CIRO NOVAES ROSA LINO

Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de Aedes aegypti

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
2013

CIRO NOVAES ROSA LINO

Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de Aedes aegypti

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 original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD)

São Paulo
2013

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

reprodução não autorizada pelo autor

Lino, Ciro Novaes Rosa.
Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de *Aedes aegypti* / Ciro Novaes Rosa Lino. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Imunomodulação por componentes salivares de artrópodes hematófagos.

Versão do título para o inglês: Characterization of the biological activity of *Aedes aegypti* salivary serpin AET-7393.

1. AET-7393 2. Serpina 3. *Aedes aegypti* 4. Hemostasia 5. IL-1β 6. Proteinase 3 I. Sá-Nunes, Prof. Dr. Anderson de II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0107/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Ciro Novaes Rosa Lino.

Título da Dissertação: Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de *Aedes aegypti*.

Orientador(a): Prof. Dr. Anderson de Sá-Nunes.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado,** em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

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

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

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

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

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

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

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **043** nas fls. **102** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) **Anderson de Sá Nunes**, Coordenador(a) da Linha de pesquisa *"Caracterização bioquímica e imunofuncional de uma serpina salivar do mosquito vetor aedes aegypti"* do qual participam o(s) alunos **Ciro Novaes Rosa Lina, Bruna Bizarro, Miclhele da Silva Barros, Natany Bissiato Fernandes da Silva,** 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 **17.05.2011, com validade de 3 anos**.

São Paulo, 23 de maio de 2011.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, meus pais Wilian e Rosa e minha irmã Lívia, meus grandes exemplos nessa vida. Obrigado pelo incentivo, carinho, dedicação e amor. À vocês, minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que fizeram parte, direta ou indiretamente, da realização deste trabalho e, em especial,

Ao meu orientador, Dr. Anderson de Sá Nunes, pela confiança ao abrir as portas de seu laboratório, pelo incentivo e pelos ensinamentos. Com certeza um exemplo de professor que terei como referência por toda minha carreira.

À minha família, meus pais Wilian e Rosa, e minha irmã Lívia, por acreditarem em mim, me apoiarem e serem sempre meu porto seguro. Sem vocês eu não estaria aqui.

Aos meus enormes amigos que mesmo distantes nunca me abandonaram: Letícia, Felipe e Victor, minha segunda família, Nilse (Denise), é tanto amor que às vezes até da vontade de amar de perto, e Helds, esse doido que me fez atravessar o mundo.

Ao meu companheiro Thiago, por sua amizade e apoio.

A todos do Laboratório de Imunologia Experimental: Bruna, Michele, Daniele, Anderson e Ceres, pela ajuda nos experimentos, pela amizade e por tornarem meu trabalho muito mais divertido.

Ao Dr. Eric Calvo e ao Dr. José Marcos Ribeiro do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health pela sua colaboração e material cedido.

Aos professores Dr. Marcelo Dias Baruffi, do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Dra. Aparecida Sadae Tanaka, do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Dr. Michalis Kotsyfakis, do Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Science of Czech Republic na República Checa, pela colaboração e apoio nos experimentos.

Aos professores da minha banca de qualificação, Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto, Dra. Ana Paula Lepique e Dr. Joilson de Oliveira Martins pela contribuição com discussões e sugestões.

À Profa. Dra. Margareth de Lara Capurro Guimarães do Departamento de Parasitologia do ICB/USP por manter seu laboratório sempre aberto, e por ceder os mosquitos *Aedes aegypti.*

Aos professores Dr. Momtchilo Russo e Dra. Sonia Jancar do Departamento de Imunologia do ICB/USP por compartilhar o espaço, materiais, reagentes e equipamentos de seus laboratórios.

Aos professores responsáveis pelas aulas ministradas que foram indispensáveis para o meu desenvolvimento.

À Jotelma, Amanda e principalmente à Eni, pela ajuda com as questões burocráticas relacionadas a este trabalho.

À técnica Sandra, por seu apoio na preparação de reagentes e manutenção do laboratório.

Ao CNPq e a FAPESP pelo apoio financeiro concedido.

"Uma pessoa comum maravilha-se com coisas incomuns; um sábio maravilha-se com o corriqueiro."

Confúcio (século IV A.C.)

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – Processo: 2011/15569-3) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Processo 147588/2011-1).

RESUMO

LINO, C. N. R. **Caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de *Aedes aegypti.*** 2013. 78 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Insetos são responsáveis pela transmissão de doenças infecciosas que acometem humanos e outros animais, incluindo a dengue, malária, leishmaniose e febre amarela, dentre outras. Para ultrapassar as barreiras impostas pelos hospedeiros vertebrados e conseguirem se alimentar, os mosquitos hematófagos apresentam componentes em sua saliva capazes de regular a hemostasia, conter a inflamação e modular a imunidade desses hospedeiros. Desde a década de 80 diversos estudos vem demonstrando a capacidade vasodilatadora e anticoagulante de componentes salivares do mosquito vetor da dengue *Aedes aegypti*. O estudo do conjunto de proteínas e RNA mensageiros presentes nas glândulas salivares desse inseto (salivoma) vem aumentando exponencialmente a descrição das moléculas que compõem esse coquetel salivar. Entretanto, a caracterização das atividades biológicas dessas moléculas no hospedeiro ainda carece de maiores estudos. Utilizando ferramentas de bioinformática, observamos a existência de uma família de serpinas, inibidores de serinoproteases, no salivoma de *Ae. aegypti*. No presente projeto, propomos caracterizar as atividades bioquímicas e imunofarmacológicas do produto do transcrito AET-7393, classificado como uma serpina e presente nas glândulas salivares das fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* somente. Iniciamos nosso trabalho avaliando a capacidade dessa serpina em interferir na hemostasia do hospedeiro. Animais inoculados tanto com a proteína recombinante (2 mg/kg) quanto com o plasmídeo contendo a sequência do gene da serpina (VR2001-Serpin) apresentaram aumento no sangramento. Porém, esses resultados aparentemente não estão ligados a uma interferência na cascata de coagulação (vias intrínseca ou extrínseca). Para tentarmos identificar os alvos dessa proteína nos elaboramos um painel bioquímico com diferentes serinoproteases e verificamos que de todas as enzimas testadas apenas a proteinase 3 (PR3) foi inibida pela AET-7393 recombinante de forma significativa. Como a PR3 está envolvida no processamento da pró-IL-1β, observamos que a AET-7393 interfere na produção dessa citocina, aumentando sua produção de maneira inversamente proporcional à concentração da serpina, por macrófagos coincubados com neutrófilos e estimulados com LPS. Testamos ainda as possíveis atividades biológicas da serpina em ensaios imunológicos, onde observamos ausência de capacidade moduladora sobre a ativação de macrófagos avaliada pela produção de óxido nítrico. Também não observamos diferença na inflamação *in vivo*, avaliada no modelo de edema induzido por carragenina, em animais inoculados com a serpina. Por fim, imunizamos os camundongos contra a serpina, quantificamos os níveis de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos contra ela e estimamos a concentração da proteína no extrato de glândula salivar (aproximadamente 1%). Porém, ao colocamos mosquitos para se alimentarem dos animais imunizados nenhuma alteração foi identificada na condição física do mosquito, observado pelos parâmetros de alimentação, fertilidade e fecundidade dos mesmos. Em conjunto nossos resultados mostram a capacidade da AET-7393 em interferir na fisiologia do hospedeiro de diferentes formas.

Palavras-chave: AET-7393. Serpina. *Aedes aegypti.* Proteinase 3. Hemostasia. IL-1β.

ABSTRACT

LINO, C. N. R. **Characterization of the biological activity of *Aedes aegypti* salivary serpin AET-7393.** 2013. 78 p. Masters thesis (Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Insects are responsible for the transmission of infectious diseases that affect humans and other animals, including dengue, malaria, leishmaniasis, and yellow fever, among others. To overcome the barriers imposed by vertebrate hosts and successfully feed, hematophagous mosquitoes possess salivary components capable of regulating hemostasis, inhibit the inflammation and modulate the host immunity. Since the 80's many studies have demonstrated the anticoagulant and vasodilator ability of salivary components of the Dengue's vector, *Aedes aegypti*. The study of proteins and Messenger RNAs present in the salivary gland of this insect (salivome) is exponentially increasing the description of the molecules from the salivary cocktail. However, the characterization of the biological activities of the salivary molecules in the host still needs further studies. By using bioinformatic tools, we have observed the existence of a family of serpins, serine protease inhibitors, in the *Ae. aegypti* salivome. In the present study, we intend to characterize the biochemical and immunopharmacological activities of the transcript AET-7393 product, present in the female *Ae. aegypti* saliva only, and classified as a serpin. We started our work evaluating the serpin's ability to interfere on the hemostasis of the host. Mice inoculated with the recombinant protein (2 mg/kg) or with the plasmid carrying the protein's gene (VR2001-Serpin) show increased bleeding. However, these results are not apparently due to the blockage of the coagulation cascade (intrinsic or extrinsic pathways). In an attempt to identify the serpin's target(s), we tested its activity in a serine protease panel and observed that only proteinase 3 (PR3) was significantly inhibited by the recombinant AET-7393. As this enzyme is related with the pro-IL-1β processing, we observed that the serpin interferes on IL-1β production, increasing iths production in inversely concentration-dependent manner, by macrophages co-cultured with neutrophils and stimulated with LPS. Our work also showed that the AET-7393 treatment had no effect in paw edema induced by carrageenan or nitric oxide produced by peritoneal macrophages. At last, we detected antibodies IgG1 and IgG2a, specific for the recombinant protein, in mice immunized with the VR2001-Serpin and then used this AET-7393 anti-serum to estimate the concentration of the sepin on the salivary gland extract of adult mosquitoes (approximately 1%). However, the presence of these antibodies did not affect either blood feeding of the mosquitoes or their fecundity. Together our results show in different ways the ability of the AET-7393 to interfere with the host's physiology.

Keywords: AET-7393. Serpin. *Aedes aegypti*. Proteinase 3. Hemostasis. IL-1β.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação. 21

Figura 2 - Comparação entre AET-7393 e a serpina inibidora de Fxa descrita por Stark e James (1998) 27

Figura 3 - Eletroforese dos plasmídeos "nu" (VR2001-Naked) e clonado com a serpina (VR2001-Serpin) digeridos ou não com BamHI em gel de agarose 1%. 42

Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e SDS 0,1%. 43

Figura 5 – Quantidade de hemoglobina perdida pela incisão na cauda dos camundongos induzida pela inoculação de heparina sódica. 45

Figura 6 - Quantidade de hemoglobina perdida pela incisão na cauda dos camundongos induzida pela inoculação de plasmídeo somente (VR2001-Naked) ou plasmídeo contendo o gene da serpina AET-7393 (VR2001-Serpin). 46

Figura 7 - Quantidade de hemoglobina perdida pela incisão na cauda dos camundongos induzida pela inoculação da serpina recombinante AET-7393. 47

Figura 8 – Tempo de coagulação *in vitro.* 48

Figura 9 - Produção de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes coincubados com neutrófilos peritoneais eliciados por tioglicolato. 52

Figura 10 - Concentração de IL-1β produzida por macrófagos peritoneais pré-incubados com diferentes concentrações de PR3. 53

Figura 11 - Atividade da serpina AET-7393 em edema de pata induzido por carragenina. 55

Figura 12 - Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais eliciados por tioglicolato na presença ou ausência da serpina. 56

Figura 13 - Concentração de anticorpos IgG1 e IgG2a presentes no soro dos animais imunizados com o somente o plasmídeo (VR2001-Naked) ou contendo a serpina clonada (VR2001-Serpin). 58

Figura 14 - Análise por Western blot de anticorpos presentes nos animais imunizados com o plasmídeo somente (VR2001-Naked) ou contendo a serpina clonada (VR2001-Serpin). 59

Figura 15 - Concentração de serpina AET-7393 presente no EGS. 61

Figura 16 - Avaliação da alimentação, fecundidade e fertilidade do mosquito após repasto sanguíneo de hospedeiro imunizado ou não com a serpina. 63

Figura 17 - Representação do efeito da serpina AET-7393 sobre a produção de IL-1β por PR3. 67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista de enzimas utilizadas nos ensaios de inibição. 34
Tabela 2 - Painel bioquímico da atividade inibitória da serpina AET-7393. 50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP - Adenosina difosfato (*adenosine diphosphate*)

ANCA - Anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (*anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*)

APTT - Tempo de tromboplastina parcial ativada (*activated partial thromboplastin time*)

ATP - Adenosina trifosfato (*adenosine triphosphate*)

CD4 - Grupo de diferenciação 4 (*cluster of differentiation 4*)

CEUA - Comissão de Ética no uso de Animais

D.O. – Densidade óptica

EGS - Extrato da glândula salivar

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

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

IFN-γ - Interferon-gama

Ig - Imunoglobulina

IL-1β, IL-4, IL-5, ... - Interleucina-1 β,... -4,... -5, ...

LPS - Lipopolissacarídeo

MASP - Serinoprotease associada a lectina ligante de manose (*mannose-associated serine protease*)

MHC - Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex*)

MPO - mieloperoxidase

NIAID - Instituto Nacional de Alergia e Doenças Infecciosas (*National Institute of Allergy and Infectious Diseases*)

NIH - Institutos Nacionais de Saúde dos Estados Unidos (*National Institutes of Health*)

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

PR3 – Proteinase 3

PT - Tempo de protrombina (*prothrombin time*)

RCL- Loop central reativo (*reactive center loop*)

SBCAL - Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SDS - Dodecil sulfato de sódio

Serpina – Inibidor de serinoprotease

SFB – Soro fetal bovino

TBE – Tris-borato-EDTA

TBS – Salina tamponada com Tris (Tris-buffered saline)

Th1 - Linfócitos T “helper” 1

Th2 - Linfócitos T “helper” 2

TMB - 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina

TNF-α - Fator de necrose tumoral-alfa

Tris – Tris-(hidroximetil)-aminometano

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 19
2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS 27
2.1 Objetivo geral 28
2.2 Objetivos específicos 28
3 MATERIAIS E MÉTODOS 29
3.1 Animais 29
3.2 Expressão e purificação da serpina 29
3.3 Extrato da glândula salivar (EGS) 31
3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE) 31
3.5 Eletroforese em gel de agarose 1% 31
3.6 Ensaio de sangramento 32
3.7 Avaliação da interferência da AET-7393 na cascata de coagulação 33
3.8 Inibição de serinoproteases pela AET-7393 33
3.9 Produção de IL-1β por macrófagos peritoneais coincubados com neutrófilos 34
3.10 Produção de IL-1β por macrófagos estimulados por PR3 35
3.11 ELISA para determinação de IL-1β 35
3.12 Influência da AET-7393 no edema de pata induzido por carragenina 36
3.13 Influência da AET-7393 na ativação de macrófagos 36
3.14 Imunização dos camundongos com plasmídeos 37
3.15 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a séricos 37
3.16 Estimativa da concentração de serpina AET-7393 presente no EGS de Ae. aegypti 38
3.17 Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose 39
3.18 Análise do repasto sanguíneo, fertilidade e fecundidade dos mosquitos 39
3.19 Análise estatística 40
4 RESULTADOS 41
4.1 Integridade dos plasmídeos e proteína recombinante 41
4.2 Ensaios de sangramento in vivo 44
4.3 Ensaios de coagulação in vitro 48
4.4 Ensaio de inibição de proteases 49
4.5 Interferência na produção de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes coincubados com neutrófilos peritoneais eliciados por tioglicolato na presença da serpina AET-7393 51
4.6 Edema de pata induzido por carragenina e ativação de macrófagos 54

4.7 Imunização dos camundongos com o plasmídeo contendo a serpina AET-7393 57

4.8 Quantificação da serpina AET-7393 presente no EGS 60

4.9 Interferência da imunização do hospedeiro no repasto sanguíneo, fecundidade e fertilidade do mosquito 62

5 DISCUSSÃO 64

6 CONCLUSÕES 69

REFERÊNCIAS* 70

1 INTRODUÇÃO

Mosquitos do gênero *Aedes* estão distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais de todo mundo. Sua espécie mais conhecida, *Aedes aegypti*, destaca-se por ter se adaptado a ambientes modificados pelo homem, preferindo se alimentar quase que exclusivamente de humanos. Como consequência, são responsáveis pela transmissão de diversas doenças, incluindo febre chikungunya, febre amarela, e dengue (PONLAWAT; HARRINGTON, 2005).

A febre chikungunya ocorre na África, Ásia e subcontinente indiano, tendo sido registrado o primeiro caso de transmissão na Europa em 2007. Essa doença apresenta sintomas muito semelhantes ao da dengue, podendo ser erroneamente diagnosticada nos países em que a dengue é comum (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2008). No caso da febre amarela, apesar de uma vacina efetiva já estar disponível desde 1937, ainda há focos reemergentes de transmissão tanto na África como na América do Sul (WEAVER; REISEN, 2010). A dengue ocorre em mais de 100 países da África, Américas, Ásia e Oriente Médio e estima-se que 40% da população mundial (2,5 bilhões de pessoas) habitam regiões onde há risco de transmissão da doença. Por ano ocorrem de 50 a 100 milhões de casos, sendo 500 mil casos de Dengue Hemorrágica ou Síndrome do Choque da Dengue, que apresenta uma taxa de mortalidade de 2,5% (podendo ultrapassar 20% se não for tratada adequadamente) (WORLD HEALTH ORGANIZATION., 2009). O Brasil está no topo da lista de casos reportados nas Américas (54.5%) e em sexto lugar se considerado a Dengue Hemorrágica (GUZMAN; ISTURIZ, 2010). Segundo a Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde, somente no período de janeiro a abril de 2012, foram registrados 286.011 casos de dengue com 74 óbitos. Até o presente momento não há outro modo de prevenção da doença que não envolva o combate ao mosquito transmissor. Além disso, o vírus da dengue representa um problema ainda maior pela falta de uma vacina ou um tratamento antiviral seguro e eficiente (ADELMAN; JASINSKIENE; JAMES, 2002; GUBLER, 2002; WEAVER; REISEN, 2010).

A dieta de sangue é necessária para que as fêmeas de mosquito obtenham os nutrientes necessários para o amadurecimento de seus ovários e produção de ovos (NAYAR; SAUERMAN, 1975), e é ao se alimentar que o mosquito injeta sua

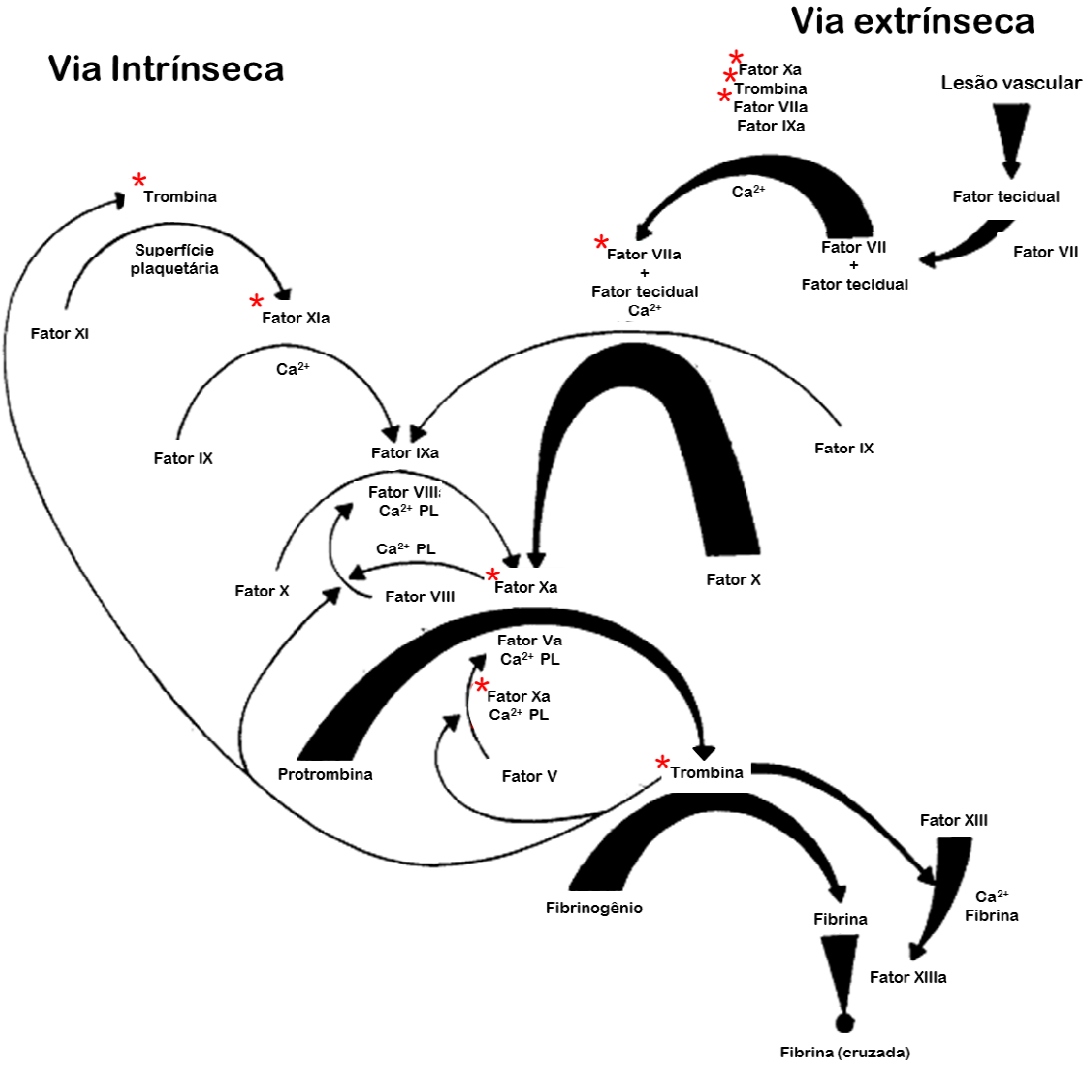
saliva, contendo o patógeno, no hospedeiro vertebrado, transmitindo doenças. Para se alimentar com sucesso, os mosquitos, assim como outros artrópodes hematófagos, enfrentam vários desafios. Dentre eles está um sistema complexo e redundante contra a perda de sangue do hospedeiro, chamado de hemostasia. Em segundos após o rompimento de vasos, plaquetas são ativadas, se agregam e produzem ou expõem substâncias vasoconstritoras e coagulantes. A cascata de coagulação, um importante mecanismo da hemostasia, é composta pelas vias intrínseca e extrínseca que geram a ativação de diferentes fatores de coagulação, mas que convergem na ativação do fator X em fator Xa (Figura 1).

O processo de coagulação se inicia pela via extrínseca, quando o fator tecidual, uma proteína transmembrana expressa principalmente nas células adjacentes aos vasos (DRAKE; MORRISSEY; EDGINGTON, 1989), entra em contato com o sangue após o rompimento do vaso. O fator tecidual atua como um receptor e cofator para o fator VII, facilitando sua conversão no fator VIIa (RAO; RAPAPORT, 1988). O complexo fator tecidual/fator VIIa por sua vez converte o fator X em fator Xa, que se liga ao fator Va clivando a protrombina e liberando trombina (TRACY; ROHRBACH; MANN, 1983). A trombina formada pelo fator tecidual, apesar de não ser suficiente para a formação de um coágulo, promove a máxima ativação das plaquetas (HUNG et al., 1992) possibilitando a ativação de outros fatores da coagulação em sua superfície, os fatores V, VIII e XI, dando início à via intrínseca (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; MONROE; HOFFMAN, 2009).

O fator IXa formado tanto pelo fator tecidual/fator VIIa (OSTERUD; RAPAPORT, 1977), quanto pelo fator XIa na superfície plaquetária, se junta ao fator VIIIa formando o complexo “tenase” (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; MONROE; HOFFMAN, 2009). Quando esse complexo “tenase” é formado na superfície da plaqueta ele converte o fator X em fator Xa em proporções bem maiores que na via extrínseca. Como descrito anteriormente o fator Xa irá se associar ou fator Va, mas dessa vez, gerando uma quantidade suficiente de trombina para formar um coágulo estável, através da clivagem do fibrinogênio em fibrina, permitindo que essas moléculas se polimerizem, formando um coágulo insolúvel (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; MONROE; HOFFMAN, 2009). A formação da fibrina também acelera a conversão do fator XIII em fator XIIIa pela trombina (LORAND; KONISHI, 1964). O fator XIIIa é responsável por criar ligações cruzadas entre os monômeros de fibrina,

além de incorporar outras proteínas, como a fibronectina, ao coágulo, deixando-o muito mais resistente (FOLK; FINLAYSON, 1977).

Figura 1 - Vias intrínseca e extrínseca da cascata de coagulação.



A via extrinseca está representada pelas setas grossas (lado direito do esquema) e a intrínseca pelas setas finas (lado esquerdo), ambas convergindo na formação do fator Xa. PL representa fosfolipídeo. As serinoproteases presentes na cascata estão destacadas com "*".

Fonte: Adaptado de Davie, Fujikawa e Kisiel (1991).

Grande parte dos fatores da cascata de coagulação são serinoproteases (Figura 1). Dessa forma, as serpinas (inibidores de serinoproteases) desempenham um papel importante no controle e regulação dessa cascata. Por exemplo, a antitrombina, um dos principais anticoagulantes encontrados no plasma é capaz de

inibir a atividade da trombina (ROSENBERG; DAMUS, 1973) e dos fatores IXa, Xa e XIa (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; OLSON et al., 2010). A antitrombina circula no sangue num estado “reprimido” de atividade, em que sua capacidade de inibição não é grande o suficiente para impedir a formação do coágulo no local da lesão, porém, quando em contato com heparina ou sulfato de heparano, sua interação com seus alvos são favorecidos, bloqueando-os de forma virtualmente instantânea e evitando a formação de qualquer coágulo. Esse estado “reprimido” permite que antitrombina mantenha uma baixa atividade até que o contrário seja necessário, prevenindo que o coágulo se forme em outros locais além do ferimento e/ou se propague descontroladamente (OLSON et al., 2010). De fato, a deficiência de antitrombina esta ligada ao aumento da predisposição à trombose (MACKIE et al., 1978), enquanto que a ausência total da serpina mostrou ser letal em camundongos ainda na fase fetal (ISHIGURO et al., 2000). Além da antitrombina, várias outras serpinas estão envolvidas no controle da coagulação, como o cofator II da heparina, que inibe trombina (TOLLEFSEN; MAJERUS; BLANK, 1982), a α2-macroglobulina, inibidor de trombina (CVIRN; GALLISTL; MUNTEAN, 2001), proteína Ca, inibidor dos fatores Va e VIIIa (MARLAR; KLEISS; GRIFFIN, 1982) e a α1-antitripsina, inibidora da proteína Ca (HEEB; GRIFFIN, 1988).

Para conseguir realizar seu repasto sanguíneo, os mosquitos desenvolveram mecanismos para bloquear essas respostas, liberando em sua saliva moléculas que podem ter efeito sobre a coagulação sanguínea, vasoconstrição e agregação plaquetária. De modo geral, a saliva de todos os artrópodes hematófagos já analisados até o momento contém pelo menos um anticoagulante, um antiplaquetário e um vasodilatador (RIBEIRO, 1987; SCHNEIDER; HIGGS, 2008). Visto a importância das serinoproteases na cascata de coagulação, não é surpresa que uma das serpinas presentes na saliva do *Ae. aegypti* tenha sido descrita como inibidor do fator Xa da coagulação (STARK; JAMES, 1998). Além disso, a saliva do *Ae. aegypti* apresenta várias outras moléculas identificadas como capazes de agir na hemostasia do hospedeiro. Uma enzima com atividade apirase, pertencente ao gene da família 5’-nucleotidase (CHAMPAGNE et al., 1995), hidrolisa ATP e ADP liberados por plaquetas e células lesadas (RIBEIRO et al., 1984). O ADP é um importante indutor de agregação plaquetária, enquanto o ATP induz migração de neutrófilos e sua desgranulação (RIBEIRO; MANS; ARCA, 2010). Outra proteína

presente na saliva de *Ae. aegypti*, pertencente à família das aegyptinas, impede a agregação plaquetária, interferindo na ligação do colágeno com três de seus principais ligantes: glicoproteína VI, integrina α2β1 e fator de von Willebrand (CALVO et al., 2007). A saliva dessa espécie apresenta ainda as sialocininas I e II, peptídeos pertencentes à família das taquicininas, para lidar com a vasoconstrição decorrente da ruptura do vaso sanguíneo (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994).

Além da hemostasia, o mosquito também deve lidar com o sistema imune do hospedeiro. Sua saliva, ao mesmo tempo em que apresenta componentes que auxiliam na obtenção de sangue, possui moléculas capazes de induzir reações inflamatórias no hospedeiro (HUDSON; BOWMAN; ORR, 1960). Uma resposta inflamatória inicial do hospedeiro pode induzir a desgranulação de mastócitos residentes da pele, cujos produtos de seus grânulos provocam coceira e edema no local impedindo a alimentação ou até mesmo levando a morte do mosquito (RIBEIRO; MANS; ARCA, 2010). Dessa forma espera-se que parte dos componentes presentes em sua saliva também tenha uma ação anti-inflamatória e imunomoduladora. De fato, o extrato da glândula salivar (EGS) de *Ae. aegypti* é capaz de suprimir a produção de IL-2 e IFN-γ, mas não tem efeito sobre a produção de IL-4 e IL-5 em culturas de esplenócitos murino. A proliferação dessas células também foi reduzida quando tratadas previamente com a EGS e estimuladas por concavalina A (CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004) e por lipopolissacarídeo (LPS) (WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). A inibição de citocinas tipo TH1 (IFN-γ) e o aumento do tipo TH2 (IL-4 e IL-10) também foram observados em esplenócitos de camundongos, dos quais os mosquitos se alimentaram, mantendo esse padrão de regulação por até sete dias (ZEIDNER et al., 1999). Uma versão mais curta da aegyptina (SAAG-4), presente na saliva do *Ae. aegypti* foi identificada como uma das responsáveis por essas alterações, sendo capaz de aumentar a expressão de IL-4 em células T $CD4^+$ murinas (BOPPANA et al., 2009). Dessa forma o mosquito pode contribuir para a transmissão de patógenos, liberando-os em um ambiente incapaz de responder efetivamente e conter a infecção (SCHNEIDER; HIGGS, 2008). Apesar de todo esse conhecimento sobre as propriedades da saliva de *Ae. aegypti*, pouquíssimos componentes responsáveis por esses efeitos imumoduladores foram determinados.

Como já mencionado, insetos hematófagos são responsáveis pela transmissão de diversas doenças infecciosas que acometem humanos e outros animais. Estudos comprovam a presença de componentes na saliva destes insetos que podem interferir nesta transmissão, beneficiando os patógenos (EDWARDS; HIGGS; BEATY, 1998; LIMESAND et al., 2003; SCHNEIDER et al., 2006; STYER; BERNARD; KRAMER, 2006; TITUS; RIBEIRO, 1990). De fato, a exposição de animais experimentais a saliva de mosquitos vetores aumenta a infectividade dos patógenos transmitidos (NUTTALL; LABUDA, 2004; SCHNEIDER; HIGGS, 2008; SCHNEIDER et al., 2007; SCHNEIDER et al., 2006; STYER; BERNARD; KRAMER, 2006; TITUS; RIBEIRO, 1988). Por outro lado, a imunização de hospedeiros contra componentes salivares dos diferentes mosquitos vetores é capaz de reduzir a transmissão das doenças causadas pelos mesmos (DONOVAN et al., 2007; GOMES et al., 2008; KAMHAWI et al., 2000). Nessa mesma linha, a imunidade do hospedeiro contra antígenos do mosquito apresenta um efeito negativo sobre seu ciclo de vida (SUTHERLAND; EWEN, 1974). Dessa forma, entender os efeitos da saliva do mosquito sobre o hospedeiro é o primeiro passo para elucidar os mecanismos de transmissão dos patógenos, bem como poderá contribuir com o desenvolvimento de estratégias de combate à doença e/ou ao mosquito.

O primeiro catálogo dos RNAs mensageiros e proteínas expressas na glândula salivar de *Ae. aegypti* (salivoma) foi produzido em 2002 e atualizado alguns anos depois em 2007 (RIBEIRO et al., 2007; VALENZUELA et al., 2002). Esses trabalhos identificaram o produto de três genes que codificam serpinas salivares, que não estão localizadas próximas umas às outras no genoma de *Ae. aegypti*. Somente o produto de um desses genes foi caracterizado até momento, o inibidor do fator Xa, já descrito anteriormente (STARK; JAMES, 1998). A família das serpinas é composta por um grande número de glicoproteínas homólogas presentes em todos os reinos. A maioria delas atua como inibidores de serinoproteases, embora algumas também sejam capazes de inibir outras classes de proteases, ou ainda não apresente nenhum tipo de inibição, agindo em outros processos biológicos como regulação da pressão sanguínea, transporte de hormônios e angiogênese (GETTINS, 2002). As serpinas são caracterizadas por sua estrutura terciaria bem conservada, apresentando nove α-hélices e três β-folhas. A região mais importante para sua atividade inibitória é o loop central reativo (RCL), cuja sequência se

assemelha ao substrato natural da enzima inativada, que o cliva entre os resíduos P1 (porção N-terminal do evento de clivagem) e P1' (porção C-terminal do evento de clivagem). A clivagem do RCL pode levar a alterações conformacionais na serpina prendendo tanto ela quanto a protease em um complexo inativo ligado covalentemente. Seguindo outra via a serpina também pode atuar como um verdadeiro substrato, sendo clivada pela protease, que mantém sua atividade, enquanto a serpina é inativada (BOTS; MEDEMA, 2008; GETTINS, 2002; MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008). Entretanto, pouco se sabe quanto às atividades biológicas das serpinas salivares de mosquitos vetores.

As serinoproteases, principais alvos bioquímicos das serpinas, representam a maior família de proteases conhecidas, com aproximadamente 200 membros conhecidos em humanos. Elas estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos, entre eles, vários relacionados à imunidade, como inflamação, remodelagem do tecido, eliminação de patógenos e apoptose. O excesso dessas enzimas podem ainda contribuir com doenças autoimunes, alergias e metástase de tumores. Dessa forma não é de se surpreender que essa atividade seja finamente regulada por diversos mecanismos, como, por exemplo, inibição pelas serpinas, impedindo uma proteólise descontrolada (BOTS; MEDEMA, 2008; HEUTINCK et al., 2010; MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008). Por exemplo, a serpina A1 (α1-antitripisina) é um potente inibidor extracelular da elastase produzida por neutrófilos (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). Essa elastase está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos sendo liberada para o tecido quando a célula encontra um objeto a ser fagocitado ou após morrer por autofagia, e apesar dela ter um importante papel no combate a infecções, seu excesso pode levar a lesão tecidual e a diversas doenças (JANOFF, 1985). A serpina A1 é produzida no fígado e é encontrada em grandes concentrações principalmente nos pulmões durante uma infecção, onde previne que o tecido seja lesado pela elastase, evitando a doença pulmonar obstrutiva crônica, estando associada também a doenças no fígado e inflamações crônicas (MULGREW; TAGGART; MCELVANEY, 2007). A serpina A1 também inibe algumas quimases do sistema imune, incluindo a catepsina G e quimases presentes em mastócitos, embora esses não sejam seus alvos principais (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). A catepsina G tem um importante papel na eliminação de patógenos, degradação da matriz extracelular e regulação de

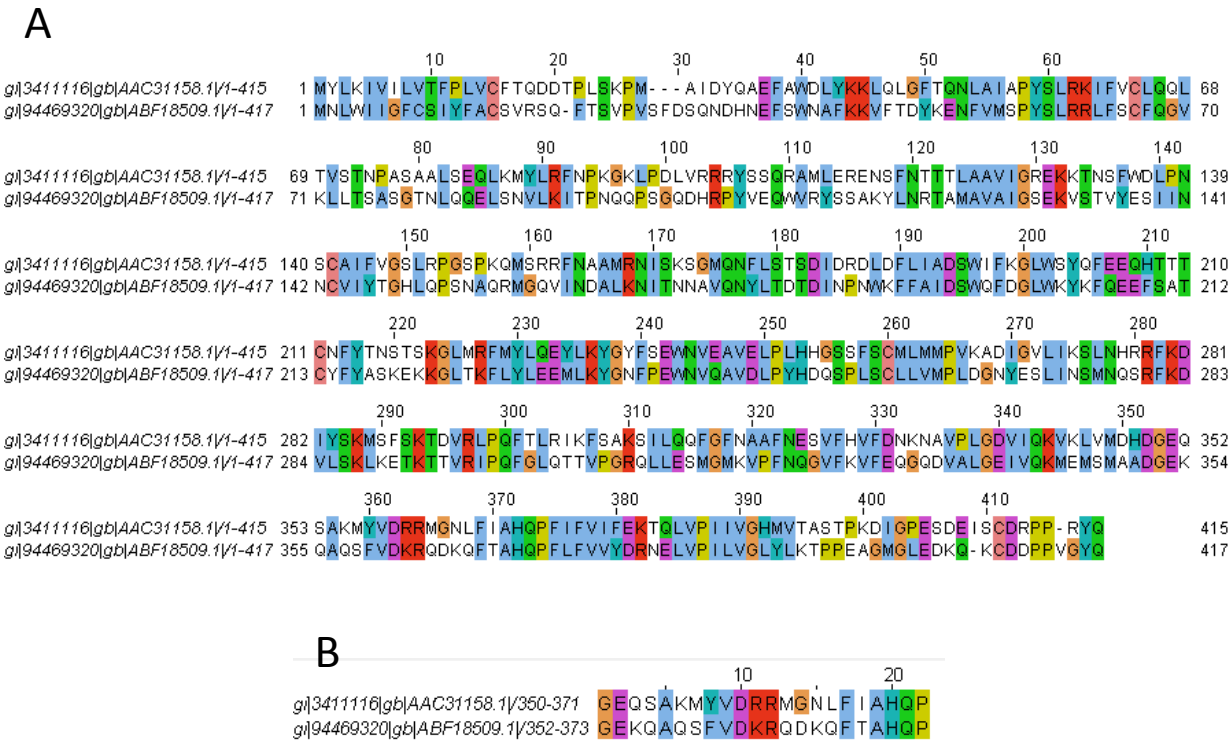
respostas inflamatórias como ativação do TNF-α, inibição de adesão e migração celular e clivagem de antígenos que serão apresentados via MHC II. As quimases de mastócitos também têm um papel na eliminação de patógenos e degradação da matriz extracelular, além de promover vasoconstrição e ativar citocinas pró-inflamatórias (HEUTINCK et al., 2010). O principal inibidor dessas proteínas é outra serpina, a serpina A3 (α1-antiquimiotripsina) (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). Assim como a A1 ela é produzida no fígado e encontrada em maior quantidade nos pulmões, prevenindo a degradação da matriz extracelular durante processos inflamatórios, estando envolvida em enfermidades como doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças neurodegenerativas (MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008).

Outra serpina encontrada no plasma relacionada à imunidade é a G1 (inibidora de C1), ela é responsável por inativar varias proteínas diferentes, como C1r, C1s e MASPs do sistema complemento, fator XI e trombina do sistema de coagulação, tPA e plasmina do sistema fibrinolítico, entre outras. Ela ainda pode ter uma ação anti-inflamatória independente de sua atividade inibitória ao se ligar ao LPS, impedindo que ele ative células como macrófagos, ou se ligando à E-selectina, se acumulando no local da inflamação e limitando a migração de leucócitos. Ela também está envolvida em várias doenças como angioedema hereditário, choque séptico, síndrome do extravasamento capilar e pancreatite (CICARDI et al., 2005). Existem ainda várias outras serpinas intracelulares como a B1 (inibe elastase de neutrofilos e catepsina G), B6 (inibe catepsina G) e B9 (inibe granzima B), presentes em células do sistema imune, que as protegem das proteases presentes em seus próprios grânulos (MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008).

2 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS

Conhecendo a importância das serinoproteases em diferentes processos fisiológicos e imunológicos e o papel das serpinas na regulação desses mesmos processos, pretendemos no presente projeto realizar a caracterização da atividade biológica da serpina salivar de *Ae. aegypti* AET-7393. Essa serpina foi descrita no salivoma do mosquito e está presente somente nas glândulas salivares das fêmeas da espécie (RIBEIRO et al., 2007). Além disso, a serpina AET-7393 apresenta apenas 37,05% de homologia com uma serpina já descrita na saliva de *Ae. aegypti*, e 50% se compararmos somente seus RCLs (Figura 2). Dessa forma, acreditamos que ela possua alguma atividade biológica na interação mosquito-hospedeiro vertebrado.

Figura 2 – Sequências da serpina AET-7393 e a serpina inibidora de Fxa descrita por Stark e James (1998)



(A) Alinhamento Clustal das sequências completas. (B) Alinhamento Clustal de seus respectivos RCLs. gi|3411116|gb|AAC31158.1 (Serpina descrita por Stark e James), gi|94469320|gb|ABF18509.1 (AET-7393).

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é realizar a caracterização da atividade biológica da serpina salivar AET-7393 de *Aedes aegypti* no hospedeiro vertebrado.

2.2 Objetivos específicos

Avaliar seu potencial papel anticoagulante;
Caracterizar seus possíveis alvos enzimáticos;
Avaliar sua atividade anti-inflamatória;
Avaliar seu efeito na ativação e função de macrófagos;
Avaliar seu potencial de interferir no ciclo de vida do mosquito.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas das linhagens BALB/c, entre 6 e 16 semanas de idade, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos do Departamento de Imunologia ICB/USP e mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia com água e alimento à vontade. O delineamento experimental deste subprojeto se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL), sendo seu protocolo aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, e registrado sob o nº 91, folha 73, livro 02.

3.2 Expressão e purificação da serpina

A serpina AET-7393 foi escolhida por meio de ferramentas de bioinformática a partir do salivoma de *Ae. aegypti* (RIBEIRO et al., 2007). A planilha com o salivoma completo do *Ae. aegypti* pode ser obtida no website:

http://exon.niaid.nih.gov/transcriptome/Ae_aegypti_sialome_2006/Sup_table_2/Ae-Sup-table2.xls

Dessa planilha, as sequências de proteínas e nucleotídeos podem ser obtidas facilmente, bem como diversas outras comparações, como o alinhamento com sequências próximas em diferentes bases de dados.

A serpina AET-7393 foi produzida em um sistema de expressão que usa células de mamíferos e que foi terceirizada. A empresa GenScript foi escolhida para realizar a síntese do gene da serpina e cloná-la no plasmídeo VR2001, gentilmente cedido pelo Dr. Eric Calvo do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIAID/NIH). A sequência encomendada, incluindo otimização dos códons, uma cauda de histidina (para fins de purificação da proteína) e o sítio de restrição para a enzima BamHI (usada para clonagem no plasmídeo), é apresentada a seguir:

AeSERP(DQ440476)

GGATCCCAGTTCACCAGCGTGCCCGTGAGCTTCGACAGCCAGAACGACC
ACAACGAGTTCAGCTGGAACGCCTTCAAGAAGGTGTTCACCGACTACAAGGAGA
ACTTCGTGATGAGCCCCTACAGCCTGCGCCGCCTGTTCAGCTGCTTCCAGGGC
GTGAAGCTGCTGACCAGCGCCAGCGGCACCAACCTGCAGCAGGAGCTGAGCA
ACGTGCTGAAGATCACCCCCAACCAGCAGCCCAGCGGCCAGGACCACCGCCC
CTACGTGGAGCAGTGGGTGCGCTACAGCAGCGCCAAGTACCTGAACCGCACCG
CCATGGCCGTGGCCATCGGCAGCGAGAAGGTGAGCACCGTGTACGAGAGCAT
CATCAACAACTGCGTGATCTACACCGGCCACCTGCAGCCCAGCAACGCCCAGC
GCATGGGCCAGGTGATCAACGACGCCCTGAAGAACATCACCAACAACGCCGTG
CAGAACTACCTGACCGACACCGACATCAACCCCAACTGGAAGTTCTTCGCCATC
GACAGCTGGCAGTTCGACGGCCTGTGGAAGTACAAGTTCCAGGAGGAGTTCAG
CGCCACCTGCTACTTCTACGCCAGCAAGGAGAAGAAGGGCCTGACCAAGTTCC
TGTACCTGGAGGAGATGCTGAAGTACGGCAACTTCCCCGAGTGGAACGTGCAG
GCCGTGGACCTGCCCTACCACGACCAGAGCCCCCTGAGCTGCCTGCTGGTGAT
GCCCCTGGACGGCAACTACGAGAGCCTGATCAACAGCATGAACCAGAGCCGCT
TCAAGGACGTGCTGAGCAAGCTGAAGGAGACCAAGACCACCGTGCGCATCCCC
CAGTTCGGCCTGCAGACCACCGTGCCCGGCCGCCAGCTGCTGGAGAGCATGG
GCATGAAGGTGCCCTTCAACCAGGGCGTGTTCAAGGTGTTCGAGCAGGGCCAG
GACGTGGCCCTGGGCGAGATCGTGCAGAAGATGGAGATGAGCATGGCCGCCG
ACGGCGAGAAGCAGGCCCAGAGCTTCGTGGACAAGCGCCAGGACAAGCAGTT
CACCGCCCACCAGCCCTTCCTGTTCGTGGTGTACGACCGCAACGAGCTGGTGC
CCATCCTGGTGGGCCTGTACCTGAAGACCCCCCCCGAGGCCGGCATGGGCCT
GGAGGACAAGCAGAAGTGCGACGACCCCCCCGTGGGCTACCAGCACCACCAC
CACCACCACTAAGGATCC

3.3 Extrato da glândula salivar (EGS)

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

Os tubos contendo as glândulas salivares foram sonicados para liberação do material solúvel e centrifugados a 14.000 *g* por 10 minutos para remover o material particulado. O sobrenadante resultante, referido como extrato da glândula salivar (EGS), foi reunido e esterilizado por passagem através de um filtro contendo uma membrana de nitrocelulose com poros de 0,2 µm Millex (Millipore, Carrigtwohill, County Cork, Irlanda). A concentração protéica foi determinada em NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e alíquotas foram armazenadas a -80 ºC até o momento de uso.

3.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% contendo SDS (SDS-PAGE)

Foi preparado um gel de acrilamida 12% e SDS 0,1%, polimerizado em placas de vidro do sistema de mini-gel da Bio-Rad (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A serpina AET-7393 (5 µg) foi solubilizada em tampão de amostra (Tris 62 mM; DTT 50 mM; SDS 0,2%; glicerol 10%; azul de bromofenol 0,01%), aquecido por 5 minutos a 98 °C e aplicado no gel. A eletroforese foi realizada aplicando-se a voltagem constante de 100 v. Finalizada a eletroforese, as proteínas foram coradas com Coomassie blue R-250 (Bio-Rad) a 0,2% (p/v) dissolvido em etanol, ácido acético, água (45:10:45, v/v/v) por aproximadamente 1h e descoradas com uma solução de etanol, ácido acético, água (23:7:70, v/v/v). Foi utilizado o padrão de massa molecular SeeBlue® Plus (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) composto por proteínas de tamanhos que variam de 6 a 188 kD ou Kaleidoscope (Bio-Rad) com proteínas de 10 a 250 kD.

3.5 Eletroforese em gel de agarose 1%

Foi preparado um gel de agarose 1%, polimerizado em placas de vidro do sistema de mini-gel da Bio-Rad. Amostras de plasmídeos (2,5 µg) “nu” (VR2001-Naked) e clonado com a serpina (VR2001-Serpin) digeridos ou não com BamHI foram solubilizada em tampão TBE 1x (90 mM Tris, 90 mM ácido bórico e 2 mM EDTA) aquecido por 1 hora a 37 °C e aplicado no gel. A eletroforese foi realizada aplicando-se a voltagem constante de 80 v. Finalizada a eletroforese, o material genético foi corado com brometo de etídeo. Foi utilizado o padrão de massa molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen)

3.6 Ensaio de sangramento

Para a padronização do ensaio de sangramento, camundongos previamente anestesiados com acepromazina (0,1 mg/kg – Rhobifarma, Hortolândia, SP, Brasil) e xilazina (0,8 mg/kg - Rhobifarma), receberam heparina sódica (1 ou 5 µg/Kg - Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, EUA), ou solução salina (NaCl 0,9%) i.v. pelo plexo retro-orbital em um volume de 100 µL. Em seguida, a ponta da cauda, com 1,5 mm de diâmetro, foi amputada, sendo então imersa em um tubo de 12 × 75 mm contendo 3 mL de água destilada e mantido a 37 °C por um sistema de placa quente. As caudas foram mantidas mergulhadas nos tubos por 30 minutos, com agitação dos tubos a cada 5 minutos. Após esse período, os animais foram devolvidos aos seus microisoladores e observados por pelo menos 3 horas para garantir sua completa recuperação da anestesia. As amostras foram homogeneizadas e submetidas a diluições seriadas em água destilada em placas de 96 poços de fundo chato e a densidade óptica avaliada a 540 nm para estimar a quantidade de hemoglobina presente.

Em outros testes, os camundongos foram inoculados em cada músculo quadríceps com 40 µg de plasmídeo “nu” apenas (VR2001-Naked) ou plasmídeo contendo o gene da serpina clonado (VR2001-Serpin) diluídos em 100 µL de salina contendo 50% de sacarose. O ensaio de sangramento foi realizado no 1º, 3º e 10º dias após a inoculação como descrito no parágrafo anterior.

Ensaios de sangramento foram realizados também em animais que receberam a serpina recombinante para confirmar os dados encontrados com os plasmídeos. Os camundongos foram inoculados, pela veia caudal, com 200 µL de

PBS apenas ou a serpina AET-7393 diluída em PBS, nas doses de 0,1; 1 ou 2 mg/kg do animal. Após aproximadamente uma hora os camundongos foram anestesiados e os ensaios de sangramento realizados como descrito anteriormente.

3.7 Avaliação da interferência da AET-7393 na coagulação sanguínea

Para quantificação do Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), que avalia a via intrínseca da coagulação, 25 µL de plasma separado do sangue de camundongos, retirados por punção cardíaca ,na presença de citrato de sódio 3,2% (1:10), foram incubados por 15 minutos com 25 µL de tampão (Tris 50 mM e 150 mM NaCl, pH 7,4), um controle para garantir que a solução onde a serpina estava diluída não iria interferir nos resultados, 25 µL de uma solução de serpina (11, 22, 44 ou 88 mM) ou heparina sódica (40 µg/mL) diluídas no mesmo tampão. Após esse período, 25 µL do reagente de APTT (cefalina com ácido elágico como ativador particulado – Weiner Laboratórios, Rosario, Santa Fe, Argentina) foi adicionado e incubado por 3 minutos a 37 °C, seguido pela adição de mais 25 µL de $CaCl_2$ pré-aquecido. O tempo de coagulação foi então determinado em coagulômetro (Start 4, Stago, Parsippany, NJ, USA).

Para calcular o Tempo de Protrombina (PT), que avalia a via extrínseca da coagulação, 25 µL de plasma, separado do sangue de camundongos na presença de citrato de sódio 3,2% (1:10), foram incubados com tampão, serpina ou heparina sódica nas mesmas condições descritas acima. Após a incubação, 50 µL do reagente de PT (Tromboplastina de cérebro de coelho, $CaCl_2$ para concentração final de 0,0125 mol/L e NaCl para concentração final de 0,1 mol/L - Weiner Laboratórios) foi adicionado e o tempo de coagulação mensurado em coagulômetro.

3.8 Inibição de proteases pela AET-7393

A atividade de inibição da AET-7393 para várias proteases foi obtida pela medição da perda da atividade enzimática na presença de seu substrato cromogênico adicionado em excesso. As enzimas testadas encontram-se listadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Lista de enzimas utilizadas nos ensaios de inibição.

Enzima	Enzima (concentração nM)
calicreína	0,04
β-triptase	0,009
uPA	0,125
fator Xa	0,33
matriptase	0,03
elastase	0,18
α-quimiotripsina	0,025
quimase	0,45
fator XIIa	0,1
plasmina	0,8
trombina	0,01
tPA	0,024
catepsina G	6,6
fator XIa	0,1
proteinase 3	11
tripsina	21,4
triptase	0,37

Serinoproteases e suas respectivas concentrações finais, utilizadas para o ensaio de inibição da atividade pela presença da AET-7393.

As enzimas, presentes em tampão (Tris/HCl 0,1 M, pH 8,0 contendo NaCl 0,15 M e triton X-100 0,1%) foram pré-incubadas com serpina (540 nM) em tampão (Tris 50 mM e 150 mM NaCl, pH 7,4) por 10 minutos a 37 ^{o}C e, em seguida, foram adicionados seus respectivos substratos (concentração final de 0,25 mM). A incubação prosseguiu até o aparecimento de cor, quando foi feita a leitura de absorbância a 405 nm.

3.9 Produção de IL-1β por macrófagos peritoneais coincubados com neutrófilos

Para obtenção de macrófagos peritoneais residentes, o lavado da cavidade peritoneal foi coletado e uma suspensão contendo 1,5 x 10^6 células/mL preparada.

Alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 2 horas. As células não aderentes foram removidas por 3 lavagens com meio aquecido e ressuspendidas no volume inicial. As células aderentes foram pré-incubadas com LPS (1 μg/mL -InvivoGen, San Diego, CA, EUA) por 4 horas. Após esse período as células do lavado periotenal, rico em neutrófilos, retirado após 12 horas da injeção intraperitoneal de 1 mL de solução de tioglicolato 3% (Difco Laboratories, Detroit, MI, EUA) foram adicionadas a cultura (100 μL de uma solução contendo 6 x 10^6 células/mL) juntamente com diferentes concentrações da serpina AET-7393 (1, 5, 10 e 50 μM). Após mais duas horas de incubação o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1β determinada por ELISA.

3.10 Produção de IL-1β por macrófagos estimulados por PR3

Para obtenção de macrófagos peritoneais residentes, o lavado da cavidade peritoneal foi coletado e uma suspensão contendo 1,5 x 10^6 células/mL preparada. Alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 2 horas. As células não aderentes foram removidas por 3 lavagens com meio aquecido e ressuspendidas no volume inicial. As células aderentes foram incubadas com diferentes concentrações de PR3 (3,5; 17,5; 35; 175 μM – Elastin Products, Owensville, Missouri, EUA) por 15 minutos e então estimuladas com LPS (100 ng/mL) por 4 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado e a concentração da IL-1β dosada por ELISA.

3.11 ELISA para determinação de IL-1β

Para a dosagem da citocina IL-1β presente no sobrenadante dos macrófagos coincubados com neutrófilos ou estimulados com PR3 foi utilizado o “BD OptEIA ELISA Set” (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços foram incubadas com anticorpo de captura diluído em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 (100 μL/poço). Após incubação overnight a 4 °C, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS/Tween 0,05% (300 μL/poço) e, em seguida, bloqueadas com 200 μL/poço de PBS/SFB 10% por 1 h à temperatura ambiente. Após nova lavagem, as amostras do

sobrenadante e a curva padrão da citocina foi adicionada (100 μL/poço) e a placa incubada por 2 horas à temperatura ambiente. Após ciclo de 5 lavagens, foi adicionado 100 µL/poço de solução de detecção (anticorpo secundário biotinilado) diluída em PBS/SFB 10% e a placa foi incubada à temperatura ambiente por 1 h. Após 5 lavagens foram adicionados 100 µL/poço de estreptoavidina conjugada com peroxidase e incubados por 20 minutos à temperatura ambiente. Após 7 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço da solução substrato 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina (TMB) seguida por incubação por no máximo 30 minutos à temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação foram adicionados 50 µL/poço de $H3PO_4$ 1 M e a leitura da placa foi feita a 450 nm em espectrofotômetro (SpectraMax 190, Molecular Device, Sunnyvale, CA, EUA). A concentração da citocina presente nas amostras foi calculada com base na curva padrão.

3.12 Influência da serpina AET-7393 no edema de pata induzido por carragenina

Para testar o possível efeito da serpina AET-7393 em um modelo de inflamação *in vivo*, camundongos foram inoculados i.v. com a serpina recombinante (2 mg/kg) ou somente PBS (100 μL) e receberam 30 μL de uma solução de carragenina 1% em PBS no coxim plantar da pata traseira esquerda e 30 μL de PBS apenas na pata traseira direita. A espessura da pata foi avaliada com um paquímetro para patas após 4, 24 e 48 horas da inoculação. O edema foi expresso como o resultado da subtração da espessura da pata antes da inoculação e após os tempos indicados.

3.13 Efeito da serpina AET-7393 na ativação de macrófagos

Camundongos receberam intraperitonealmente 1 mL de solução de tioglicolato 3% para recrutamento de macrófagos. Após 4 dias, o lavado da cavidade peritoneal foi coletado e uma suspensão contendo 1,5 x 10^6 células/mL preparada. Alíquotas de 100 μL dessa suspensão foram adicionadas em placas de 96 poços e incubadas a 37 °C por 2 horas. As células não aderentes foram removidas por 3

lavagens com meio aquecido e ressuspendidas no volume inicial. As células aderentes foram pré-incubadas com meio, na ausência e presença da serpina em diversas concentrações, por 30 minutos, e então ativadas com IFN-γ (5 ng/mL – Sigma Aldrich) e LPS ultra puro (5 ng/mL). Após 48 h, a quantidade de nitrito nos sobrenadantes de cultura foi determinada pela reação de Griess como um parâmetro indireto da produção de óxido nítrico por essas células. A concentração de nitrito foi determinada em placas de 96 poços, pela mistura de 100 μL do sobrenadante de cultura dos macrófagos e 100 μL de uma solução v/v contendo NEED 0,1% (Dicloridrato de N-(1-naftil)-etilenodiamina) e sulfanilamida 1% em 5% de H_3PO_4. Após cinco minutos foi feita a leitura de absorbância a 540 nm em espectrofotômetro. A concentração de óxido nítrico presente nas amostras foi calculada com base na curva padrão utilizando-se $NaNO_2$ (0,4 a 200 µM) no qual os valores de NO_2^- das amostras foram correlacionados.

3.14 Imunização dos camundongos com plasmídeos

Os camundongos foram inoculados em cada músculo quadríceps com 40 µg de plasmídeo apenas (VR2001-Naked) ou contendo o gene da serpina clonado (VR2001-Serpin) diluídos em 100 µL de salina contendo 50% de sacarose. Após 40 e 55 dias dessa primeira inoculação a imunização foi reforçada injetando-se intradermicamente, na orelha, 40 µg de VR2001-Naked ou VR2001-Serpin diluídos em 40 µL de PBS (20 µL em cada orelha), conforme protocolo adaptado de Oliveira *et al.*, 2006. O soro desses camundongos foi coletado 70 dias após o inicio do protocolo de imunização (15 dias após a última injeção), misturados em proporções iguais e congelados para utilização em experimentos subsequentes.

3.15 Determinação de anticorpos IgG1 e IgG2a séricos

Para a dosagem de anticorpos IgG1 e IgG2a específicos para a serpina AET-7393, foi preparada uma solução de EGS de *Ae. aegypti* (15 µg/mL) em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 e adicionados em placas de 96 poços (100 µL/poço), incubadas overnight a 4 °C ("*coating*" dos poços da placa). No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, os

poços foram bloqueados com 200 µL/poço de PBS/SFB 10% por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, amostras de soro provenientes de camundongos 15 dias após a última imunização e apropriadamente diluídas, foram adicionadas na placa (100 µL/poço) e incubadas por 2 horas à temperatura ambiente. Após ciclo de 5 lavagens, foi adicionado 100 µL/poço de anticorpo anti-IgG1 de camundongo (diluição 1:1000 - BD Biosciences, San Juan, CA, USA) e anti-IgG2a (diluição 1:2000 - Invitrogen) conjugados com HRP, diluídos em PBS/SFB 10% e incubados por 1 hora, a temperatura ambiente. Após 7 lavagens, foram então adicionados 100 µL/poço da solução substrato TMB e peróxido de hidrogênio (1:1) e incubado por no máximo 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de ácido fosfórico 1 M. A leitura dos poços foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm.

O mesmo protocolo foi seguido utilizando-se também a serpina purificada, diluída em tampão carbonato de sódio 0,1M, pH 9,5 (5 µg/mL) para o *coating* dos poços da placa. O restante da reação seguiu os passos descritos no parágrafo anterior.

3.16 Estimativa da concentração de serpina AET-7393 presente no EGS de Ae. aegypti

Para determinarmos a quantidade de serpina AET-7393 presente no EGS, foi preparada uma curva padrão em tampão carbonato de sódio 0,1 M, pH 9,5 com a proteína purificada iniciando a 200 ng/mL e decaindo linearmente pela metade. Também foram preparadas soluções de EGS no mesmo tampão, contendo 10 µg/mL, retirados de três lotes diferentes preparados em nosso laboratório. Essas soluções foram incubadas overnight a 4 °C em placas de 96 poços ("*coating*" dos poços da placa). No dia seguinte, a placa foi lavada 3 vezes com PBS/Tween 0,05% e, em seguida, os poços foram bloqueados com 200 µL/poço de PBS/SFB 10% por 1 hora à temperatura ambiente. Após nova lavagem, 100 µL/poço das amostras de soro retiradas dos camundongos 15 dias após a última imunização, diluídos 100 vezes em PBS/SFB 10%, foram adicionados e incubados por 2 horas à temperatura ambiente. Após ciclo de 5 lavagens, foram adicionados 100 µL/poço de anti-IgG2a (1:2000) de camundongo nos poços correspondentes, diluídos em PBS/SFB 10% e

incubados por 1 hora, a temperatura ambiente. Após 7 lavagens, foram então adicionados 100 µL/poço da solução substrato TMB e peróxido de hidrogênio (1:1) e incubado por no máximo 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL/poço de ácido fosfórico 1 M. A leitura da placa foi feita em um espectrofotômetro a 450 nm. A concentração de serpina foi determinada então correlacionando a densidade óptica (D.O.) das amostras sensibilizadas com EGS com a D.O. da curva feita com a proteína purificada.

3.17 Transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose

As proteínas presentes no gel de poliacrilamida 12% foram transferidas para membrana de nitrocelulose através do sistema de transferência semi-seco *Trans blot semi-dry transfer cell* (Bio-Rad) em tampão de transferência (Tris 48 mM, glicina 39 mM, SDS 0,037% e metanol 20%) a 10 volts por 30 minutos. Após a transferência a membrana foi bloqueada em TBS (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,4) contendo 5% de SFB por 2h. A membrana foi lavada para remoção da solução de bloqueio e incubada com soro dos animais imunizados (1:100) overnight a 4 °C. Após o período de incubação, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário anti-IgG2a (1:2000) conjugados com HRP por 2h. Posteriormente a membrana foi lavada e a revelação das proteínas reconhecidas pelos anticorpos foi realizada com Kit de detecção *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate* (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, EUA) de acordo com protocolo do fabricante.

3.18 Análise do repasto sanguíneo, fertilidade e fecundidade dos mosquitos

Após 20 dias da última imunização, os camundongos foram anestesiados e expostos a 50 mosquitos *Ae. aegypti* por 15 minutos. Após esse período, os animais foram retirados e os mosquitos foram congelados, tiveram sua cabeça e tórax removidos, e seu abdome foi macerado em um tubo *eppendorf* contendo 200 µL de água destilada, com o auxílio de um pistilo. O homogeneizado foi colocado em uma placa de 96 poços de fundo “U” e centrifugada por 10 minutos a 300 *g* e 100 µL desse sobrenadante livre de debris celulares foram então transferidos para outra

placa de 96 poços de fundo chato e lida em um espectrofotômetro a 540 nm para estimar a hemoglobina presente.

Os camundongos também foram expostos a outros 10 mosquitos, para a avaliação de sua fertilidade e fecundidade. Após se alimentarem, os mosquitos foram mantidos vivos por 3 dias, quando então a oviposição foi induzida, colocando-os em tubos individuais contendo papel filtro umidificado. Os ovos foram contados e, após 24 horas, colocados em contato com água para eclodirem. As larvas foram alimentadas com comida para peixe *ad libitum*. Todo o desenvolvimento da geração F1 foi acompanhado e quantificado até o estágio adulto do mosquito.

3.19 Análise estatística

Os dados estão apresentados como médias ± erro padrão da média de cada grupo. Os grupos experimentais serão comparados com seus respectivos controle pelo teste *t* de Student ou por análise de variância (ANOVA) usando Tukey como pós-teste. A significância estatística mínima estabelecida foi $p \leq 0,05$.

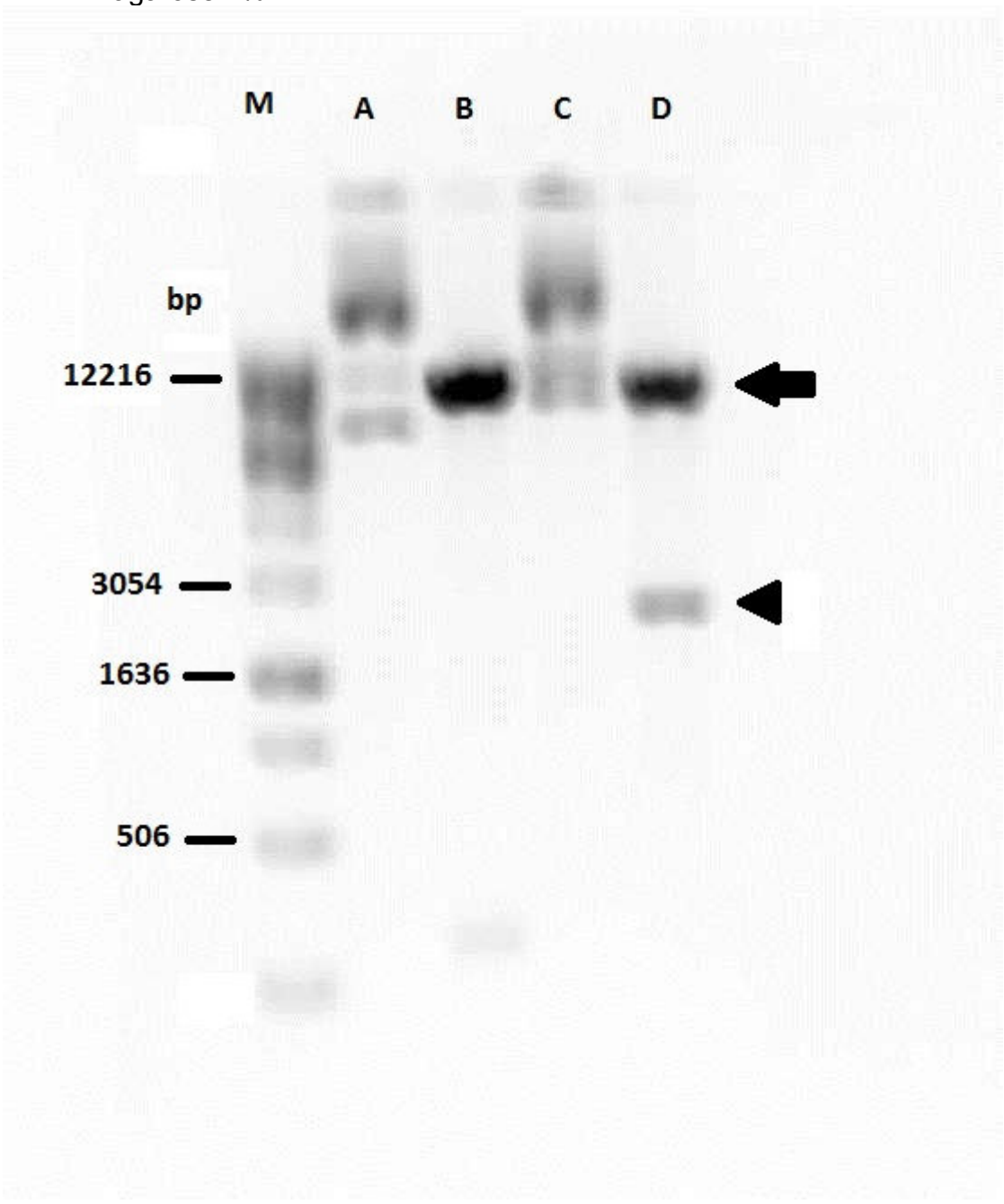
4 RESULTADOS

4.1 Integridade dos plasmídeos e proteína recombinante

Como descrito no item “Material e Métodos”, a síntese do gene da serpina e sua inserção no plasmídeo foram terceirizados. Além disso, a expressão da proteína recombinante e sua purificação foram realizadas pelo nosso colaborador, Dr. Eric Calvo, da Section of Vector Biology, Laboratory of Malaria and Vector Research, NIAID/NIH. Antes de começarmos os ensaios funcionais verificamos se o material não havia sido fragmentado ou degradado. Nossos resultados mostram que os plasmídeos se mantiveram íntegros, como pode ser observado pela banda única no gel de agarose 1% após o VR2001-Naked ter sido digerido pela BamHI (Figura 3 coluna B) e pela presença também da banda representada pela AET-7393 no plasmídeo VR2001-Serpin digerido pela BamHI (Figura 3 coluna D).

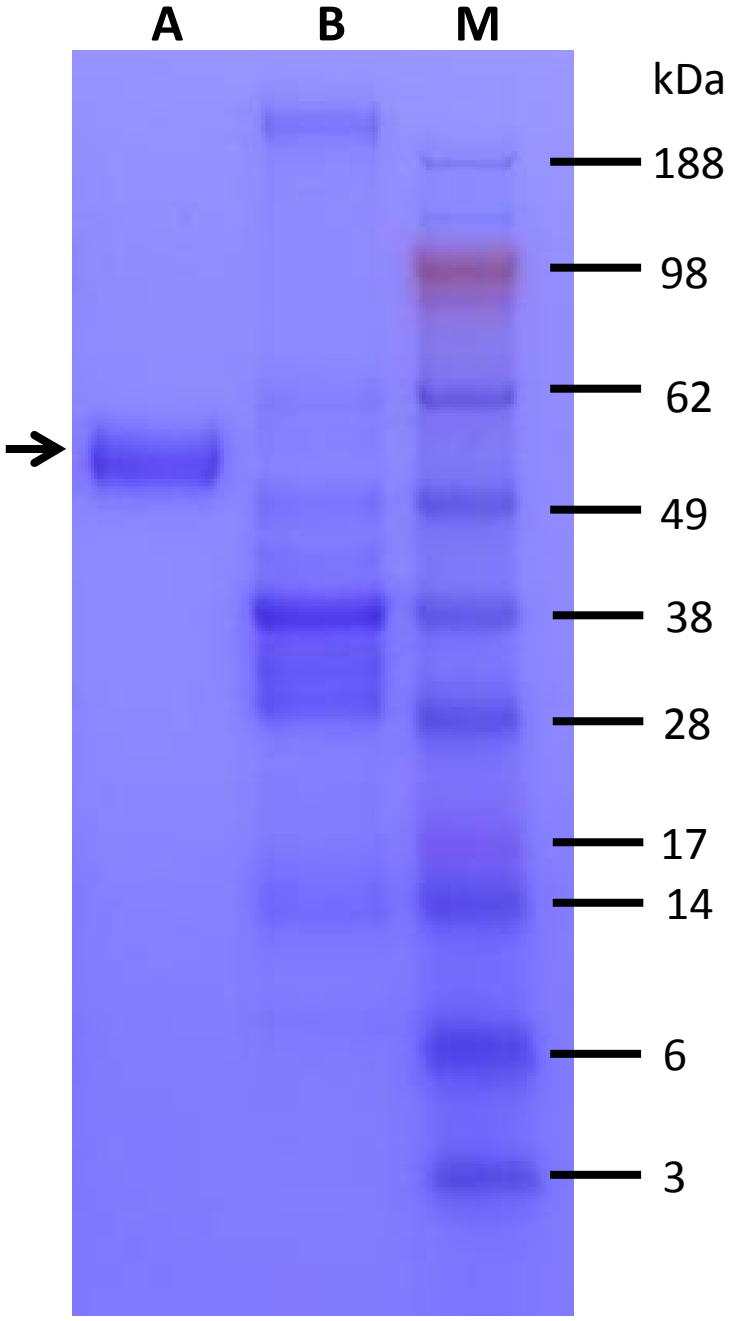
Da mesma forma a proteína recombinante também apresentou uma banda única após eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (Figura 4 coluna A), confirmando sua integridade. Uma banda correspondente à AET-7393, porém, não foi encontrada no EGS (Figura 4 coluna B), sugerindo que a quantidade dessa proteína secretada na saliva é bastante pequena para ser detectada por essa técnica.

Figura 3 - Eletroforese dos plasmídeos “nu” (VR2001-Naked) e clonado com a serpina (VR2001-Serpin) digeridos ou não com BamHI em gel de agarose 1%.



(A) VR2001-Naked intacto. (B) VR2001-Naked digerido por BamHI. (C) VR2001-Serpin intacto. (D) VR2001-Serpin digerido por BamHI. “M” representa o marcador de massa molecular, seta representa o vetor VR2001 após clivagem com BamHI e cabeça de seta representa o fragmento gênico da serpina AET-7393.

Figura 4 - Eletroforese em gel de poliacrilamida 12% e SDS 0,1%.



(A) Serpina AET-7393 recombinante. (B) EGS de *Ae. aegypti*. “M” representa o marcador de massa molecular e a seta a serpina AET-7393.

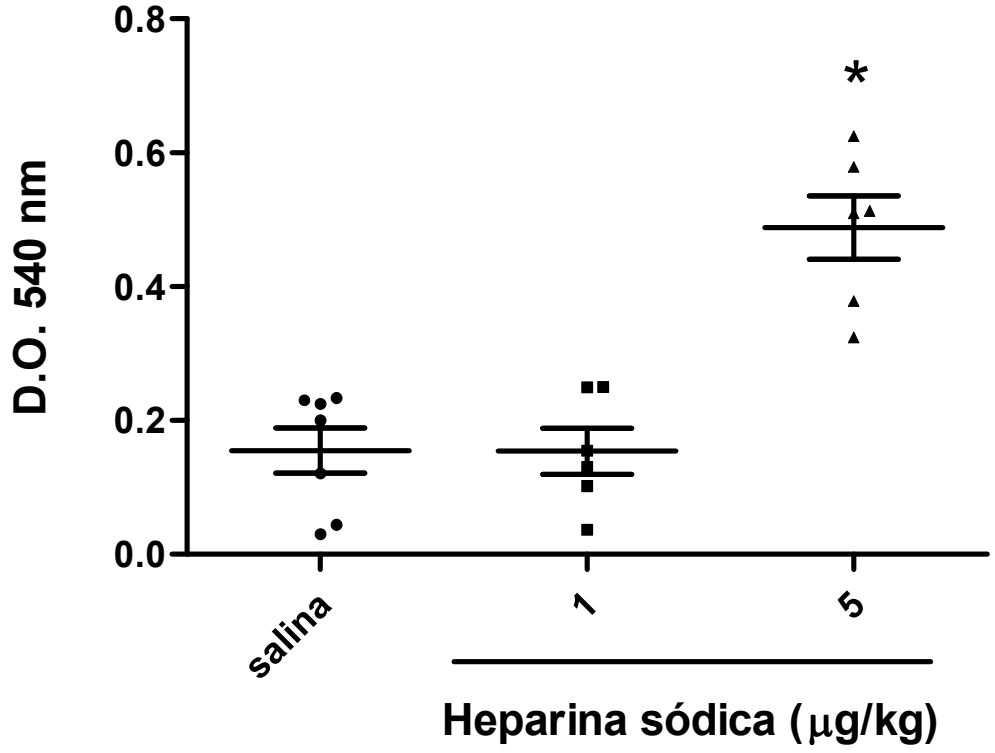
4.2 Ensaios de sangramento in vivo

Há alguns anos, Stark e James (1998) descreveram o papel de outra serpina também presente na saliva do mosquito *Ae. aegypti,* que apresentou atividade anticoagulante através da inibição do Fator Xa. Assim, nossa primeira hipótese foi de que, semelhante à serpina já descrita, a AET-7393 poderia interferir na hemostasia do hospedeiro. Para testarmos essa teoria padronizamos uma metodologia de sangramento em camundongos, como descrito em Materiais e Métodos, usando como controle positivo animais inoculados com heparina sódica, um conhecido anticoagulante (BJORK; LINDAHL, 1982). Usando esse procedimento, observamos o aumento do sangramento em animais inoculados com heparina sódica a partir de 5 µg/Kg (Figura 5).

Uma vez tendo sido a metodologia padronizada, inoculamos camundongos com o plasmídeo contendo ou não o gene que expressa a serpina AET-7393 ("VR2001-Serpin" e "VR2001-Naked", respectivamente) e submetemos os animais ao ensaio de sangramento pela veia caudal em diversos momentos após a inoculação. A Figura 6A mostra que é possível observar que já no primeiro dia após a inoculação há uma tendência de aumento no sangramento de animais inoculados com o VR2001-Serpin quando comparados com os animais que receberam VR2001-Naked. Entretanto essa tendência não foi estatisticamente significativa. Por outro lado, no terceiro dia observamos uma diferença estatística no sangramento, observado nos animais inoculados com VR2001-Serpin, comparados com aqueles recebendo VR2001-Naked ($p \leq 0,05$ - Figura 6B). Esse aumento do sangramento não foi observado após 10 dias da inoculação dos plasmídeos (Figura 6C).

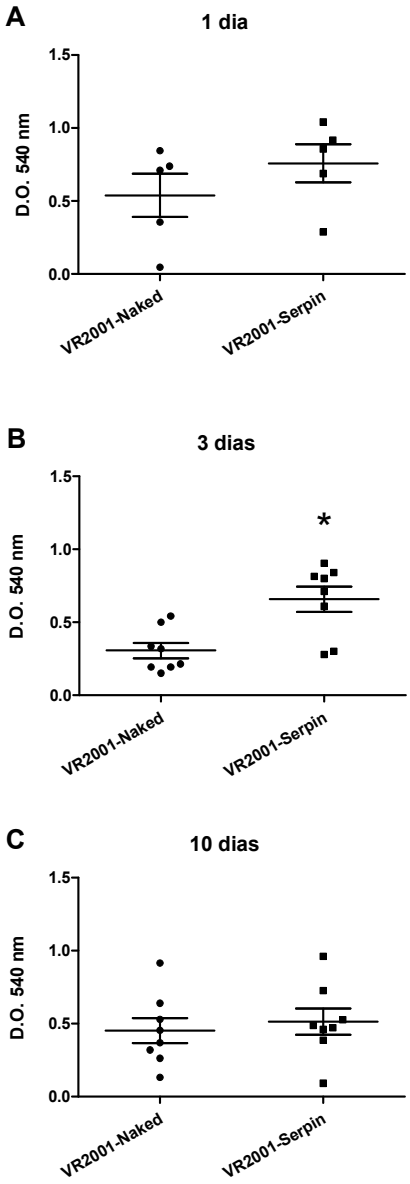
Nosso próximo passo foi confirmar se a proteína recombinante reproduziria a atividade observada com a inoculação do plasmídeo. Dessa forma, repetimos o ensaio de sangramento *in vivo*, mas dessa vez inoculando a serpina diretamente na corrente sanguínea do animal 30 minutos antes do ensaio, conforme metodologia previamente descrita (CALVO et al., 2011). Animais inoculados com 100 µg/kg ou 1 mg/kg da proteína não apresentaram alteração significativa no sangramento quando comparados com animais que receberam PBS (Figura 7A e 7B). Porém, quando inoculados com 2 mg/kg, o sangramento observado foi estatisticamente maior do que o observado no grupo controle ($p \leq 0,05$ - Figura 7C).

Figura 5 – Sangramento induzido por incisão na cauda em camundongos controles ou inoculados com a serpina AET-7393 ou heparina sódica.



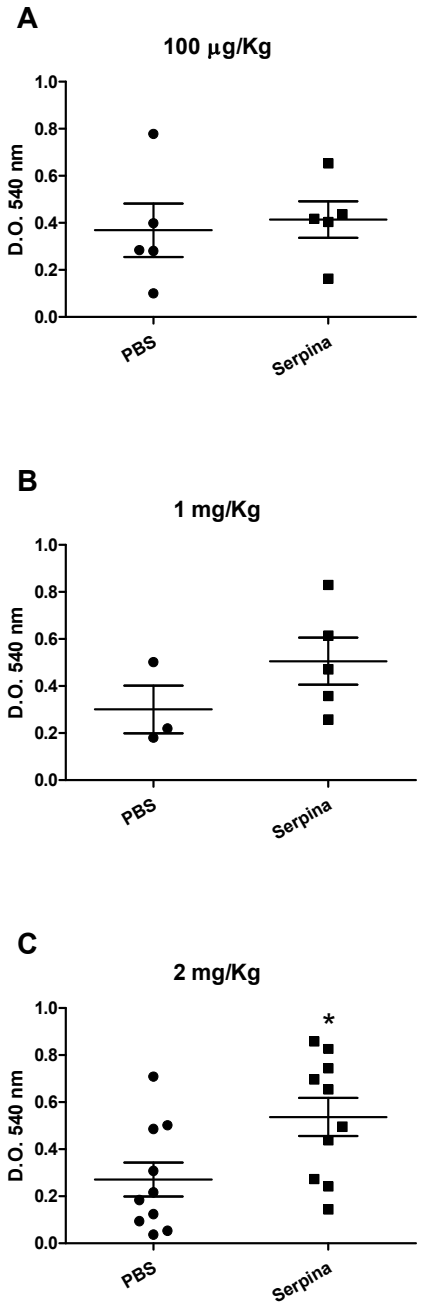
Camundongos BALB/C foram inoculados com 100 µL i.v. de solução salina (NaCl 0,9 M) ou heparina sódica nas doses de 1 µg/Kg ou 5 µg/Kg. Após 15 minutos a ponta de sua cauda foi amputada, conforme descrito em Materiais e Métodos. O sangue foi coletado por 30 minutos em um tubo com água destilada mantido a 37 °C e após diluições apropriadas a quantidade de sangue perdida foi indiretamente estimada pela D.O. das amostras avaliada em espectrofotômetro a 540 nm. n = 6-7 (* $p \leq 0,05$ *versus* grupo “salina”).

Figura 6 – Sangramento induzido por incisão na cauda em camundongos inoculados com o plasmídeo somente (VR2001-Naked) ou plasmídeo contendo o gene da serpina AET-7393 (VR2001-Serpin).



Camundongos BALB/C foram inoculados com 100 µL do plasmídeo (40 µg/camundongo i.m.) e após 1 (A), 3 (B) e 10 (C) dias a ponta de sua cauda foi amputada, conforme descrito em Materiais e Métodos.. O sangue foi coletado por 30 minutos em um tubo com água destilada mantido a 37 °C e após diluições apropriadas a quantidade de sangue perdida foi indiretamente estimada pela D.O. das amostras avaliada em espectrofotômetro a 540 nm. n = 5-8 (* $p \leq 0{,}05$ *versus* grupo “VR2001-Naked”).

Figura 7 – Sangramento induzido por incisão na cauda em camundongos inoculados com PBS ou serpina AET-7393 recombinante.

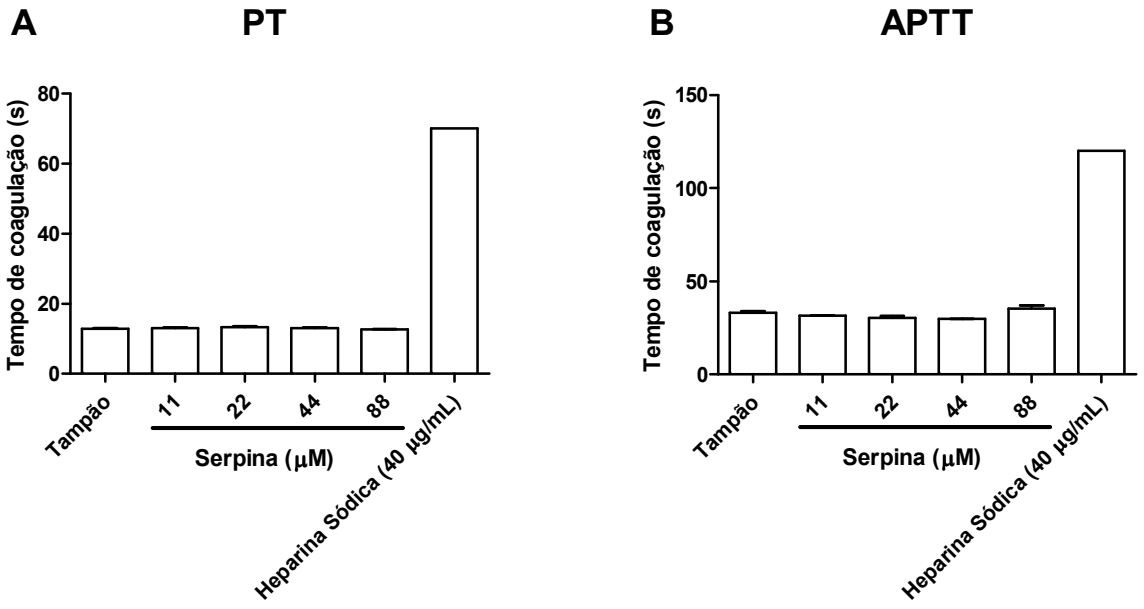


Camundongos BALB/C foram inoculados com 200 µL i.v. de PBS somente ou 100 µg/Kg (A), 1 mg/Kg (B) ou 2 mg/Kg (C) da serpina recombinante. Após 1 hora a ponta de sua cauda foi amputada, conforme descrito em Materiais e Métodos. O sangue foi coletado por 30 minutos num tubo com agua destilada mantido a 37 °C e após diluições apropriadas a quantidade de sangue perdida foi indiretamente estimada pela D.O. das amostras avaliada em espectrofotômetro a 540 nm. n = 5-10 (* $p \leq 0{,}05$ *versus* VR2001-Naked).

4.3 Ensaios de coagulação in vitro

Como a presença da serpina aumentou o sangramento dos camundongos, nós fomos verificar se ela estaria envolvida na inibição de algum componente da cascata de coagulação. Em colaboração com o Prof. Dr. Marcelo Dias Baruffi, do Departamento de Análises Clínicas, Bromatológicas e Toxicológicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, avaliamos as vias extrínseca e intrínseca da coagulação pelos ensaios de APTT e PT, respectivamente. Nossos resultados mostram, porém, que a presença da AET-7393 não afeta nenhuma das duas vias da cascata de coagulação nas concentrações e condições avaliadas (Figura 8A e 8B).

Figura 8 – Tempo de coagulação *in vitro.*



O plasma retirado dos camundongos como descrito em Materiais e Métodos foi incubado na ausência e na presenta da serpina AET-7393 em diferentes concentrações ou com Heparina sódica (40 µg/mL) por 15 minutos. Após esse período os tempos de coagulação pelas vias extrínseca (A), avaliado pelo Tempo de protrombina (PT), e intrínseca (B), analisado pelo Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada (APTT), foram medidos por um coagulômetro. O plasma contendo heparina sódica atingiu o tempo máximo medido pelo aparelho. n = 3.

4.4 Ensaio de inibição de proteases

Em colaboração com a Profa. Dra. Aparecida Sadae Tanaka, do Departamento de Bioquímica da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, e do Dr. Michalis Kotsyfakis, do Institute of Parasitology, Biology Centre of the Academy of Science of Czech Republic, elaboramos um painel bioquímico, onde incubamos diferentes serinoproteases com seus substratos na presença da AET-7393 recombinante, para tentarmos desvendar quais possíveis enzimas seriam inibidas por ela. Nossos resultados mostraram uma redução significativa, de aproximadamente 50%, na atividade catalítica da proteinase 3 (PR3) (Tabela 2).

Tabela 2 - Atividade enzimática residual de diferentes proteases (%) na presença da serpina AET-7393.

Enzima	Quantidade de enzima utilizada (nM)	Percentual da atividade enzimática residual na presença da AET-7393 (540 nM)
calicreína	0,04	99,3 ± 1,8
β-triptase	0,009	96,3 ± 0,9
uPA	0,125	92 ± 2,1
fator Xa	0,33	100,5 ± 1
matriptase	0,03	95,6 ± 2,2
elastase	0,18	99,2 ± 1,8
α-quimioipsina	0,025	102,3 ± 2,4
quimase	0,45	102,6 ± 1,5
fator XIIa	0,1	98,9 ± 2,8
plasmina	0,8	105,2 ± 0,6
trombina	0,01	96,9 ± 1,7
tPA	0,024	96,7 ± 1,6
catepsina G	6,6	100,5 ± 1,3
fator XIa	0,1	98,5 ± 1,5
proteinase 3	11	**49,5 ± 7,3[#]**
*** tripsina**	21,4	89,4
*** triptase**	0,37	100,4

Diferentes proteases foram incubadas com 540 nM da serpina recombinante e analisadas por espectrofotômetro a 405 nm. [#]Representa $p \leq 0,05$ versus controle. As enzimas marcadas com * foram incubadas com 710 nM da serpina e não foram feitas em replicatas.

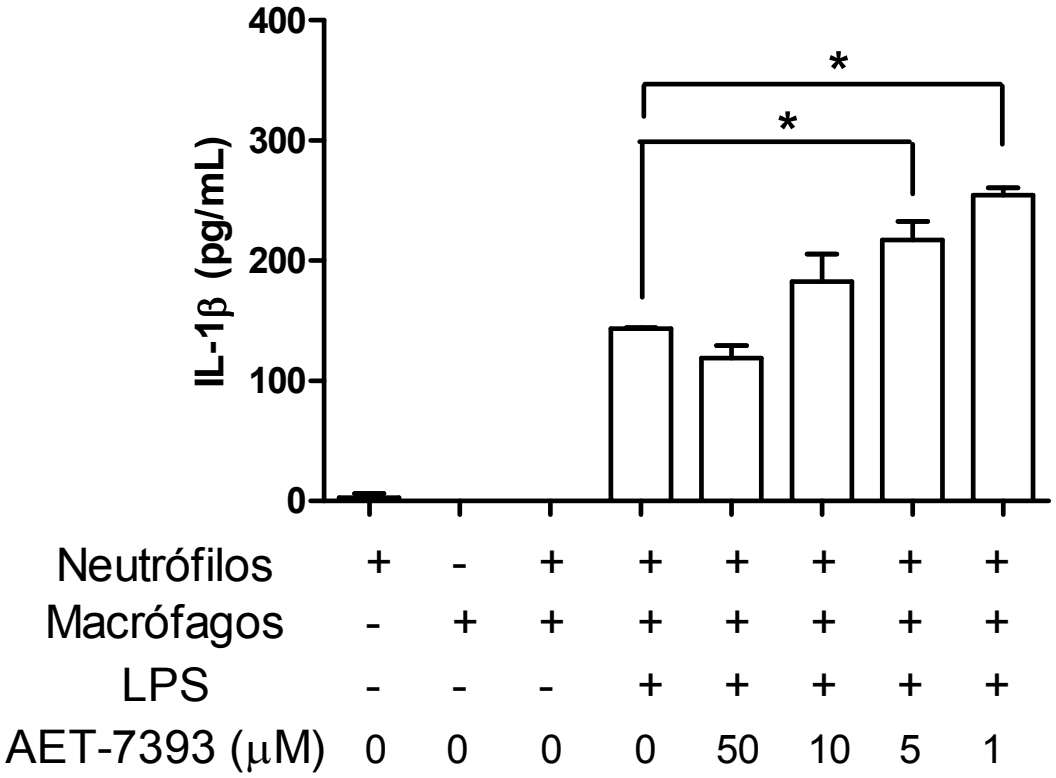
4.5 Interferência na produção de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes coincubados com neutrófilos peritoneais eliciados por tioglicolato na presença da serpina AET-7393

Dados da aluna Michele Silva de Barros, doutoranda de nosso laboratório, demonstraram que a incubação de macrófagos peritoneais de camundongos com o EGS de *Ae. aegypti* induz produção de IL-1β nessas células (dados não publicados). Dentre as várias funções da PR3, podemos destacar sua capacidade de clivar a pró-IL-1β em IL-1β ativa independentemente de caspase-1 (COESHOTT et al., 1999). Com a descoberta de que a AET-7393 possui um efeito inibitório sobre a PR3 nós fomos verificar se sua presença poderia impedir a liberação de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes.

Nós utilizamos neutrófilos elicitados por tioglicolado, retirados da cavidade peritoneal, como fonte de PR3 e os co-cultivamos com os macrófagos peritoneais residentes, uma metodologia adaptada de (COESHOTT et al., 1999). Ao contrário do esperado as maiores doses de serpina utilizadas (50 e 10 μM) não interferiram na produção da citocina, enquanto as menores doses (5 e 1 μM) aumentaram significativamente sua produção (Figura 9).

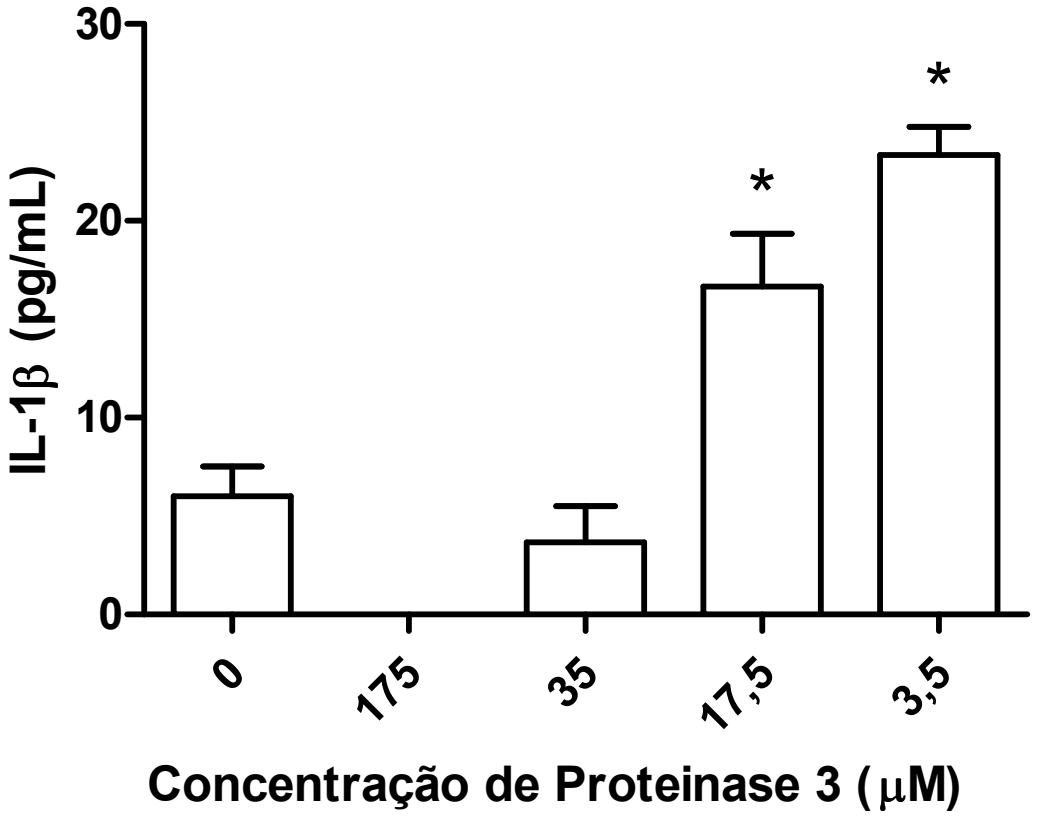
Uma possível explicação para esse efeito inesperado na produção de IL-1β, é que a PR3 poderia ter um efeito não só de ativação da citocina mas também de degradação, assim como foi descrito para a IL-33 (BAE et al., 2012). Para averiguarmos essa possibilidade incubamos macrófagos peritoneais residentes com diferentes concentrações de PR3 por 15 minutos e os estimulamos com 100 ng/mL de LPS por 4 horas. Nossos resultados mostram que, enquanto as menores concentrações de PR3 testadas (3,5 e 17,5 μM) provocam um aumento na quantidade de IL-1β detectada, essa citocina é reduzida ou abolida nas maiores concentrações testadas (35 e 175 μM) (Figura 10).

Figura 9 - Produção de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes coincubados com neutrófilos peritoneais eliciados por tioglicolato.



1,5 x 10^5 células/poço do lavado peritoneal foram plaqueadas e após 2 horas foram feitas 3 lavagens para retirar as células em suspensão. As células remanescentes foram incubadas então com LPS (1 µg/mL) por 4 horas. Após esse período as células do lavado periotenal rico em neutrófilos, retirado após 12 horas da injeção de tioglicolato, foi adicionado à cultura (6 x 10^5 células/poço) juntamente com diferentes concentrações da serpina AET-7393. Após mais duas horas de incubação o sobrenadante foi coletado e a concentração da IL-1β dosada por ELISA. Resultado representativo de um experimento com n = 3 (* $p \leq 0,05$).

Figura 10 - Concentração de IL-1β produzida por macrófagos peritoneais pré-incubados com diferentes concentrações de PR3.



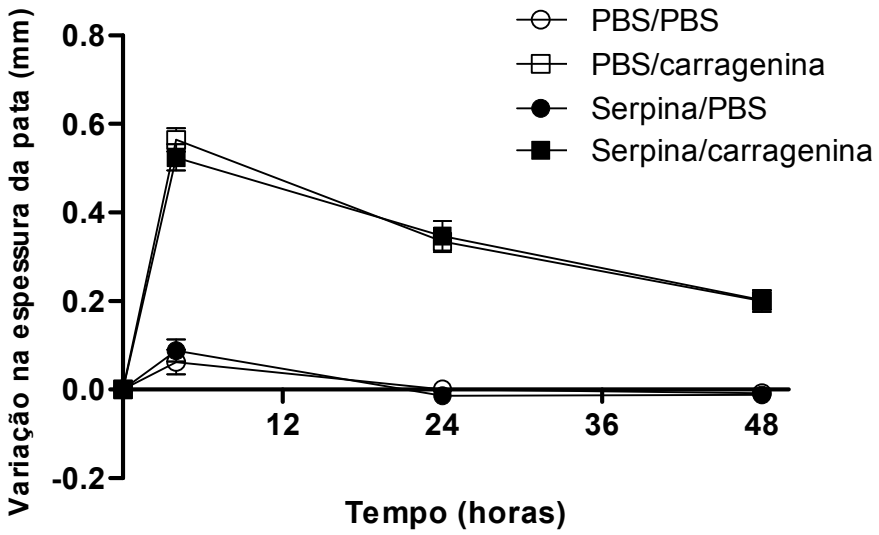
1,5 x 10^5 células/poço do lavado peritoneal foram plaqueadas e após 2 horas foram feitas 3 lavagens para retirar as células em suspensão. As células remanescentes foram incubadas com diferentes concentrações de PR3 por 15 minutos e então estimuladas por LPS (100 ng/mL) por 4 horas. Após esse período o sobrenadante foi coletado e a concentração da IL-1β dosada por ELISA. Resultado representativo de um experimento com n = 3 (* $p < 0,05$ versus grupo "0").

4.6 Edema de pata induzido por carragenina e ativação de macrófagos

Conhecendo a capacidade das serpinas de modular serinoproteases em diferentes processos imunológicos (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980; CICARDI et al., 2005; HEUTINCK et al., 2010; JANOFF, 1985; MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004), e a habilidade do mosquito de regular tais processos através de sua saliva (BOPPANA et al., 2009; CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004; ZEIDNER et al., 1999), decidimos avaliar se a serpina poderia modular processos inflamatórios *in vivo* e *in vitro*. Para estudar a inflamação *in vivo*, utilizamos o modelo clássico de edema de pata induzido por carragenina, onde um dos grupos foi tratado i.v. com a serpina AET-7393. Nossos resultados, entretanto, mostram que o tratamento com a serpina não é capaz de provocar qualquer alteração no edema induzido pela carragenina, quando comparado com animais inoculados com PBS somente (Figura 11).

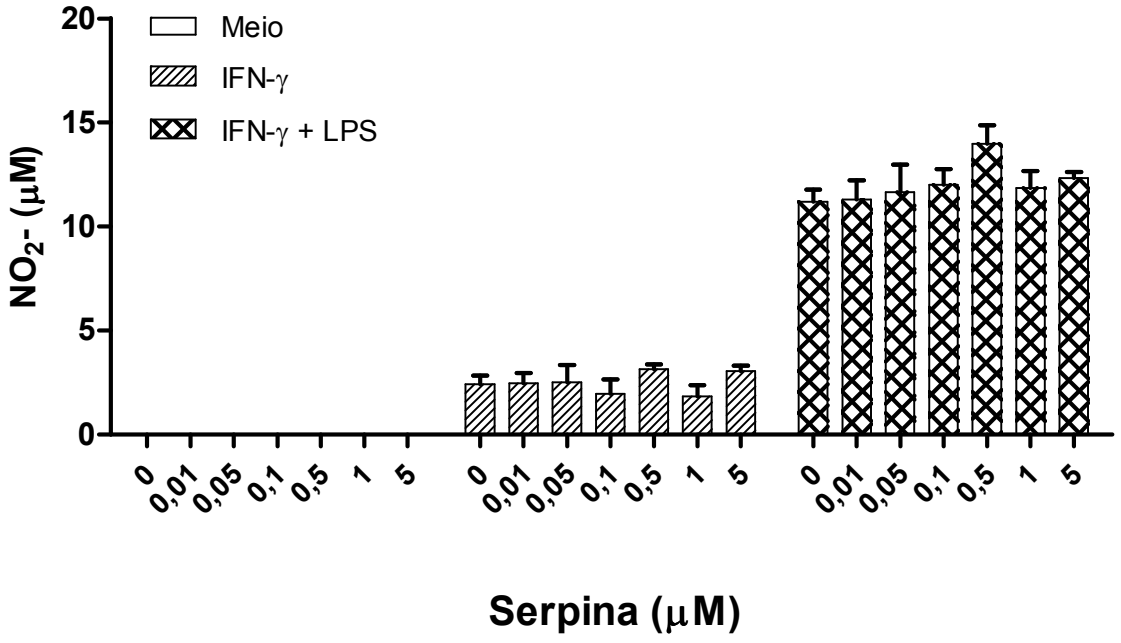
Para avaliar uma possível atividade moduladora de macrófagos pela serpina AET-7393, utilizamos um ensaio de produção de óxido nítrico induzido por IFN-γ e LPS, conforme descrito em Material e Métodos. A pré-incubação dos macrófagos com a proteína não alterou a produção de óxido nítrico de macrófagos em nenhuma das situações testadas, mesmo quando foram utilizados 5 μM da serpina na cultura (Figura 12). Por outro lado, esse ensaio também demonstrou que nossa estratégia de expressar essa proteína em um sistema de células de mamíferos foi capaz de produzir uma proteína livre de endotoxinas contaminantes, uma vez que as células estimuladas com IFN-γ na presença da serpina produziram níveis semelhantes de óxido nítrico em cultura.

Figura 11 - Atividade da serpina AET-7393 em edema de pata induzido por carragenina.



Camundongos BALB/C foram injetados com 200 µL i.v. de PBS somente ou com a serpina recombinante (2 mg/Kg). Após 2 horas os camundongos tiveram o coxim plantar de suas patas traseiras injetados com 30 µL de PBS (pata direita) ou 1% de carragenina em PBS (pata esquerda). A espessura da pata foi medida com um paquímetro após 4, 24 e 48 horas da injeção da carragenina. n = 5.

Figura 12 - Produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais eliciados por tioglicolato na presença ou ausência da serpina.



1,5 x 10^5 células/poço do lavado peritoneal, retirado após 12 horas da injeção de tioglicolato 3%, foram plaqueadas e após 2 horas foram feitas 3 lavagens para retirar as células em suspensão. As células remanescentes foram incubadas então com apenas meio ou estimuladas com IFN-γ (5 ng/mL) ou IFN-γ e LPS (5 ng/mL de cada) e tratadas com diferentes concentrações da serpina AET-7393. A produção de óxido nítrico foi estimada pela determinação de nitrito no sobrenadante da cultura pelo método de reação de Griess. Resultado representativo de um experimento com n = 3.

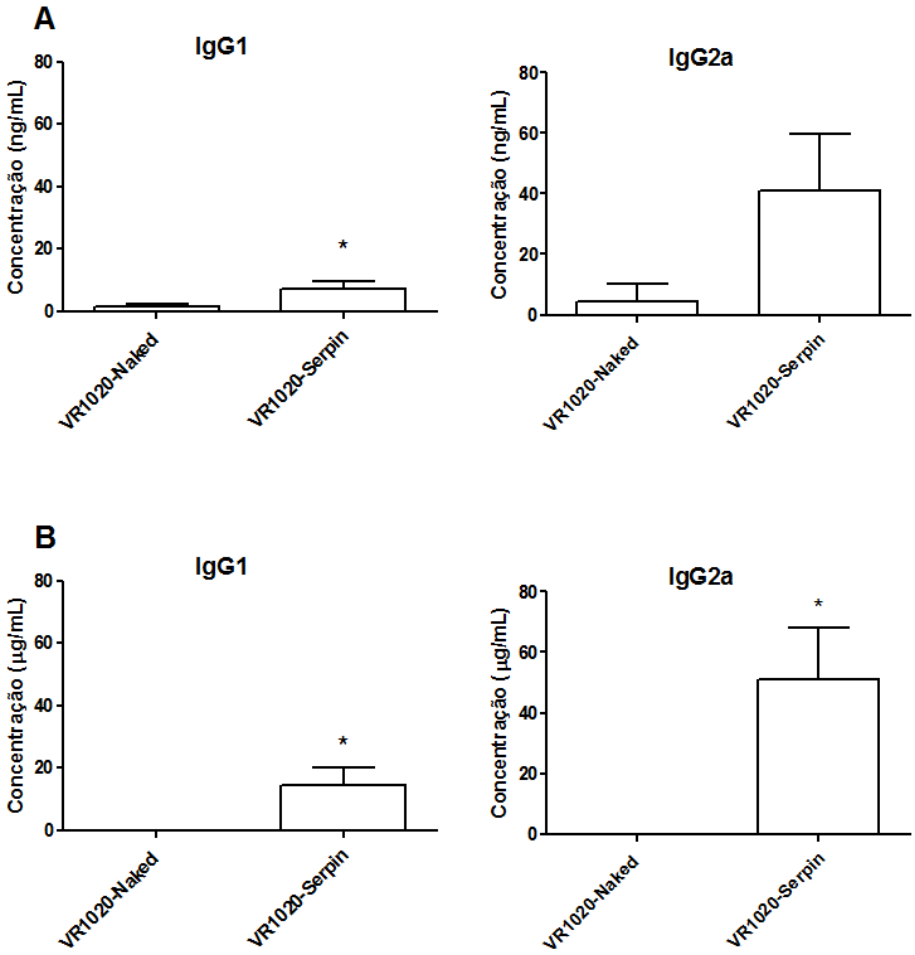
4.7 Imunização dos camundongos com o plasmídeo contendo a serpina AET-7393

Foi mostrado que a imunização de hospedeiros contra componentes salivares é capaz de interferir negativamente o ciclo de vida do mosquito (RAMASAMY et al., 1988; SUTHERLAND; EWEN, 1974), reduzir a transmissão de doenças (DONOVAN et al., 2007; GOMES et al., 2008; KAMHAWI et al., 2000; TITUS; BISHOP; MEJIA, 2006) e ainda ser um diagnóstico de exposição ao vetor, indicando um fator de risco para transmissão de diversas doenças (REMOUE et al., 2006). Face à importância do processo e as diferentes questões que poderiam ser abordadas a partir do mesmo nós decidimos estabelecer um protocolo de imunização com a serpina para que esses animais pudessem ser utilizados como ferramentas biológicas em testes subsequentes.

Para avaliar a produção de anticorpos específicos contra a serpina em camundongos, imunizamos os animais com os plasmídeos VR2001-Naked (controle) ou VR2001-Serpin conforme descrito em Materiais e Métodos e, 15 dias após o último reforço, os animais tiveram uma alíquota de sangue retirada e a concentração de anticorpos IgG1 e IgG2a foram determinados no soro. Observamos aumento da concentração tanto de IgG1 quanto de IgG2a específicas nos animais imunizados, embora a concentração de IgG2a tenha sido até três vezes maior. É possível observar o aumento da concentração tanto dos anticorpos contra o EGS total (Figura 13A), quanto específicos para a serpina AET-7393 (Figura 13B).

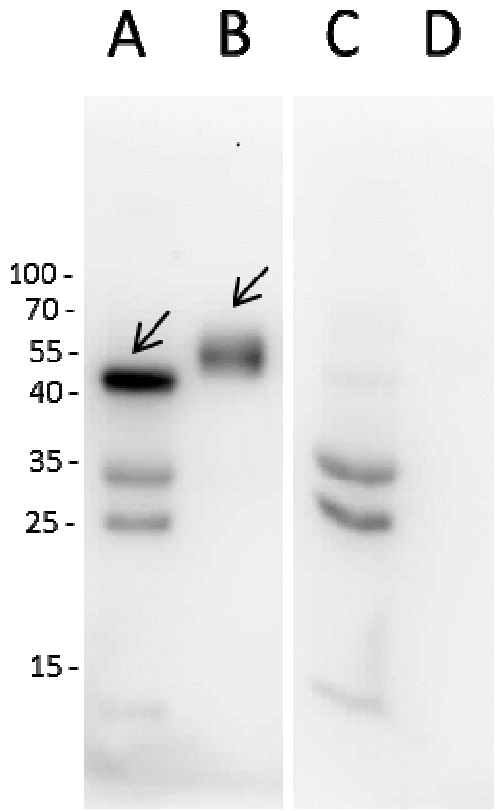
A presença de anticorpos específicos contra a serpina AET-7393 também foi detectada por Western Blot no soro de animais imunizados com o plasmídeo contendo o gene da serpina AET-7393 (VR2001-Serpin) (Figura 14). O soro desses animais reconheceram tanto a serpina recombinante (Figura 14 coluna B), quanto a serpina presente no EGS do *Ae. aegypti* (Figura 14 coluna A).

Figura 13 - Concentração de anticorpos IgG1 e IgG2a presentes no soro dos animais imunizados com o somente o plasmídeo (VR2001-Naked) ou contendo a serpina clonada (VR2001-Serpin).



Os camundongos foram injetados com 100 µL do plasmídeo VR2001-Naked ou VR2001-Serpin (40 µg/mouse, i.m.). Após 40 e 55 dias os plasmídeos foram injetados intradermicamente (40 µg do plasmídeo/camundongo, 20 µL em cada orelha). O soro foi coletado 70 dias após a primeira inoculação dos plasmídeos. (A) anticorpos detectados contra EGS total. (B) anticorpos específicos detectados contra a serpina AET-7393. Resultado representativo de um experimento com n = 5-10 (* $p < 0,05$ *versus* VR2001-Serpin).

Figura 14 - Análise por Western blot de anticorpos presentes nos animais imunizados com o plasmídeo somente (VR2001-Naked) ou contendo a serpina clonada (VR2001-Serpin).

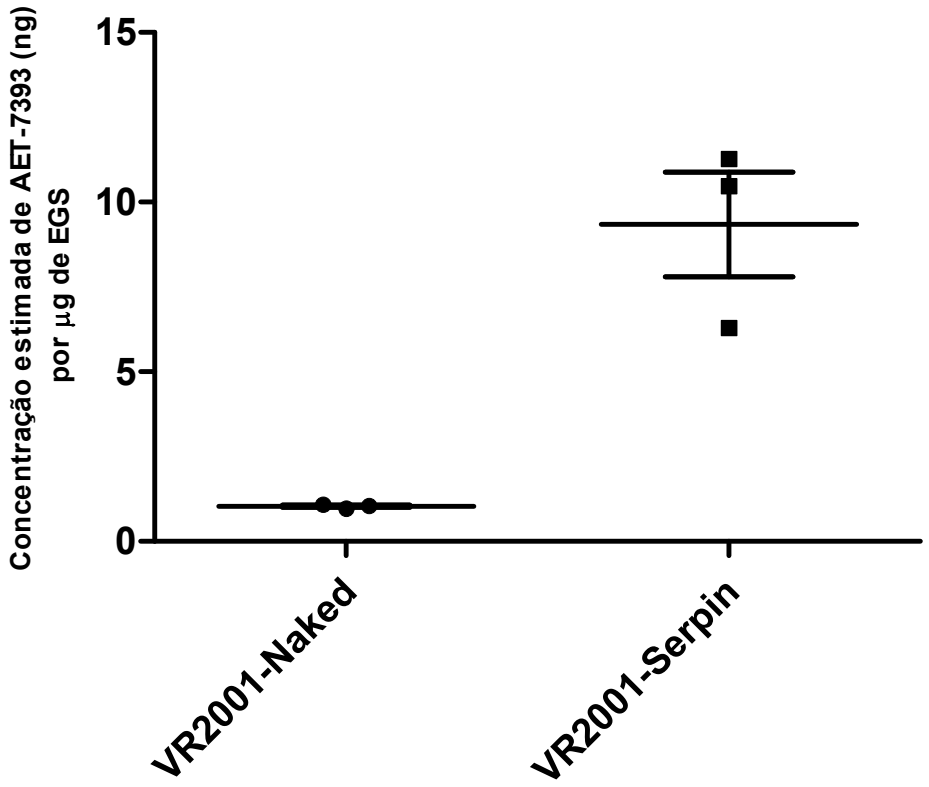


As colunas A e C possuem EGS (30 µg/poço) e as colunas B e D a serpina recombinante (0,5 µg/poço) em condições reduzidas. As proteínas separadas em um gel de SDS-PAGE 12% foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose e incubadas com o soro dos animais, injetados com o plasmídeo somente (VR2001-Naked) (C e D) ou contendo a serpina clonada (VR2001-Serpin) (A e B), coletados de 6 animais de cada grupo (VR2001-Naked ou VR2001-Serpin) no dia 70 após o inicio do protocolo de imunização, na proporção de 1:100. Anti-IgG2a foi usado como anticorpo secundário. As setas indicam a banda representada pela serpina AET-7393.

4.8 Quantificação da serpina AET-7393 presente no EGS

Tendo em mãos amostras de soros reativos contra a serpina recombinante, decidimos utilizá-los como ferramenta para estipularmos a concentração da mesma presente no EGS. Para compensar o fato de que trabalhamos no laboratório com material coletado em diferentes épocas do ano, utilizamos três lotes diferentes de EGS para realizar o ensaio (Figura 15). Nesse experimento nós detectamos todos os anticorpos IgG2a, do soro dos animais controle e imunizados, que reconheciam componentes do EGS. Como a única diferença no processo de imunização entre os dois grupos é a presença ou não da serpina no plasmídeo VR2001, podemos deduzir que a diferença entre as concentrações de IgG2a dos grupos reflitam o reconhecimento da serpina AET-7393 apenas. Apesar da variação esperada entre os diferentes lotes de EGS, observamos que a serpina AET-7393 representa ao redor de 1% do total de proteínas presentes no EGS (~ 10 ng de serpina em 1 µg de EGS – Figura 15).

Figura 15 - Concentração de serpina AET-7393 presente no EGS.

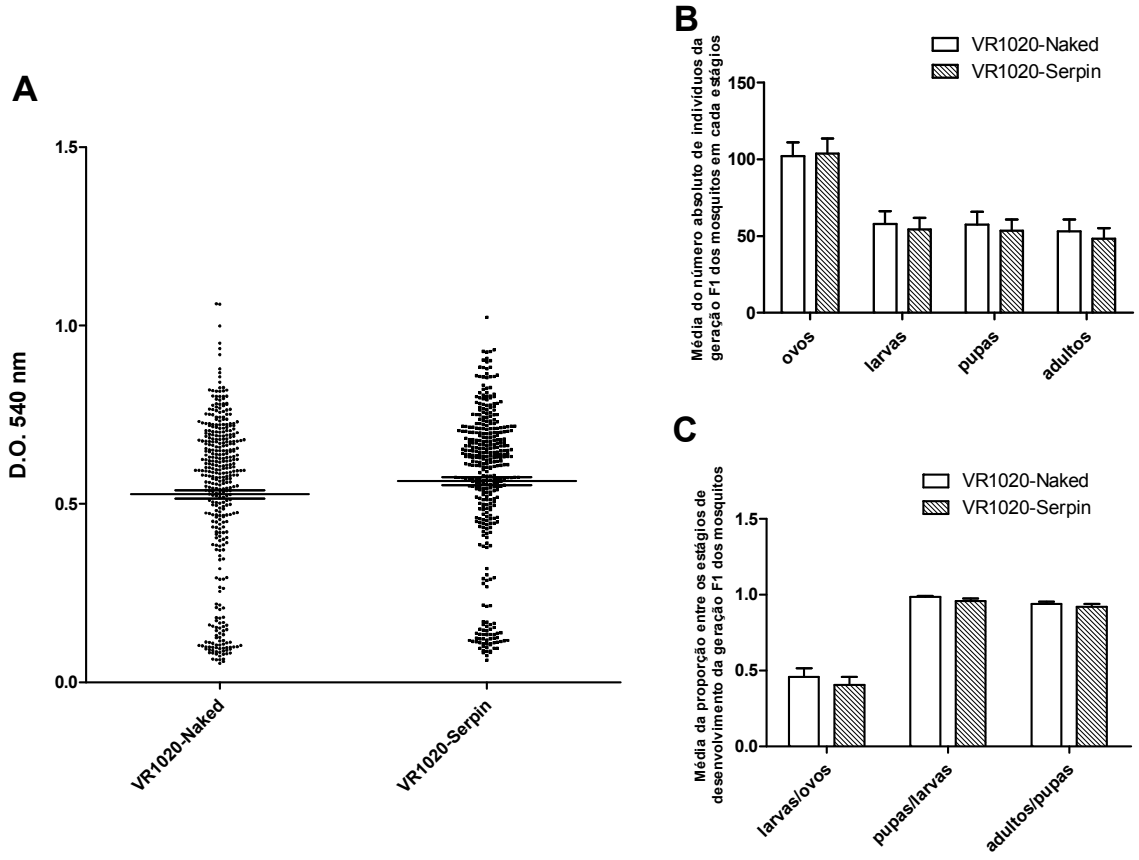


A presença de anticorpos IgG2a contra componentes do EGS foi detectado por ELISA e a concentração de serpina foi determinada então correlacionando a D.O. das amostras sensibilizadas com EGS com a D.O. da curva feita com a proteína purificada iniciando a 200 ng/mL e decaindo linearmente pela metade. A placa de 96 poços foi inicialmente sensibilizada com EGS (10 µg/mL), incubada com o pool do soro dos camundongos retirados 15 dias após a última imunização com VR2001-Serpin ou VR2001-Naked numa solução de 1:100 e como anticorpo secundário utilizamos um anti-IgG2a (1:2000). Para ambos foram usados três lotes diferentes de EGS representados por cada ponto nos grupos.

4.9 Interferência da imunização do hospedeiro no repasto sanguíneo, fecundidade e fertilidade do mosquito

Como já descrito anteriormente, a imunização do hospedeiro com componentes estruturais ou presentes na saliva dos mosquitos pode ter um efeito negativo no ciclo de vida do inseto (RAMASAMY et al., 1988; SUTHERLAND; EWEN, 1974). Dessa forma, avaliamos o quanto a imunização contra a serpina AET-7393 poderia interferir no repasto sanguíneo dos mosquitos, no número de ovos postos pelas fêmeas (fertilidade) e na quantidade de larvas que eclodiram e se desenvolveram até o estágio adulto (fecundidade). Esses experimentos foram feitos com o auxílio da Dra. Ceres Maciel de Miranda, Pós-Doutoranda de nosso laboratório com grande experiência em parâmetros de *fitness* biológico de mosquitos. Porém, não foi possível observar diferença estatística na quantidade de sangue ingerido (Figura 16A), nem interferência na oviposição ou no desenvolvimento da geração F1 (Figura 16B e 16C) em mosquitos que se alimentaram em camundongos imunizados com o plasmídeo somente (VR2001-Naked) ou com o plasmídeo contendo o gene da serpina (VR2001-Serpin).

Figura 16 - Avaliação da alimentação, fecundidade e fertilidade do mosquito após repasto sanguíneo de hospedeiro imunizado ou não com a serpina.



Após 20 dias da última imunização, os camundongos foram anestesiados e expostos aos mosquitos *Ae. aegypti.* (A) Quantidade de sangue ingerido por cada mosquito após 15 minutos de exposição aos camundongos controle (VR2001-Naked) ou imunizados com o plasmídeo contendo a serpina AET-7393 (VR2001-Serpin). Cada ponto representa a D.O. obtida do macerado abdominal de cada mosquito (um total de 50 por grupo) em água destilada e lidos a 540 nm. (B) Número absoluto dos 4 estágios de desenvolvimento da F1 dos 10 mosquitos alimentados em hospedeiros imunizados (VR2001-Serpin) ou não (VR2001-Naked). (C) Análise da proporção de indivíduos obtidos entre o estágio de desenvolvimento atual e o anterior da geração F1 dos mosquitos alimentados em hospedeiros imunizados (VR2001-Serpin) ou não (VR2001-Naked).

5 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a metodologia empregada para quantificar alterações no sangramento *in vivo* é robusta e confiável (Figura 5) para afirmamos que a serpina AET-7393 é capaz de aumentar o sangramento do hospedeiro tanto quando a proteína é expressa *in vivo* após inoculação do plasmídeo ou quando a proteína recombinante foi administrada exógenamente (Figuras 6 e 7). Esse fenômeno se assemelha ao encontrado para a outra serpina presente na saliva do *Ae. aegypti*, caracterizada como uma inibidora do Fator Xa (STARK; JAMES, 1998), impedindo a coagulação sanguínea. Os testes bioquímicos, porém, mostraram que a AET-7393 não apresenta atividade inibitória do Fator Xa (Tabela 2), resultado que pode ser corroborado pelos ensaios *in vitro*, que mostram que a AET-7393 não está atuando em nenhum fator das vias de coagulação, extrínseca ou intrínseca, nas condições testadas (Figura 8). A interferência no sangramento ainda precisa ser mais bem estudada uma vez que outros mecanismos ainda devem ser considerados, como inibição da agregação plaquetária e inibição da vasoconstrição, atividades estas já descritas para a saliva bruta dos mosquitos *Ae. aegypti* (RIBEIRO; MANS; ARCA, 2010).

Além da capacidade de modular a hemostasia do hospedeiro, a saliva de artrópodes hematófagos também é capaz de modular diversos processos imunológicos (RIBEIRO; MANS; ARCA, 2010). Uma serpina denominada Iris (*Ixodes ricinus* immunosuppressor) e presente na saliva do carrapato *Ixodes ricinus*, além de inibir elastase, trombina, Fator Xa e ativador de plasminogênio tecidual (PREVOT et al., 2006), foi caracterizada como um imunossupressor capaz de bloquear a produção de TNF-α, IFN-γ e ainda inibir a proliferação de linfócitos (LEBOULLE et al., 2002; PREVOT et al., 2009). De fato, moléculas salivares que possuem mais de uma função no hospedeiro poderiam conferir uma vantagem adaptativa ao mosquito, uma vez que gerariam uma economia fisiológica ("matar dois coelhos com uma única cajadada"). Dessa forma nosso trabalho também focou na capacidade da AET-7393 em modular o sistema imune do hospedeiro, e apesar dela não ter apresentado efeito algum no modelo de inflamação induzido por carragenina (Figura 11) ou na ativação de macrófagos (Figura 12) os dados do painel bioquímico

realizado demonstrou a capacidade dessa serpina em inibir PR3 (Tabela 2), uma serinoprotease presente principalmente em grânulos azurofílicos de neutrófilos e grânulos de monócitos, atuando, por exemplo, como um microbicida, auxiliando na migração dos neutrófilos através da membrana basal, modulando mediadores inflamatórios, plaquetas e células endoteliais e diversas outras funções relacionadas ao sistema imune (VAN DER GELD; LIMBURG; KALLENBERG, 2001). Por também ser expressa constitutivamente na membrana (CAMPBELL; CAMPBELL; OWEN, 2000) a PR3, juntamente com a mieloperoxidase (MPO) são alvos de anticorpos anti-citoplasma de neutrófilos (ANCAs), que estão amplamente relacionados com algumas vasculites mediadas por essas células, caracterizadas pela necrose de pequenos e médios vasos em vários órgãos: granulomatose de Weneger, poliangiite microscópica e síndrome de Churg-Strauss (KALLENBERG; HEERINGA; STEGEMAN, 2006).

Os ANCAs possuem um importante papel na ativação dos neutrófilos. Eles se ligam à PR3/MPO na membrana do neutrófilo enquanto que a porção Fcγ do anticorpo interage com o receptor presente na própria célula, fazendo com que elas se ativem e desgranulem, liberando enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio levando a morte e descolamento das células do endotélio (FALK et al., 1990). Além disso, a própria PR3, ao ser liberada, é internalizada pelas células endoteliais levando à sua apoptose (YANG et al., 2001). A PR3 é o principal antígeno para o qual estão direcionados os ANCAs na granulomatose de Weneger (JENNETTE; HOIDAL; FALK, 1990). Pacientes que possuem ANCA contra PR3, apresentam uma forma agravada da doença, se comparados aos que apresentam ANCA contra a MPO, apresentando um aumento da formação de granuloma, envolvimento de mais órgãos, perda das funções renais acelerada e relapsos mais frequentes (FRANSSEN et al., 2000). Novas terapias para a granulomatose de Weneger tem focado na PR3 como alvo farmacológico (KORKMAZ et al., 2013) e o fato da serpina AET-7393 se ligar a ela abre novas portas para estudos de possíveis tratamentos para essa doença, já que ela poderia tanto bloquear os efeitos citotóxicos da PR3 sobre as células endoteliais, quanto impedir o ANCA de se ligar a enzima e ativar o neutrófilo.

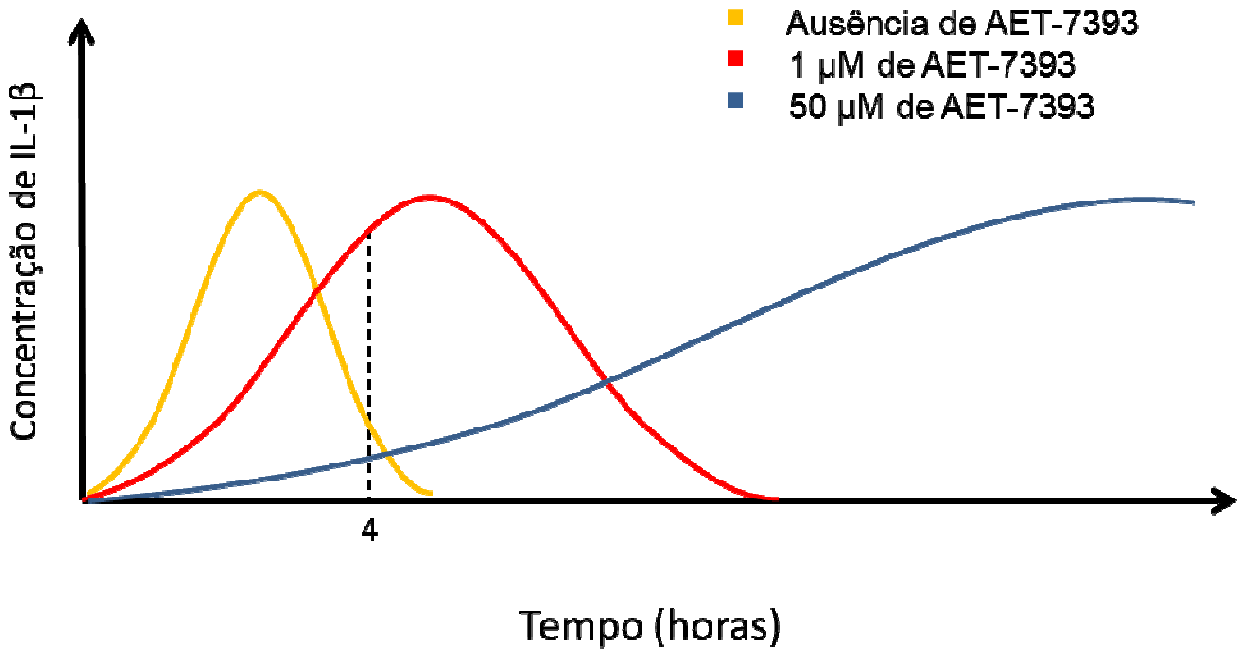
Em 1999 Coesshott e colaboradores mostraram que a PR3 era capaz de clivar a pró-IL-1β em IL-1β ativa de maneira independente de caspase-1. Pacientes

sensíveis ao ANCA contra PR3, que se encontram na fase final de lesão renal com granulomatose de Weneger, apresentam alta frequência de um genótipo “pró inflamatório”, caracterizado por um aumento na secreção de IL-1β (BORGMANN et al., 2003). Dessa forma, além dos possíveis alvos mencionados anteriormente para a AET-7393 como possíveis tratamentos, sua capacidade de bloquear a atividade da PR3 pode reduzir a produção de IL-1β nesses pacientes auxiliando no controle da doença.

Essa outra via de produção de IL-1β também pode ser de grande importância em processos inflamatórios agudos, em que os neutrófilos sejam predominantes. A IL-1β possui um importante papel no desenvolvimento da artrite reumatoide. Foi mostrado que animais “*knockout*” para caspase-1 continuam apresentando níveis de IL-1β e quadro clínico comparáveis ao controle na fase aguda da doença, enquanto que na fase crônica, quando não há a participação tão intensa de neutrófilos a produção de IL-1β se torna dependente de caspase-1 (JOOSTEN et al., 2009). Estudar como a AET-7393 interfere na produção dessa citocina pode ajudar no tratamento dessa e de outras doenças em que os neutrófilos estejam presentes.

Nossos resultados mostraram que, ao contrário do que esperávamos, a AET-7393 aumentou a produção de IL-1β de maneira inversamente proporcional à concentração utilizada (Figura 9). Um trabalho recente descreveu que a PR3 apresenta um efeito ambíguo sobre a IL-33. Por um lado, ela se mostrou capaz de clivar a pró-IL-33 em IL-33 ativa, mas por outro, também era responsável por sua posterior degradação (BAE et al., 2012). De fato, nós mostramos que dependendo da dose de PR3 em que os macrófagos fossem incubados, após um período de 4 horas de estimulo com LPS, a presença de IL-1β no sobrenadante celular era indetectável (para as doses mais altas testadas) (Figura 10) sendo um indício de que essa enzima também estaria degradando a IL-1β. Dessa forma o intervalo de tempo (4 horas) escolhido para nosso experimento poderia estar representando diferentes estágios da cinética de ativação e degradação da IL-1β. A presença da serpina inibiria a PR3, diminuindo sua disponibilidade e atrasando a clivagem da citocina, como esquematizado na Figura 17, o que poderia explicar nossos resultados.

Figura 17 - Representação do efeito da serpina AET-7393 sobre a produção de IL-1β por PR3.



Considerando uma mesma concentração de PR3 inicial, a presença de quantidades crescentes de serpina faz com que a ativação, e posterior degradação, da IL-1β sejam atrasadas, provavelmente pela menor disponibilidade de PR3. O t = 4 representa o tempo utilizado em nossos experimentos de cocultura de macrófagos e neutrófilos. Isso explicaria como a menor concentração de serpina testada (1 μM) apresentou nível maior de IL-1β que o controle, enquanto que na maior concentração de serpina (50 μM) a dosagem de IL-1β permaneceu inalterada.

Sabe-se que o sistema de coagulação e o sistema imune estão estritamente ligados. Estímulos inflamatórios também são responsáveis por inibir a produção de anticoagulantes e aumentar a de pró-coagulantes e a reatividade plaquetária, enquanto que a presença de anticoagulantes apresenta um efeito antinflamatório (ESMON, 2003). Dessa forma, devemos considerar nossos resultados a respeito da AET-7393 bloquear a PR3 e interferir na produção de IL-1β como mais uma possível explicação do aumento no sangramento dos animais pela serpina. A PR3 aumentou a atividade do fator tecidual, presente na via extrínseca da cascata de coagulação, em células HUVEC (HAUBITZ et al., 2001). Além disso, apesar de não possuir efeito sobre a ativação plaquetária sozinha, a PR3 apresenta uma atividade potencializadora dessa ativação gerada pela catepsina G ou colágeno (RENESTO et

al., 1994). Ambos os processos são pró-coagulantes, assim, a serpina poderia retardar o tempo de coagulação ao bloquear a atividade da PR3. Da mesma forma, a interferência na produção de IL-1β, pelo bloqueio da PR3 pela AET-7393, também pode estar interferindo na coagulação, já que sua presença induz o aumento da ligação e agregação plaquetária ao subendotélio (SCHORER; WHITE, 1989).

Em relação à produção de anticorpos após o processo de imunização com plasmídeos, nós vimos que tanto os níveis de IgG1 quanto de IgG2a estavam aumentados (Figura 13), mostrando um perfil de resposta mista, Th1 (IgG2a) e Th2 (IgG1). Com esses soros positivos, fomos capazes de padronizar um ensaio para estimar qual seria a quantidade de serpina no EGS de *Ae. aegypti*, concluindo que sua concentração é de aproximadamente 1% do total de proteínas (Figura 15). Esse resultado é superestimado, uma vez que o soro de ambos os animais, que receberam somente o plasmídeo (VR2001-Naked) ou o plasmídeo contendo a serpina (VR2001-Serpin), reconheceram componentes da saliva não relacionados à serpina como pode ser verificado pelo Western Blot (Figura 14).

Como comentado anteriormente, a imunização do hospedeiro com componentes da saliva do mosquito foi capaz de dificultar a alimentação dos mesmos e ainda prejudicar seu ciclo de vida (RAMASAMY et al., 1988; SUTHERLAND; EWEN, 1974). De fato, diversas moléculas de diferentes artrópodes hematófagos, não apenas presentes na saliva, mas também estruturais, têm sido estudadas como candidatos a vacina contra os mesmos (CUPP et al., 2004; MARITZ-OLIVIER et al., 2007; MULENGA; SUGIMOTO; ONUMA, 2000). Porém, nossos resultados mostraram que a imunização contra a serpina não é suficiente para inibir a ingestão de sangue pelo mosquito, ou ainda para interferir na fertilidade e fecundidade dos insetos (Figura 16). A saliva dos artrópodes hematófagos é composta por uma variedade de moléculas com efeitos redundantes (RIBEIRO, 1995) e particularmente no caso das serpinas, o transcriptoma de *Ae. aegypti* indicou a existência de pelo menos 5 sequências de serpinas, sendo que 3 delas provavelmente são genes funcionais. Isso poderia explicar o motivo pelo qual a imunização contra apenas um componente salivar não interferiu nos processos biológicos do ciclo de vida dos mosquitos que foram avaliados.

6 CONCLUSÕES

- A presença da serpina AET-7393 é capaz de interferir no sangramento dos camundongos, embora não possua efeito sobre a cascata de coagulação nas condições testadas;
- A AET-7393 é capaz de bloquear a atividade da PR3;
- A AET-7393 interfere na produção de IL-1β por macrófagos peritoneais residentes coincubados com neutrófilos peritoneais eliciados por tioglicolato;
- A AET-7393 não interfere na inflamação induzida por carragenina ou na produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN-γ;
- A AET-7393 representa cerca de 1% das proteínas encontradas no EGS, porém a presença de anticorpos anti-serpina no hospedeiro não interfere no repasto sanguíneo do mosquito *Ae. aegypti* ou em parâmetros de *fitness* biológico do mosquito.

REFERÊNCIAS*

ADELMAN, Z. N.; JASINSKIENE, N. ; JAMES, A. A. Development and applications of transgenesis in the yellow fever mosquito, Aedes aegypti. **Molecular and biochemical parasitology**; v. 121, n. 1, p. 1-10, 2002.

BAE, S.; KANG, T.; HONG, J.; LEE, S.; CHOI, J.; JHUN, H.; KWAK, A.; HONG, K.; KIM, E.; JO, S. ; KIM, S. Contradictory functions (activation/termination) of neutrophil proteinase 3 enzyme (PR3) in interleukin-33 biological activity. **The Journal of biological chemistry**; v. 287, n. 11, p. 8205-8213, 2012.

BEATTY, K.; BIETH, J. ; TRAVIS, J. Kinetics of association of serine proteinases with native and oxidized alpha-1-proteinase inhibitor and alpha-1-antichymotrypsin. **The Journal of biological chemistry**; v. 255, n. 9, p. 3931-3934, 1980.

BJORK, I. ; LINDAHL, U. Mechanism of the anticoagulant action of heparin. **Molecular and cellular biochemistry**; v. 48, n. 3, p. 161-182, 1982.

BOPPANA, V. D.; THANGAMANI, S.; ADLER, A. J. ; WIKEL, S. K. SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4 T cells to express IL-4. **Parasite immunology**; v. 31, n. 6, p. 287-295, 2009.

BORGMANN, S.; ENDISCH, G.; HACKER, U. T.; SONG, B. S. ; FRICKE, H. Proinflammatory genotype of interleukin-1 and interleukin-1 receptor antagonist is associated with ESRD in proteinase 3-ANCA vasculitis patients. **American journal of kidney diseases : the official journal of the National Kidney Foundation**; v. 41, n. 5, p. 933-942, 2003.

BOTS, M. ; MEDEMA, J. P. Serpins in T cell immunity. **Journal of leukocyte biology**; v. 84, n. 5, p. 1238-1247, 2008.

CALVO, E.; TOKUMASU, F.; MARINOTTI, O.; VILLEVAL, J. L.; RIBEIRO, J. M. ; FRANCISCHETTI, I. M. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. **The Journal of biological chemistry**; v. 282, n. 37, p. 26928-26938, 2007.

CALVO, E.; MIZURINI, D. M.; SA-NUNES, A.; RIBEIRO, J. M.; ANDERSEN, J. F.; MANS, B. J.; MONTEIRO, R. Q.; KOTSYFAKIS, M. ; FRANCISCHETTI, I. M. Alboserpin, a factor Xa inhibitor from the mosquito vector of yellow fever, binds heparin and membrane phospholipids and exhibits antithrombotic activity. **The Journal of biological chemistry**; v. 286, n. 32, p. 27998-28010, 2011.

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CAMPBELL, E. J.; CAMPBELL, M. A. ; OWEN, C. A. Bioactive proteinase 3 on the cell surface of human neutrophils: quantification, catalytic activity, and susceptibility to inhibition. **Journal of immunology**; v. 165, n. 6, p. 3366-3374, 2000.

CHAMPAGNE, D. E. ; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 91, n. 1, p. 138-142, 1994.

CHAMPAGNE, D. E.; SMARTT, C. T.; RIBEIRO, J. M. ; JAMES, A. A. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito Aedes aegypti is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 92, n. 3, p. 694-698, 1995.

CICARDI, M.; ZINGALE, L.; ZANICHELLI, A.; PAPPALARDO, E. ; CICARDI, B. C1 inhibitor: molecular and clinical aspects. **Springer seminars in immunopathology**; v. 27, n. 3, p. 286-298, 2005.

COESHOTT, C.; OHNEMUS, C.; PILYAVSKAYA, A.; ROSS, S.; WIECZOREK, M.; KROONA, H.; LEIMER, A. H. ; CHERONIS, J. Converting enzyme-independent release of tumor necrosis factor alpha and IL-1beta from a stimulated human monocytic cell line in the presence of activated neutrophils or purified proteinase 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 96, n. 11, p. 6261-6266, 1999.

CROSS, M. L.; CUPP, E. W. ; ENRIQUEZ, F. J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of Aedes aegypti. **The American journal of tropical medicine and hygiene**; v. 51, n. 5, p. 690-696, 1994.

CUPP, M. S.; CUPP, E. W.; NAVARRE, C.; WISNEWSKI, N.; BRANDT, K. S.; SILVER, G. M.; ZHANG, D. ; PANANGALA, V. Evaluation of a recombinant salivary gland protein (thrombostasin) as a vaccine candidate to disrupt blood-feeding by horn flies. **Vaccine**; v. 22, n. 17-18, p. 2285-2297, 2004.

CVIRN, G.; GALLISTL, S. ; MUNTEAN, W. Effects of alpha(2)-macroglobulin and antithrombin on thrombin generation and inhibition in cord and adult plasma. **Thrombosis research**; v. 101, n. 3, p. 183-191, 2001.

DAVIE, E. W.; FUJIKAWA, K. ; KISIEL, W. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. **Biochemistry**; v. 30, n. 43, p. 10363-10370, 1991.

DONOVAN, M. J.; MESSMORE, A. S.; SCRAFFORD, D. A.; SACKS, D. L.; KAMHAWI, S. ; MCDOWELL, M. A. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. **Infection and immunity**; v. 75, n. 5, p. 2523-2530, 2007.

DRAKE, T. A.; MORRISSEY, J. H. ; EDGINGTON, T. S. Selective cellular expression of tissue factor in human tissues. Implications for disorders of hemostasis and thrombosis. **The American journal of pathology**; v. 134, n. 5, p. 1087-1097, 1989.

EDWARDS, J. F.; HIGGS, S. ; BEATY, B. J. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. **Journal of medical entomology**; v. 35, n. 3, p. 261-265, 1998.

ESMON, C. T. Inflammation and thrombosis. **Journal of thrombosis and haemostasis : JTH**; v. 1, n. 7, p. 1343-1348, 2003.

FALK, R. J.; TERRELL, R. S.; CHARLES, L. A. ; JENNETTE, J. C. Anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies induce neutrophils to degranulate and produce oxygen radicals in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 87, n. 11, p. 4115-4119, 1990.

FOLK, J. E. ; FINLAYSON, J. S. The epsilon-(gamma-glutamyl)lysine crosslink and the catalytic role of transglutaminases. **Advances in protein chemistry**; v. 31, n., p. 1-133, 1977.

FRANSSEN, C. F.; STEGEMAN, C. A.; KALLENBERG, C. G.; GANS, R. O.; DE JONG, P. E.; HOORNTJE, S. J. ; TERVAERT, J. W. Antiproteinase 3- and antimyeloperoxidase-associated vasculitis. **Kidney international**; v. 57, n. 6, p. 2195-2206, 2000.

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

GOMES, R.; TEIXEIRA, C.; TEIXEIRA, M. J.; OLIVEIRA, F.; MENEZES, M. J.; SILVA, C.; DE OLIVEIRA, C. I.; MIRANDA, J. C.; ELNAIEM, D. E.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. ; BRODSKYN, C. I. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 105, n. 22, p. 7845-7850, 2008.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Archives of medical research**; v. 33, n. 4, p. 330-342, 2002.

GUZMAN, A. ; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **International journal of antimicrobial agents**; v. 36 Suppl 1, n., p. S40-42, 2010.

HAUBITZ, M.; GERLACH, M.; KRUSE, H. J. ; BRUNKHORST, R. Endothelial tissue factor stimulation by proteinase 3 and elastase. **Clinical and experimental immunology**; v. 126, n. 3, p. 584-588, 2001.

HEEB, M. J. ; GRIFFIN, J. H. Physiologic inhibition of human activated protein C by alpha 1-antitrypsin. **The Journal of biological chemistry**; v. 263, n. 24, p. 11613-11616, 1988.

HEUTINCK, K. M.; TEN BERGE, I. J.; HACK, C. E.; HAMANN, J. ; ROWSHANI, A. T. Serine proteases of the human immune system in health and disease. **Molecular immunology**; v. 47, n. 11-12, p. 1943-1955, 2010.

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

HUNG, D. T.; VU, T. K.; WHEATON, V. I.; ISHII, K. ; COUGHLIN, S. R. Cloned platelet thrombin receptor is necessary for thrombin-induced platelet activation. **The Journal of clinical investigation**; v. 89, n. 4, p. 1350-1353, 1992.

ISHIGURO, K.; KOJIMA, T.; KADOMATSU, K.; NAKAYAMA, Y.; TAKAGI, A.; SUZUKI, M.; TAKEDA, N.; ITO, M.; YAMAMOTO, K.; MATSUSHITA, T.; KUSUGAMI, K.; MURAMATSU, T. ; SAITO, H. Complete antithrombin deficiency in mice results in embryonic lethality. **The Journal of clinical investigation**; v. 106, n. 7, p. 873-878, 2000.

JANOFF, A. Elastase in tissue injury. **Annual review of medicine**; v. 36, n., p. 207-216, 1985.

JENNETTE, J. C.; HOIDAL, J. R. ; FALK, R. J. Specificity of anti-neutrophil cytoplasmic autoantibodies for proteinase 3. **Blood**; v. 75, n. 11, p. 2263-2264, 1990.

JOOSTEN, L. A.; NETEA, M. G.; FANTUZZI, G.; KOENDERS, M. I.; HELSEN, M. M.; SPARRER, H.; PHAM, C. T.; VAN DER MEER, J. W.; DINARELLO, C. A. ; VAN DEN BERG, W. B. Inflammatory arthritis in caspase 1 gene-deficient mice: contribution of proteinase 3 to caspase 1-independent production of bioactive interleukin-1beta. **Arthritis and rheumatism**; v. 60, n. 12, p. 3651-3662, 2009.

KALLENBERG, C. G.; HEERINGA, P. ; STEGEMAN, C. A. Mechanisms of Disease: pathogenesis and treatment of ANCA-associated vasculitides. **Nature clinical practice. Rheumatology**; v. 2, n. 12, p. 661-670, 2006.

KAMHAWI, S.; BELKAID, Y.; MODI, G.; ROWTON, E. ; SACKS, D. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science**; v. 290, n. 5495, p. 1351-1354, 2000.

KORKMAZ, B.; LESNER, A.; LETAST, S.; MAHDI, Y. K.; JOURDAN, M. L.; DALLET-CHOISY, S.; MARCHAND-ADAM, S.; KELLENBERGER, C.; VIAUD-MASSUARD, M. C.; JENNE, D. E. ; GAUTHIER, F. Neutrophil proteinase 3 and dipeptidyl peptidase I (cathepsin C) as pharmacological targets in granulomatosis with polyangiitis (Wegener granulomatosis). **Seminars in immunopathology**; v., n., 2013.

LEBOULLE, G.; CRIPPA, M.; DECREM, Y.; MEJRI, N.; BROSSARD, M.; BOLLEN, A. ; GODFROID, E. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from Ixodes ricinus ticks. **The Journal of biological chemistry**; v. 277, n. 12, p. 10083-10089, 2002.

LIMESAND, K. H.; HIGGS, S.; PEARSON, L. D. ; BEATY, B. J. Effect of mosquito salivary gland treatment on vesicular stomatitis New Jersey virus replication and interferon alpha/beta expression in vitro. **Journal of medical entomology**; v. 40, n. 2, p. 199-205, 2003.

LORAND, L. ; KONISHI, K. Activation of the Fibrin Stabilizing Factor of Plasma by Thrombin. **Archives of biochemistry and biophysics**; v. 105, n., p. 58-67, 1964.

MACKIE, M.; BENNETT, B.; OGSTON, D. ; DOUGLAS, A. S. Familial thrombosis: inherited deficiency of antithrombin III. **British medical journal**; v. 1, n. 6106, p. 136-138, 1978.

MANGAN, M. S.; KAISERMAN, D. ; BIRD, P. I. The role of serpins in vertebrate immunity. **Tissue antigens**; v. 72, n. 1, p. 1-10, 2008.

MARITZ-OLIVIER, C.; STUTZER, C.; JONGEJAN, F.; NEITZ, A. W. ; GASPAR, A. R. Tick anti-hemostatics: targets for future vaccines and therapeutics. **Trends in parasitology**; v. 23, n. 9, p. 397-407, 2007.

MARLAR, R. A.; KLEISS, A. J. ; GRIFFIN, J. H. Mechanism of action of human activated protein C, a thrombin-dependent anticoagulant enzyme. **Blood**; v. 59, n. 5, p. 1067-1072, 1982.

MONROE, D. M. ; HOFFMAN, M. The coagulation cascade in cirrhosis. **Clinics in liver disease**; v. 13, n. 1, p. 1-9, 2009.

MULENGA, A.; SUGIMOTO, C. ; ONUMA, M. Issues in tick vaccine development: identification and characterization of potential candidate vaccine antigens. **Microbes and infection / Institut Pasteur**; v. 2, n. 11, p. 1353-1361, 2000.

MULGREW, A. T.; TAGGART, C. C. ; MCELVANEY, N. G. Alpha-1-antitrypsin deficiency: current concepts. **Lung**; v. 185, n. 4, p. 191-201, 2007.

NAYAR, J. K. ; SAUERMAN, D. M., JR. The effects of nutrition on survival and fecundity in Florida mosquitoes. Part 3. Utilization of blood and sugar for fecundity. **Journal of medical entomology**; v. 12, n. 2, p. 220-225, 1975.

NUTTALL, P. A. ; LABUDA, M. Tick-host interactions: saliva-activated transmission. **Parasitology**; v. 129 Suppl, n., p. S177-189, 2004.

OLSON, S. T.; RICHARD, B.; IZAGUIRRE, G.; SCHEDIN-WEISS, S. ; GETTINS, P. G. Molecular mechanisms of antithrombin-heparin regulation of blood clotting proteinases. A paradigm for understanding proteinase regulation by serpin family protein proteinase inhibitors. **Biochimie**; v. 92, n. 11, p. 1587-1596, 2010.

OSTERUD, B. ; RAPAPORT, S. I. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 74, n. 12, p. 5260-5264, 1977.

PONLAWAT, A. ; HARRINGTON, L. C. Blood feeding patterns of Aedes aegypti and Aedes albopictus in Thailand. **Journal of medical entomology**; v. 42, n. 5, p. 844-849, 2005.

PREVOT, P. P.; ADAM, B.; BOUDJELTIA, K. Z.; BROSSARD, M.; LINS, L.; CAUCHIE, P.; BRASSEUR, R.; VANHAEVERBEEK, M.; VANHAMME, L. ; GODFROID, E. Anti-hemostatic effects of a serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus. **The Journal of biological chemistry**; v. 281, n. 36, p. 26361-26369, 2006.

PREVOT, P. P.; BESCHIN, A.; LINS, L.; BEAUFAYS, J.; GROSJEAN, A.; BRUYS, L.; ADAM, B.; BROSSARD, M.; BRASSEUR, R.; ZOUAOUI BOUDJELTIA, K.; VANHAMME, L. ; GODFROID, E. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick Ixodes ricinus. **The FEBS journal**; v. 276, n. 12, p. 3235-3246, 2009.

RAMASAMY, M. S.; RAMASAMY, R.; KAY, B. H. ; KIDSON, C. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of Aedes aegypti. **Medical and veterinary entomology**; v. 2, n. 1, p. 87-93, 1988.

RAO, L. V. ; RAPAPORT, S. I. Activation of factor VII bound to tissue factor: a key early step in the tissue factor pathway of blood coagulation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**; v. 85, n. 18, p. 6687-6691, 1988.

REMOUE, F.; CISSE, B.; BA, F.; SOKHNA, C.; HERVE, J. P.; BOULANGER, D. ; SIMONDON, F. Evaluation of the antibody response to Anopheles salivary antigens as a potential marker of risk of malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**; v. 100, n. 4, p. 363-370, 2006.

RENESTO, P.; HALBWACHS-MECARELLI, L.; NUSBAUM, P.; LESAVRE, P. ; CHIGNARD, M. Proteinase 3. A neutrophil proteinase with activity on platelets. **Journal of immunology**; v. 152, n. 9, p. 4612-4617, 1994.

RIBEIRO, J. M.; SARKIS, J. J.; ROSSIGNOL, P. A. ; SPIELMAN, A. Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**; v. 79, n. 1, p. 81-86, 1984.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**; v. 32, n., p. 463-478, 1987.

RIBEIRO, J. M. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? **Infectious agents and disease**; v. 4, n. 3, p. 143-152, 1995.

RIBEIRO, J. M.; ARCA, B.; LOMBARDO, F.; CALVO, E.; PHAN, V. M.; CHANDRA, P. K. ; WIKEL, S. K. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, Aedes aegypti. **BMC genomics**; v. 8, n., p. 6, 2007.

RIBEIRO, J. M.; MANS, B. J. ; ARCA, B. An insight into the sialome of blood-feeding Nematocera. **Insect biochemistry and molecular biology**; v. 40, n. 11, p. 767-784, 2010.

ROSENBERG, R. D. ; DAMUS, P. S. The purification and mechanism of action of human antithrombin-heparin cofactor. **The Journal of biological chemistry**; v. 248, n. 18, p. 6490-6505, 1973.

SCHNEIDER, B. S.; SOONG, L.; GIRARD, Y. A.; CAMPBELL, G.; MASON, P. ; HIGGS, S. Potentiation of West Nile encephalitis by mosquito feeding. **Viral immunology**; v. 19, n. 1, p. 74-82, 2006.

SCHNEIDER, B. S.; MCGEE, C. E.; JORDAN, J. M.; STEVENSON, H. L.; SOONG, L. ; HIGGS, S. Prior exposure to uninfected mosquitoes enhances mortality in naturally-transmitted West Nile virus infection. **PloS one**; v. 2, n. 11, p. e1171, 2007.

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

SCHORER, A. E. ; WHITE, J. G. Interleukin 1 enhances arterial thrombogenicity in vitro. **Thrombosis research**; v. 56, n. 4, p. 515-522, 1989.

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. **The Journal of biological chemistry**; v. 273, n. 33, p. 20802-20809, 1998.

STYER, L. M.; BERNARD, K. A. ; KRAMER, L. D. Enhanced early West Nile virus infection in young chickens infected by mosquito bite: effect of viral dose. **The American journal of tropical medicine and hygiene**; v. 75, n. 2, p. 337-345, 2006.

SUTHERLAND, G. B. ; EWEN, A. B. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **Journal of insect physiology**; v. 20, n. 4, p. 655-660, 1974.

TITUS, R. G. ; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly Lutzomyia longipalpis enhance Leishmania infectivity. **Science**; v. 239, n. 4845, p. 1306-1308, 1988.

TITUS, R. G. ; RIBEIRO, J. M. The role of vector saliva in transmission of arthropod-borne disease. **Parasitology today**; v. 6, n. 5, p. 157-160, 1990.

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

TOLLEFSEN, D. M.; MAJERUS, D. W. ; BLANK, M. K. Heparin cofactor II. Purification and properties of a heparin-dependent inhibitor of thrombin in human plasma. **The Journal of biological chemistry**; v. 257, n. 5, p. 2162-2169, 1982.

TRACY, P. B.; ROHRBACH, M. S. ; MANN, K. G. Functional prothrombinase complex assembly on isolated monocytes and lymphocytes. **The Journal of biological chemistry**; v. 258, n. 12, p. 7264-7267, 1983.

VALENZUELA, J. G.; PHAM, V. M.; GARFIELD, M. K.; FRANCISCHETTI, I. M. ; RIBEIRO, J. M. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito Aedes aegypti. **Insect biochemistry and molecular biology**; v. 32, n. 9, p. 1101-1122, 2002.

VAN DER GELD, Y. M.; LIMBURG, P. C. ; KALLENBERG, C. G. Proteinase 3, Wegener's autoantigen: from gene to antigen. **Journal of leukocyte biology**; v. 69, n. 2, p. 177-190, 2001.

WASSERMAN, H. A.; SINGH, S. ; CHAMPAGNE, D. E. Saliva of the Yellow Fever mosquito, Aedes aegypti, modulates murine lymphocyte function. **Parasite immunology**; v. 26, n. 6-7, p. 295-306, 2004.

WEAVER, S. C. ; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral research**; v. 85, n. 2, p. 328-345, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Chikungunya2008. Fact sheet N°327.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control : new edition. Geneva, World Health Organization. 2009

YANG, J. J.; PRESTON, G. A.; PENDERGRAFT, W. F.; SEGELMARK, M.; HEERINGA, P.; HOGAN, S. L.; JENNETTE, J. C. ; FALK, R. J. Internalization of proteinase 3 is concomitant with endothelial cell apoptosis and internalization of myeloperoxidase with generation of intracellular oxidants. **The American journal of pathology**; v. 158, n. 2, p. 581-592, 2001.

ZEIDNER, N. S.; HIGGS, S.; HAPP, C. M.; BEATY, B. J. ; MILLER, B. R. 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 immunology**; v. 21, n. 1, p. 35-44, 1999.