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 Parcial 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

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.

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*.

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

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>. Acesso em: 6 Jan 2016.
- ALLERGOME. Latina: A Database of Allergenic Molecules, 2016. Disponível em: <http://www.allergome.com/script/dettaglio.php?id_molecule=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>. 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>. 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. Immunol.**, 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]carbonohydrazonoyl}phenoxy)acetamide downregulates TSLP through blocking of caspase-1/NF- κ 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, 1984²). 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 catiônicas 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

² 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⁺ 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 α (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 B₄ (LTB₄), os cisteinil-leucotrienos e prostaglandina D₂ 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 α , 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.

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>. 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>. 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 B₄ 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. rev. 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 α -subunit expression on bone marrow-derived CD34⁺ 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 ¹¹¹In-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.