-Lipoxygenase blockade and leukotriene receptor antagonism. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.**, v. 155, p. 1398–1403, 1997.

OYOSHI, M. K. et al. Eosinophil-derived leukotriene C4 signals via type 2 cysteinyl leukotriene receptor to promote skin fibrosis in a mouse model of atopic dermatitis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 109, n. 13, p. 4992–4997, 2012.

PLATTS-MILLS, T. A E.; COMMINS, S. P. Emerging antigens involved in allergic responses. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 25, n. 6, p. 769–774, 2013.

PROVOST, V. et al. CCL26/eotaxin-3 is more effective to induce the migration of eosinophils of asthmatics than CCL11/eotaxin-1 and CCL24/eotaxin-2. **J. Leukoc. Biol.**, v. 94, n. 2, p. 213–222, 2013.

REUNALA, T.; BRUMMER-KORVENKONTIO, H.; PALOSUO, T. Are we really allergic to mosquito bites?. **Ann. Med.**, v. 26, n. 4, p. 301–306, 1994.

ROSENBERG, H. F.; DYER, K. D.; FOSTER, P. S. Eosinophils: changing perspectives in health and disease. **Nat. rev. Immunol.**, v. 13, n. 1, p. 9–22, 2012.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. **N. Engl. J Med.**, v. 338, n. 22, p. 1592–1600, 1998.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilic gastrointestinal disorders (EGID). **J. Allergy. Clin. Immunol.**, v. 113, n. 1, p. 11–28, 2004.

ROTHENBERG, M. E.; HOGAN, S. P. The Eosinophil. **Annu. ver. Immunol.**, v. 24, n. 1, p. 147–174, 2006.

ROTHENBERG, M. E.; LUSTER, A. D.; LEDER, P. Murine eotaxin: an eosinophil chemoattractant inducible in endothelial cells and in interleukin 4-induced tumor suppression. **Proc. Natl. Acad.**, v. 92, n. 19, p. 8960–8964, 1995.

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

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophil, and disease. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3101–9, 1992.

SÁ-NUNES, A.; MEDEIROS, A. I.; FACCIOLI, L. H. Interleukin-5 mediates peritoneal eosinophilia induced by the F1 cell wall fraction of *Histoplasma capsulatum*. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 37, n. 3, p. 343–346, 2004.

SEHMI, R. et al. Allergen-induced increases in IL-5 receptor  $\alpha$ -subunit expression on bone marrow-derived CD34<sup>+</sup> cells from asthmatic subjects. **J. Clin. Invest.**, v. 100, n. 10, p. 2466–2475, 1997.

SORICE, F.; SIMONE, C. D. E. Human eosinophil heterogeneity. **La Ricerca Clin. Lab.**, v. 16, p. 429–434, 1986.

SOUWER, Y. et al. IL-17 and IL-22 in atopic allergic disease. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 22, n. 6, p. 821–826, 2010.

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

STEINBACH, K. H. et al. Estimation of kinetic parameters of neutrophilic, eosinophilic, and basophilic granulocytes in human blood. **Blut**, v. 38, p. 27–38, 1979.

STRAUMANN, A.; SIMON, H. U. The physiological and pathophysiological roles of eosinophils in the gastrointestinal tract. **Allergy**, v. 59, n. 1, p. 15–25, 2004.

SYMON, B. F. A. et al. Eosinophil adhesion to nasal polyp endothelium is P-selectin-dependent. **J. Exp. Med.**, v. 180, n. 1, p. 371–376, 1994.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2005.

VENGE, P. Eosinophils and respiratory disease. **Resp. Med.**, v. 95, n. 3, p. 168–169, 2001.

WARREN, D. J.; MOORE, M. A. Synergism among interleukin 1, interleukin 3, and interleukin 5 in the production of eosinophils from primitive hemopoietic stem cells. **J. Immunol.**, v. 140, n. 1, p. 94–99, 1988.

WEG, V. B. et al. LPS-induced <sup>111</sup>In-eosinophil accumulation in guinea-pig skin: evidence for a role for TNF-alpha. **Immunology**, v. 84, n. 1, p. 36–40, 1995.

YAMAGUCHI, Y. et al. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **J. Exp. Med.**, v. 167, p. 43–56, 1988.

YU, C. et al. Targeted deletion of a high-affinity GATA-binding site in the GATA-1 promoter leads to selective loss of the eosinophil lineage *in vivo*. **J. Exp. Med.**, v. 195, n. 11, p. 1387–1395, 2002.

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

ZIMMERMANN, N. et al. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 2, p. 227–243, 2003.