PRISCILA GUIRÃO LARA

**AeMOPE-1: UM NOVO PEPTÍDEO IMUNOMODULADOR
SALIVAR DE *Aedes aegypti* COM POTENCIAL
TERAPÊUTICO NA COLITE EXPERIMENTAL**

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

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

São Paulo
2017

RESUMO

LARA, P. G. **AeMOPE-1: um novo peptídeo imunomodulador salivar de *Aedes aegypti* com potencial terapêutico na colite experimental.** 2017. 121 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Os mosquitos representam o grupo mais importante de vetores de doenças infecciosas para o homem. Para realizar o repasto sanguíneo com sucesso e assim adquirir os nutrientes necessários para a maturação dos ovos, as fêmeas desses vetores desenvolveram componentes com atividades anti-hemostáticas e imunomoduladoras em sua saliva. Em decorrência dessas atividades biológicas, as moléculas salivares são também capazes de facilitar a transmissão de patógenos causadores de doenças. Com o intuito de entender como essas moléculas atuam no hospedeiro vertebrado, o objetivo do presente estudo foi investigar as possíveis atividades imunomoduladoras de um peptídeo de 7,8 kDa descrito no salivoma de *Aedes aegypti*, diferencialmente expresso entre machos e fêmeas, cujo papel biológico ainda é desconhecido. Ensaios de “Western Blot” utilizando o soro de animais imunizados com o peptídeo sintético confirmaram a presença de uma banda reativa com o tamanho esperado no extrato de glândula salivar de fêmeas do mosquito. A avaliação inicial realizada em uma plataforma de ensaios biológicos revelou que o peptídeo não afeta a proliferação de linfócitos T, a maturação de células dendríticas ou a desgranulação de mastócitos. Porém, o peptídeo foi capaz de inibir a produção dos mediadores pró-inflamatórios óxido nítrico, IL-6, IL-12p40, CCL2 e em macrófagos ativados com LPS e IFN- γ . Essa modulação se correlacionou com a diminuição da expressão intracelular de iNOS e COX-2 e a fosforilação da subunidade p65 do NF- κ B. A imunização de camundongos com o peptídeo induziu altos títulos de anticorpos séricos da subclasse IgG1 e a estimulação *in vitro* de esplenócitos desses animais com o peptídeo induziu produção das citocinas IL-4 e IL-5, caracterizando assim uma típica resposta do perfil Th2. Em função desses resultados, o peptídeo foi denominado AeMOPE-1 (do inglês “*Aedes-specific modulatory peptide*”). Sabendo das ações imunomoduladoras do AeMOPE-1, sua potencial ação terapêutica no tratamento da colite experimental foi investigada. Observou-se uma melhora significativa nos sinais clínicos e nos parâmetros pós-morte da doença no grupo tratado com AeMOPE-1, que se correlacionaram com a diminuição do número total de leucócitos no sangue periférico, especificamente das populações de linfócitos, neutrófilos e monócitos, e com a diminuição da expressão das citocinas IL-6, IFN- γ e CCL2 nos intestinos dos animais. Desse modo, é possível concluir que o peptídeo salivar AeMOPE-1 é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro vertebrado, interferindo na biologia de macrófagos, assim como por meio da polarização da resposta de células T para o perfil Th2. Além disso, o AeMOPE-1 demonstrou ter uma potencial ação terapêutica no tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Saliva. AeMOPE-1. Macrófagos. Doença Inflamatória Intestinal.

ABSTRACT

LARA, P. G. **AeMOPE-1: a novel salivary immunomodulatory peptide of *Aedes aegypti* with therapeutic potential in experimental colitis**. 2017. 121 p. Doctoral thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Mosquitoes are the most important group of infectious disease vectors to humans. To successfully obtain the blood meal and thus acquire the required nutrients for the maturation of the eggs, the females of these vectors developed components with anti-hemostatic and immunomodulatory activities in their saliva. Because of their biological activities, the salivary molecules are also able to facilitate the transmission of pathogens that cause diseases. In order to understand how these molecules act on the vertebrate host, the aim of the present project was to investigate the putative immunomodulatory activities of a 7.8 kDa peptide described in the salivome of *Aedes aegypti*, and differentially expressed between males and females, with unknown biological role. Western Blot assays employing the serum of animals immunized with the synthetic peptide confirmed the presence of a reactive band with the expected size in the salivary gland extract of mosquito females. An initial evaluation performed in a platform of biological assays revealed that the peptide does not affect the proliferation of T lymphocytes, the maturation of dendritic cells, or the mast cell degranulation. However, the peptide was capable of inhibiting the production of proinflammatory mediators such as nitric oxide, IL-6, IL-12p40, CCL2 and PGE₂ in macrophages activated by such LPS plus IFN- γ . This modulation correlated to a diminished intracellular expression of iNOS and COX-2, and of the phosphorylation of NF- κ B p65 subunit. The immunization of mice with the peptide induced high titles of seric IgG1 subclass and the *in vitro* stimulation of spleen cells with the peptide induced the production of IL-4 and IL-5, showing a typical Th2 response. Based on these results, the peptide was named as *Aedes*-specific modulatory peptide (AeMOPE-1). Knowing the immunomodulatory activity of AeMOPE-1, its potential therapeutic role on the treatment of the experimental inflammatory bowel disease was investigated. It was observed an improvement in clinical symptoms and post-mortem disease parameters. A significant improvement in the clinical signs and in the post-mortem parameters of the disease was observed, which correlated to the decrease in the total number of peripheral blood leukocytes, specifically lymphocytes, neutrophils and monocytes, and also to the diminished expression of IL-6, IFN- γ and CCL2 in the colon of the animals. Thereby, it is possible to conclude that the AeMOPE-1 salivary peptide is able to modulate the vertebrate host immune response by interfering with macrophage biology, as well as polarizing the T cell immune response of the vertebrate host toward a Th2 profile. In addition, AeMOPE-1 demonstrates a potential therapeutic action to the treatment of inflammatory diseases.

Keywords: *Aedes aegypti*. Saliva. AeMOPE-1. Macrophages. Inflammatory Bowel Disease

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características gerais do mosquito *Aedes aegypti*

Os mosquitos são insetos pertencentes à Ordem Diptera e à Família Culicidae (do latim mosquito), podendo também ser conhecidos como pernilongos, muriçocas ou carapañas. Os adultos são terrestres, possuem um par de asas e antenas e três pares de patas, enquanto as fases imaturas são aquáticas. Os mosquitos são insetos holometábolos, ou seja, apresentam metamorfose completa em seu ciclo de vida, o qual é dividido nas fases de ovo, quatro estágios larvais, pupa e adulto (Figura 1).

Figura 1- Fases do desenvolvimento do mosquito *A. aegypti*. O ciclo do mosquito se divide em 4 estágios larvais e um estágio de pupa, ambos aquáticos e a fase adulta terrestre.

Fonte: <http://deolhonoaedesaeegypti.blogspot.com.br/p/ciclo-de-vida.html> - acesso em 12/04/2017

Até meados do século XVIII, pouco se conhecia sobre o ciclo biológico dos mosquitos e acreditava-se que o único desconforto causado por esses insetos era a reação cutânea causada por sua picada. Apenas no final do século XIX, após a descoberta de que doenças como filariose e malária eram transmitidas por esses insetos, iniciaram-se estudos mais detalhados sobre a biologia, sistemática e história natural desses vetores com o propósito de combatê-los (CONSOLI; OLIVEIRA,

1994). Nesse contexto, dentre os mosquitos de importância médica, a espécie *Aedes aegypti* é a melhor caracterizada. A espécie foi descrita por Linnaeus em 1762 e apesar do seu surgimento ter sido descrito originalmente no Egito, por isso o nome “*aegypti*” (que vem do latim “do Egito”), seus ancestrais surgiram na África subsaariana e a partir dali dispersaram-se para as regiões tropicais e subtropicais acompanhando a migração do homem pelo mundo. Foram transportados dentro de navios durante o tráfico de escravos e foram capazes de se estabelecer nos locais em que as condições antrópicas permitiram a sua domesticação e proliferação. Não se sabe ao certo se o processo de “domesticação” desses insetos tenha ocorrido em resposta ao seu transporte durante a migração do homem, ou após serem introduzidos em novos habitats, sendo selecionados apenas os mais adaptados a viver em condições antrópicas (POWELL; TABACHNICK, 2013). Outros fatores que proporcionaram a disseminação e expansão do *A. aegypti* pelo mundo foram a grande expansão geográfica de algumas nações, a urbanização rápida e descontrolada, o crescimento populacional exacerbado, assim como sistemas ineficientes de controle do vetor (WERE, 2012; WILDER-SMITH et al., 2010). O desenvolvimento do *A. aegypti* da eclosão do ovo até a fase adulta em condições favoráveis de temperatura e umidade dura aproximadamente 10 dias. Os ovos são elípticos, no momento da postura são brancos, mas rapidamente adquirem coloração negra e medem menos que 1 mm, sendo que os embriões necessitam de 2 a 3 dias para seu desenvolvimento antes da eclosão (NELSON, 1986). As larvas emergem logo após o contato com a água e são organismos filtrantes e exclusivamente aquáticos, alimentando-se apenas de matéria orgânica, possuem grande mobilidade e passam por quatro estágios de desenvolvimento (L1 a L4) até se transformarem em pupas. O estágio de pupa corresponde o período de transição do meio aquático (larva) para o terrestre (adulto) e dura de 1 a 3 dias. O adulto possui coloração geralmente escura e com escamas ornamentais que formam listras brancas ao longo do seu corpo, composto por cabeça, tórax e abdômen, são de hábito diurno e possuem comportamento antropofílico e sinantrópico. Os machos adultos emergem um dia antes das fêmeas, sendo que assim que estas emergem já estão aptas para a cópula. Os machos são atraídos pelo som emitido pelas batidas das asas das fêmeas, e a cópula ocorre durante o voo (CHRISTOPHERS, 1960; FORATTINI, 2002).

Tanto mosquitos machos quanto as fêmeas se alimentam de néctar ou qualquer fonte açucarada, mas somente as fêmeas possuem hábito hematofágico. As fêmeas se alimentam de sangue para obter os nutrientes necessários para vitelogênese (desenvolvimento dos ovos), sendo considerados animais anautógenos, ou seja, a maturação completa dos oócitos só ocorre após um ou mais repastos sanguíneos (CHRISTOPHERS, 1960; FORATTINI, 2002). A vitelogênese é o evento mais importante durante o processo de reprodução dos mosquitos. Após o repasto sanguíneo, é gerado um sinal no intestino da fêmea, o qual é transmitido para o cérebro, que em resposta produz e libera um hormônio chamado hormônio ecdisteroidogênico ovariano, que estimula os ovários a produzir e liberar outro hormônio ecdisteróide chamado ecdisona. A ecdisona por sua vez é metabolizada no corpo gorduroso (órgão funcionalmente análogo ao fígado dos vertebrados) e convertida em 20-hidroxieclicdisona, a qual ativa a expressão de genes responsáveis pela síntese de proteínas que compõem o vitelo. Essas proteínas após serem sintetizadas no corpo gorduroso são liberadas na hemolinfa e transportadas aos ovários aonde são incorporadas aos oócitos em desenvolvimento (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; RAIKHEL et al., 2002).

Devido ao seu hábito hematofágico e a sua alta capacidade reprodutiva, os mosquitos da espécie *A. aegypti* se tornaram excelentes vetores de patógenos causadores de doenças humanas (ATTARDO; HANSEN; RAIKHEL, 2005; BLACK IV et al., 2002; TOLLE, 2009). A preferência pela alimentação de sangue humano é outro fator que contribui para que o *A. aegypti* seja um vetor eficiente de arboviroses. Estudos demonstraram que fêmeas que vivem em contato com a população humana se alimentam preferencialmente de sangue humano e não de outros vertebrados, pois a sua composição confere benefícios na síntese de reservas energéticas, além de promover vantagens no “*fitness*” biológico do mosquito, como o aumento do tamanho corporal, tempo de sobrevivência e fecundidade das fêmeas (HARRINGTON; EDMAN; SCOTT, 2001). Outro fator muito importante e que possui papel essencial na capacidade vetorial do *A. aegypti* é a sua susceptibilidade a infecções virais. Apesar desses insetos possuírem diversas barreiras que impeçam a infecção e replicação viral, os patógenos são capazes de evadir tais barreiras e completar seu ciclo de vida no corpo do mosquito. Para que a infecção ocorra e os patógenos sejam transmitidos é necessário que os mesmos sejam capazes de infectar as células epiteliais do intestino, replicarem-se, ultrapassarem a membrana peritrofica e

lâmina basal do intestino até atingir a hemocoele e por meio da hemolinfa, infectar as glândulas salivares para serem transmitidos em um posterior repasto sanguíneo (BLACK IV et al., 2002; TOLLE, 2009). A membrana peritrófica é composta por um material quitinoso secretado pelas células epiteliais do intestino, sendo inicialmente grossa e viscosa e solidificando-se em uma camada fina e não elástica pouco tempo após a ingestão de sangue. Quando ocorre a ingestão de substâncias açucaradas a membrana peritrófica não é formada. Essa camada é permeável às enzimas digestivas e aos produtos digestivos. A formação da membrana peritrófica está diretamente relacionada à resistência ou susceptibilidade às infecções por parasitas (RICHARDS; RICHARDS, 1977).

Os mosquitos *A. aegypti* são vetores primários de arbovírus causadores de doenças importantes como Febre Amarela, Dengue, Chikungunya e Zika, as quais são responsáveis por causar altas taxas de mortalidade e morbidade na população humana, representando um problema mundial de saúde pública (WERE, 2012; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). A febre amarela é endêmica de regiões tropicais da África e da América do Sul e apesar da disponibilidade de uma vacina eficaz há quase 70 anos, a doença ainda ameaça moradores de áreas endêmicas (MONATH; VASCONCELOS, 2015). Atualmente o Brasil vive o maior surto de Febre Amarela observado nos últimos anos, com casos diagnosticados nos estados da região Sudeste, principalmente em Minas Gerais e no Espírito Santo. De dezembro de 2016 até março de 2017 já foram notificados pelo Ministério da Saúde cerca de 1500 casos com 264 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Nos últimos 50 anos, a incidência de infecções pelo vírus da Dengue aumentou cerca de 30 vezes e estima-se que ocorram anualmente por volta de 50 milhões de casos da doença em todo o mundo e que aproximadamente 2,5 bilhões de pessoas vivam em áreas de risco (GUBLER, 2002; MESSINA et al., 2014). A doença foi introduzida no Brasil na década de 1980 e desde então todos os anos são registrados números crescentes de casos de infecções (NOGUEIRA; DE ARAÚJO; SCHATZMAYR, 2007; TEIXEIRA et al., 2013). Somente no ano de 2016 foram confirmados cerca de 800.400 casos, com 244 casos graves, dentre estes 140 óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A febre Chikungunya, também endêmica em algumas regiões da África, tem se tornado uma preocupação para Organização Mundial da Saúde (OMS), devido aos casos recentes ocorridos na Ásia, África e em alguns países da Europa (LO PRESTI et al., 2014; THIBOUTOT et al., 2010). Nas Américas a doença emergiu no final do

ano de 2013 e anualmente são notificados cerca de 1,1 milhões de casos, incluindo casos severos e óbitos (YACTAYO et al., 2016).

A Zika, também causada por um arbovírus emergente correlato ao vírus da Dengue, possui um ciclo epidemiológico e de transmissão em áreas urbanas também semelhantes a este vírus. Os sintomas clínicos apresentados pelos pacientes infectados não são específicos e podem ser confundidos com sintomas de Dengue ou Chikungunya, em geral mais amenos. Porém, estudos recentes demonstraram que a infecção pelo vírus Zika está associada a quadros graves de má formação congênita, como microcefalia e também está associado a problemas neurológicos, como a síndrome de Guillain-Barré (CUGOLA et al., 2016; TILAK et al., 2016). O vírus Zika foi isolado pela primeira vez em 1947 em Uganda na África e entre os anos de 2013 e 2014 foi relatada a primeira grande epidemia na Polinésia Francesa (MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). No Brasil, a doença foi introduzida recentemente e somente em 2016, de um total de 31.616 casos suspeitos, foram confirmados 2.844 casos de Zika em gestantes. No último boletim epidemiológico divulgado pelo ministério da saúde foram confirmados cerca de 940 casos de microcefalia associados à infecção pelo vírus Zika (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

1.2 Papel da saliva de *A. aegypti* na hematofagia

Os artrópodes representam o maior Filo dentro do Reino Animalia com uma riqueza global de mais de 10 milhões de espécies até o momento, representando mais de 60% de todas as espécies atualmente conhecidas (GRIENEISEN et al., 2014). O hábito hematofágico surgiu e evoluiu de maneira independente em aproximadamente 14.000 espécies de 400 gêneros e de 5 ordens distintas entre o final do período Jurássico e início do Cretáceo (200 a 150 milhões de anos) (ADAMS, 1999; MANS, 2011). Durante o processo evolutivo esses animais tiveram que desenvolver adaptações morfológicas, comportamentais e bioquímicas para que os tornassem capazes de obter sangue de seus hospedeiros vertebrados (FONTAINE et al., 2011a; RIBEIRO; ROSSIGNOL; SPIELMAN, 1984). Fisiologicamente, além de estar envolvida na lubrificação das peças bucais, a saliva auxilia na ingestão, solubilização e metabolização dos açúcares obtidos, que são a fonte de energia necessária para manutenção do metabolismo basal, sustentação do vôo (para os artrópodes alados) e sobrevivência (MARINOTTI; JAMES, 1990;

RIBEIRO, 1987). No caso dos artrópodes hematófagos, a saliva é o elemento de interação entre esses organismos e seus hospedeiros vertebrados e por isso adquiriu funções adicionais durante o processo evolutivo. Ao nível molecular, uma grande diversidade de componentes com ações farmacológicas foi selecionada, permitindo com que esses animais se tornassem capazes de lidar com as barreiras apresentadas pela fisiologia do hospedeiro vertebrado e obtivessem sucesso na aquisição de sangue durante o repasto (RIBEIRO, 2000). Dessa forma, a saliva representa uma mistura rica em compostos com propriedades anti-hemostáticas, anti-inflamatórias e imunomoduladoras (RIBEIRO; ROSSIGNOL; SPIELMAN, 1985).

1.2.1 Atividades anti-hemostáticas da saliva de *A. aegypti*

A hemostasia é uma resposta do hospedeiro vertebrado, altamente sofisticada e eficiente, que limita ou interrompe a perda de sangue em decorrência de injúrias nos vasos sanguíneos. Essa resposta consiste em processos redundantes, os quais são responsáveis pela agregação de plaquetas, coagulação sanguínea e vasoconstrição. Sendo a hemostasia uma das principais barreiras encontradas pelos artrópodes hematófagos para realizar o repasto sanguíneo, os mesmos desenvolveram em sua saliva substâncias com potentes ações anti-agregante de plaquetas, vasodilatadoras e anti-coagulantes (CHAMPAGNE, 2006; FONTAINE et al., 2011a; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Nesse contexto, mosquitos fêmeas de *A. aegypti* possuem em sua saliva uma série de moléculas com as atividades supracitadas, pois como já foi dito, necessitam se alimentar de sangue para maturar e desenvolver seus ovos (ANDRADE et al., 2005; MARINOTTI; JAMES, 1990; RIBEIRO, 2000). Dentre as moléculas já descritas estão os inibidores de agregação plaquetária como a enzima apirase (ATP-difosfohidrolase). Essa enzima possui a capacidade de inibir a agregação de plaquetas através da hidrólise de ATP e ADP liberados por plaquetas ativadas e células endoteliais lesadas (CHAMPAGNE et al., 1995; RENO; NOVAK, 2005; RIBEIRO et al., 1984). A apirase está presente em abundância em glândulas salivares de fêmeas adultas. Porém, em machos adultos, os quais não se alimentam de sangue, o equivalente a apenas 5% da enzima está presente em sua saliva, indicando o papel fundamental dessa molécula na hematofagia (RIBEIRO et al., 1984). O gene que codifica a apirase é altamente expresso 4 dias após o surgimento do adulto e permanece alta após alimentação (SMARTT, et al., 1995). Outro inibidor salivar de agregação plaquetária

é a aegyptina, proteína membro da família de alérgenos de 30 kDa de *A. aegypti*. Essa molécula bloqueia a agregação plaquetária induzida por colágeno, sendo capaz de se ligar a integrina $\alpha 2\beta 1$ expressa na membrana das plaquetas impedindo que as mesmas se liguem ao colágeno presente no endotélio vascular. A aegyptina é capaz de se ligar a mais duas outras moléculas, a glicoproteína VI e ao fator de von Willebrand expressas pelas plaquetas e que também estão envolvidas no processo de agregação plaquetária (CALVO et al., 2007). A presença da aegyptina na saliva se mostrou importante para a alimentação, uma vez que mosquitos transgênicos, submetidos ao silenciamento gênico dessa proteína necessitaram de um tempo maior para procura do vaso sanguíneo além de ingerirem um volume menor de sangue quando comparados com mosquitos controles alimentados em camundongos (CHAGAS et al., 2014). A atividade vasodilatadora se deve à presença das sialocininas I e II (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992), peptídeos com massa molecular de aproximadamente 1400 Da. As sialocininas pertencem à família das taquicininas, que compreende peptídeos biologicamente ativos que compartilham a sequência carboxiterminal comum (Phe-X-Gly-Leu-Met-NH₂) e que possuem uma grande variedade de atividades biológicas em diferentes tecidos como o nervoso, gastrointestinal, vascular, respiratório, geniturinário e glandular (NAKANISHI, 1991). Com atividade anticoagulante, já foi descrito um inibidor de serino–protease (serpina) do tipo Kazal na saliva, denominado AaTI (*A. aegypti trypsin inhibitor*). Essa molécula tem massa molecular de aproximadamente 7 kDa e é capaz de se ligar a trombina aumentando, conseqüentemente, o tempo de protrombina, atuando diretamente na via extrínseca da coagulação (WATANABE et al., 2010, 2011). Outra serpina com ação anticoagulante foi denominada AFXa (*Anticoagulant-factor Xa*), possui aproximadamente 48 kDa e é capaz de se ligar ao fator Xa da coagulação (STARK; JAMES, 1995, 1998).

Em resumo, o esquema a seguir ilustra os diferentes processos hemostáticos e o local de atuação das moléculas salivares com ações anti-hemostáticas de *A. aegypti* descritas até o momento (Figura 2).

Figura 2- Representação esquemática das ações anti-hemostáticas da saliva de *A. aegypti*. (1) A molécula apirase hidrolisa o ADP e ATP liberados pelas plaquetas ativadas e a molécula aegyptina se liga à glicoproteína VI (GPVI) e integrina $\alpha 2\beta 1$, ambas impedindo a agregação plaquetária. (2) A sialocininas I e II, moléculas pertencentes à família das taquicininas agem no endotélio vascular causando vasoconstrição. (3) A molécula AFXa se liga ao fator X ativo e a molécula AaTI se liga à trombina impedindo a coagulação sanguínea.

1.2.2 Atividades imunomoduladoras da saliva de *A. aegypti*

Assim como os componentes com atividades anti-hemostáticas, a saliva dos artrópodes hematófagos possui também diversas moléculas com ações imunomoduladoras. A presença dessas atividades é o reflexo da interligação e sobreposição das respostas hemostáticas, imunes e inflamatórias dos hospedeiros vertebrados e da necessidade inerente de impedir com que estas barreiras impeçam o sucesso da alimentação (SCHNEIDER; HIGGS, 2008). A duração da alimentação pode variar muito entre os artrópodes hematófagos, levando desde alguns minutos em mosquitos, pulgas e flebótomos, horas em carrapatos moles ou até semanas em carrapatos duros. Claramente, os artrópodes que levam mais tempo para se alimentarem necessitam lidar adicionalmente com as respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro, dessa maneira a saliva desses organismos necessitam de fatores adicionais para evadir tais barreiras, o que vem sendo comprovado nos trabalhos de transcriptomas de glândulas salivares de carrapatos (ANATRIELLO et al., 2010; GARCIA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2011; VALENZUELA et al., 2002a).

Menos óbvio é o fato de que mesmo com uma alimentação tão rápida como no caso dos mosquitos, moléculas salivares com atividades imunomoduladoras terem surgido ao longo da evolução. Acredita-se que essas moléculas se desenvolveram para benefício em longo prazo da população e não de um único indivíduo no momento da alimentação, uma vez que o hospedeiro é picado inúmeras vezes ao longo da sua vida e por um grande número de indivíduos (GILLESPIE; MBOW; TITUS, 2000; SCHNEIDER; HIGGS, 2008). De maneira a fundamentar esta hipótese, um estudo demonstrou a diminuição da taxa de fecundidade de fêmeas adultas de *A. aegypti* após se alimentarem em coelhos imunizados com o homogenato de mosquitos em emulsão de adjuvante (SUTHERLAND; EWEN, 1974).

Apesar de se conhecer a capacidade imunomoduladora da saliva de *A. aegypti*, a literatura a respeito deste assunto ainda é escassa e pouco se sabe sobre as moléculas responsáveis por tais atividades. Dentre as atividades já conhecidas, sabe-se que o extrato da glândula salivar (EGS) de *A. aegypti* fêmeas é capaz de inibir a produção de TNF- α por mastócitos peritoneais de rato, não afetando a desgranulação e liberação de histamina induzida por antígeno nessas células (BISSONNETTE, et al., 1993). Já foi descrito também que o EGS é capaz de inibir a proliferação policlonal de linfócitos T estimulados com concanavalina A (Con A) e a produção de IL-2, assim como inibir a proliferação antígeno específica de linfócitos T de camundongos da linhagem DO11.10 estimulados com OVA. Porém, o EGS não é capaz de afetar a proliferação de linfócitos B estimulados com LPS (CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). Um trabalho do nosso grupo demonstrou que a inibição da proliferação de linfócitos T induzida pelo EGS é devido a indução da apoptose dessa população celular mediada pela ativação de caspase-3 e de caspase-8 (BIZZARRO et al., 2013). A produção de citocinas do perfil Th1 (IFN- γ e IL-2) e pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF- α) também são inibidas pelo EGS, porém as citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-5) são pouco afetadas (CROSS; CUPP; ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN; SINGH; CHAMPAGNE, 2004). Outra atividade encontrada na saliva de *A. aegypti* é a sua indução da polarização da resposta imune para um perfil Th2. Alguns trabalhos demonstraram o aumento dos níveis séricos de anticorpos do tipo Th2 (IgE e IgG1) em camundongos expostos a sucessivas picadas, imunizados

com alérgenos ou com EGS do mosquito (BARROS et al., 2016; CHEN; SIMONS; PENG, 1998; PENG; SIMONS, 1998, 2004). Além do aumento da produção de anticorpos de perfil Th2, também já foi demonstrado que esplenócitos de animais expostos às picadas de *A. aegypti* produziram níveis maiores das citocinas IL-4 e menores de IFN- γ (CHEN; SIMONS; PENG, 1998). Nesse sentido, uma molécula denominada SAAG-4, presente na saliva de *A. aegypti* foi identificada como um fator capaz de programar a diferenciação de células T CD4⁺ para o padrão Th2, por meio da indução da expressão de IL-4 (BOPPANA et al., 2009). Outra molécula presente na saliva, a sialocinina I, descrita anteriormente como potente vasodilatador, também possui atividade imunomoduladora. Ela é capaz de reduzir citocinas do tipo Th1 (IFN- γ e IL-2) e aumentar a produção de citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-10) (ZEIDNER et al., 1999). Por outro lado, o EGS de *A. aegypti* não é capaz de afetar a diferenciação, maturação e função de células dendríticas derivadas de medula óssea de camundongos (BIZZARRO et al., 2013), assim como não é capaz de alterar a expressão de moléculas de superfície envolvidas nas funções dessas células (CD40, CD83 e MHC de classe I e de classe II) em células dendríticas mielóides humanas infectadas com vírus da Dengue (ADER et al., 2004).

Os artrópodes hematófagos podem transmitir patógenos durante a sua alimentação e esses microorganismos parecem se beneficiar dos mecanismos moduladores da saliva, que facilitam a infecção do hospedeiro e o estabelecimento da doença (FONTAINE et al., 2011b; WASINPIYAMONGKOL et al., 2010). Além disso, esses patógenos são capazes de modular a composição da saliva e induzir mudanças comportamentais nos mosquitos resultando no aumento do seu potencial de transmissão (CHISENHALL et al., 2014; SIM; RAMIREZ; DIMOPOULOS, 2012). Acredita-se que a quantidade de vírus inoculados durante o repasto sanguíneo de um mosquito seja algo entre 10¹ e 10⁷ unidades formadoras de placa, e esses patógenos aproveitam para se estabelecerem uma vez que o local da picada está totalmente alterado e a resposta imunológica antiviral afetada pela ação da saliva do vetor (SCHNEIDER; HIGGS, 2008; TITUS; RIBEIRO, 1990). Com isso, já foi demonstrado que a co-inoculação intradérmica do alfavírus Sindbis com o EGS de *A. aegypti* induziu a diminuição da expressão de IFN- γ e - β , além de aumentar a expressão de IL-4 e IL-10, quando comparado com os animais inoculados somente com o vírus (SCHNEIDER et al., 2004). Outro estudo mostrou que macrófagos

peritoneais quando infectados com o vírus do Nilo Ocidental e incubados com o EGS de *A. aegypti* diminuíram a expressão de iNOS, IFN- β e IL-12 e aumentaram a expressão de IL-10 (SCHNEIDER et al., 2010). Além disso, também foi demonstrada a redução da sinalização de células apresentadoras de antígeno e no recrutamento de células T induzido pela inoculação intradérmica do vírus do Nilo Ocidental em camundongos previamente expostos a picadas do *A. aegypti* (SCHNEIDER et al., 2010). Outro estudo evidenciou o aumento da infecção pelo vírus da Dengue em queratinócitos humanos incubados com EGS, associado à diminuição da expressão de IFN- α , - β e - γ (SURASOMBATPATTANA et al., 2014). Thangamani et al. (2010), verificou a diminuição da expressão do receptor do tipo Toll-3 (TLR-3) e de citocinas do perfil Th1, assim como o aumento da expressão da citocina IL-4 em camundongos picados por mosquitos infectados com o vírus Chikungunya. Em um trabalho recente, Schmid et al. (2016), demonstraram que a saliva de *A. aegypti* é capaz de aumentar a permeabilidade endotelial e extravasamento de plasma durante uma infecção pelo vírus da Dengue, assim como aumentar os títulos virais tanto em macrófagos como em células dendríticas acelerando e exacerbando a patogenicidade do vírus. De maneira oposta, foi demonstrado no modelo de infecção por Dengue, que a aegyptina (molécula anti-agregante de plaquetas) é capaz de elevar as concentrações das citocinas IL-5, IL-6, IFN- γ e GM-CSF, levando à diminuição dos títulos virais (MACCRACKEN et al., 2014).

Sabendo-se do papel crucial que os componentes imunomoduladores da saliva desempenham durante a transmissão de patógenos, alguns pesquisadores propõem que essas moléculas podem se tornar potenciais alvos no desenvolvimento de vacinas e de outras medidas profiláticas com o objetivo de controlar a transmissão de doenças (TITUS; BISHOP; MEJIA, 2006). Além disso, esses componentes apresentam um considerável potencial terapêutico, podendo ser utilizados no tratamento de doenças autoimunes e inflamatórias. Nesse contexto, trabalhos em andamento do nosso grupo e realizados em colaboração demonstraram que o EGS de *A. aegypti* é capaz de melhorar o quadro clínico em modelos experimentais para o estudo da esclerose múltipla (RAMOS, 2014), hepatite autoimune (ASSIS, 2017) e de doenças inflamatórias intestinais (SALES-CAMPOS et al., 2015a). Em resumo, o esquema a seguir ilustra os mecanismos imunomoduladores da saliva de *A. aegypti* identificados até o momento (Figura 3).

Figura 3- Representação esquemática dos mecanismos imunomoduladores exercidos pela saliva de *A. aegypti*. (1) Inibição da produção de $\text{TNF-}\alpha$ por mastócitos. (2) Inibição da produção de Óxido Nítrico e $\text{IFN-}\beta$ e indução da produção de IL-10 por macrófagos. (3) Inibição da proliferação de linfócitos T e da produção de citocinas do tipo Th1 ($\text{IFN-}\gamma$). Indução de apoptose e polarização de células T CD4^+ para um perfil Th2 e produção de IL-4 e IL-10 . (4) Indução da produção de anticorpos IgE e IgG1 por linfócitos B.

1.3 Composição da saliva de *A. aegypti*.

Como visto até aqui, a saliva de *A. aegypti* é um coquetel farmacológico com diversas atividades biológicas, capaz de afetar a homeostasia e o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado. Apesar de todos os trabalhos apresentados acima, muito do que se sabe a respeito da saliva de *A. aegypti* foi descrito com material bruto, cuja caracterização se mantém limitada. O universo das moléculas salivares de *A. aegypti* só começou a ser desvendado com a publicação do primeiro salivoma da espécie (VALENZUELA et al., 2002b), que foi refinado e atualizado com a publicação de seu genoma (NENE et al., 2007) e de mais dois salivomas (RIBEIRO et al., 2007, 2016). Salivoma é o termo utilizado para se referir ao catálogo de transcritos (RNA mensageiros) e proteínas expressas nas glândulas

salivares de uma determinada espécie e tem se tornado uma fonte particularmente rica de informação a respeito dos componentes presentes na saliva do mosquito.

Dados sobre o repertório proteômico das glândulas salivares de *A. aegypti* adultos fêmeas mostram que do total de proteínas presentes nesse órgão, apenas 12,5% são proteínas secretadas (ALMERAS et al., 2010). Dentro deste universo já foram caracterizados peptídeo com ações anti-microbianas, inibidores de proteases, lisozimas, enzimas e proteínas pertencentes às famílias dos alérgenos de 30 kDa, D7 e do Antígeno 5 (Ag5). Além disso, foram identificados diversos polipeptídeos específicos do gênero *Aedes*, os quais não possuem funções biológicas conhecidas, além de serem mais expressos em glândulas salivares de fêmeas em comparação com glândulas salivares de machos, sugerindo a correlação desses peptídeos com as atividades anti-hemostáticas e imunomoduladoras da saliva (RIBEIRO et al., 2007).

Alguns peptídeos já foram caracterizados na saliva de artrópodes hematófagos, apresentando diferentes funções. Em carrapatos, eles estão associados com ação antimicrobiana, por exemplo, inibindo o crescimento tanto de bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, como os encontrados na saliva de *Ixodes scapularis* (PICHU; RIBEIRO; MATHER, 2009), *Ixodes sinensis* (YU et al., 2006), *Rhipicephalus haemaphysaloides* (ZHANG et al., 2011) e *Boophilus microplus* (FOGAÇA et al., 2004). Já em insetos dípteros, foi descrito na saliva do flebótomo *Lutzomyia longipalpis* um peptídeo chamado maxadilan que além de agir como um potente vasodilatador, também é capaz de inibir a proliferação de linfócitos T, reações de hipersensibilidade tardia e ativação de macrófagos (LERNER et al., 1991; QURESHI et al., 1996; RIBEIRO et al., 1989). Outro peptídeo de *L. longipalpis*, o neuropeptídeo relacionado à calcitonina, também inibe a ativação de macrófagos (TITUS; RIBEIRO, 1990). Apesar dos estudos acima descritos, muito pouco se sabe sobre as atividades biológicas dos peptídeos presentes na saliva de *A. aegypti*.

Sabendo-se da importância da saliva dos artrópodes hematófagos e potencialmente de seus peptídeos salivares para a alimentação e transmissão de patógenos causadores de doenças, torna-se essencial a elucidação de suas ações imunofarmacológicas. Nesse sentido, nosso grupo tem investigado as ações da saliva de *A. aegypti* sobre o sistema imune, assim como tem utilizado as informações contidas no salivoma dessa espécie para a seleção de novas

moléculas, com o objetivo de estudar suas propriedades biológicas. Esse conhecimento contribuirá com o entendimento do seu papel na hematofagia e sistema imunológico, na interação vetor/hospedeiro vertebrado e também na busca de novas ferramentas e desenvolvimento de estratégias no controle de vetores e doenças por eles transmitidas, assim como na busca de novas moléculas com potencial terapêutico. Desse modo, escolhemos um peptídeo de 7,8 kDa identificado no salivoma de *A. aegypti*, classificado no grupo de polipeptídeos específicos do gênero *Aedes* como objeto de estudo.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- O AeMOPE-1 está presente no EGS de *A. aegypti* fêmeas e é mais expresso em glândulas salivares de fêmeas do que de machos.
- O AeMOPE-1 é secretado durante o repasto sanguíneo, com a produção de anticorpos peptídeo-específicos após exposições naturais aos mosquitos adultos fêmeas;
- O AeMOPE-1 sintético e o naturalmente encontrado na saliva de *A. aegypti* são capazes de inibir a produção de NO por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN- γ ;
- O AeMOPE-1 reduz a produção das citocinas IL-6 e IL-12p40, da quimiocina CCL2 e do eicosanoide PGE₂, além da expressão de iNOS, COX-2 e a fosforilação do fator de transcrição NF-kB p65 por macrófagos peritoneais estimulados com LPS e IFN- γ ;
- O AeMOPE-1 é capaz de induzir a polarização da resposta imune adaptativa para o perfil Th2, com a presença de altos níveis de anticorpos do tipo IgG1 e a produção das citocinas IL-4 e IL-5;
- O tratamento com o AeMOPE-1 melhora os sintomas clínicos da colite experimental, com a redução das escalas clínicas e pós-morte, diminuição do número de leucócitos (linfócitos, neutrófilos e monócitos) circulantes no sangue periférico e da expressão das citocinas IL-6 e IFN- γ e da quimiocina CCL2 no intestino.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS*

- ADAMS, T. S. Hematophagy and Hormone Release. **Annals of Entomology Society of America**, v.92, n.1, p. 1-13,1999.
- ADER, D. B. et al. Modulation of Dengue Virus Infection of Dendritic Cells by *Aedes aegypti* Saliva. **Viral Immunology**, v. 17, n. 2, p. 252–265, 2004.
- ALMERAS, L. et al. Salivary Gland Protein Repertoire from *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 4, p. 391–402, 2010.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997.
- ANATRIELLO, E. et al. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **BMC Genomics**, v. 11, p. 450, 2010.
- ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: A tale of tear and blood. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 77, n. 4, p. 665–693, 2005.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E2 production in murine macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, p. 1–9, 2010.
- ARAÚJO-SANTOS, T. et al. Prostaglandin E2/Leukotriene B4 balance induced by Lutzomyia longipalpis saliva favors Leishmania infantum infection. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 601, 2014.
- ARCÀ, B. et al. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 107–127, 2007.
- ASSIS, Josiane Betim. Imunomodulação da hepatite experimental aguda pela saliva do mosquito *Aedes aegypti*. 2017. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017 [in press].
- ATTARDO, G. M.; HANSEN, I. A.; RAIKHEL, A. S. Nutritional regulation of vitellogenesis in mosquitoes: Implications for anautogeny. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 7, p. 661–675, 2005.
- BAEUEERLE, P. A.; HENKEL, T. Function And Activation Of Nf-Kappa-B In the Immune-System. **Annual Review of Immunology**, v. 12, p. 141–179, 1994.
- BANCHEREAU, J. et al. Mmunobiology of. n. Figure 1, p. 767–811, 2000.
- BARROS, M. S. et al. Exposure to *Aedes aegypti* Bites Induces a Mixed-Type Allergic Response following Salivary Antigens Challenge in Mice. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, p. 1–18, 2016.

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

BASSO, P. J. et al. Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Brazilian journal of medical and biological research** v. 47, n. 9, p. 727–37, 2014.

BISSENETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS A. D. Extract of mosquito salivary gland inhibit tumor necrosis factor alpha from mast cells. **Parasite Immunology**, v. 15, p. 27-33, 1993.

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

BLACK IV, W. C. et al. Flavivirus susceptibility in Aedes aegypti. **Archives of Medical Research**, v. 33, n. 4, p. 379–388, 2002.

BOPPANA, V. D. et al. 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.

BRAKE, D. K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of Rhipicephalus microplus. **Parasites & Vectors**, v. 5, n. 1, p. 38, 2012.

BRIANT, L. et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, v. 464–465, n. 1, p. 26–32, 2014.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin $\alpha 2\beta 1$, and von Willebrand factor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 37, p. 26928–26938, 2007.

CARVALHO-COSTA, T. M. et al. Immunosuppressive effects of Amblyomma cajennense tick saliva on murine bone marrow-derived dendritic cells. **Parasites & vectors**, v. 8, n. 1, p. 22, 2015.

CHAGAS, A. C. et al. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, Aedes aegypti. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 19, p. 6946–6951, 2014.

CHAMPAGNE, D. E. et al. 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.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic molecules from saliva of blood-feeding arthropods. **Pathophysiology of Haemostasis and Thrombosis**, v. 34, n. 4–5, p. 221–227, 2006.

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

1994.

CHEN, G. et al. Ixodes scapularis saliva mitigates inflammatory cytokine secretion during Anaplasma phagocytophilum stimulation of immune cells. **Parasites & vectors**, v. 5, n. 1, p. 229, 2012.

CHEN, Y. L.; SIMONS, F. E. R.; PENG, Z. A Mouse Model of Mosquito Allergy for Study of Antigen-Specific IgE and IgG Subclass Responses, Lymphocyte Proliferation, and IL-4 and IFN- γ Production. **International Archives of Allergy and Immunology**, v. 116, n. 4, p. 269–277, 1998.

CHRISTOPHERS, S. R. **Aedes aegypti (L.) 'The yellow fever mosquito' Its life history, bionomics and structure**. London: Cambridge University Press, 1960.

CHISENHALL, D. M. et al. Infection with dengue-2 virus alters proteins in naturally expectorated saliva of Aedes aegypti mosquitoes. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 252, 2014.

CONSOLI, R. A. G. B.; OLIVEIRA, R. L. **Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1994.

COSTA, D. J. et al. Lutzomyia longipalpis Salivary Gland Homogenate Impairs Cytokine Production and Costimulatory Molecule Expression on Human Monocytes and Dendritic Cells. **Infection and immunity**, v. 72, n. 3, p. 1298–1305, 2004.

CROSS, M. L.; CUPP, E. W.; ENRIQUEZ, F. J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of Aedes aegypti. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 51, n. 5, p. 690–696, 1994.

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

DESMEDT, M. et al. Macrophages induce cellular immunity by activating Th1 cell responses and suppressing Th2 cell responses. **Journal of immunology**, v. 160, n. 11, p. 5300–5308, 1998.

DUQUE, G. A.; DESCOTEAUX, A. Macrophage cytokines: Involvement in immunity and infectious diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. OCT, p. 1–12, 2014.
EGS inhibit TNF- α from mast cells_Bissonnette,1993.pdf, [s.d.].

FAQUIM-MAURO, E. L.; JACYSYN, J. F.; MACEDO, M. S. Anaphylactic and non-anaphylactic murine IgG1 differ in their ability to bind to mast cells: relevance of proper glycosylation of the molecule. **Immunobiology**, v. 207, n. 3, p. 169–77, 2003.

FENG, L. et al. Involvement of reactive oxygen intermediates in cyclooxygenase-2 expression induced by interleukin-1, tumor necrosis factor- α , and lipopolysaccharide. **The Journal of clinical investigation**, v. 95, n. 4, p. 1669–75, 1995.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Saliva of Rhipicephalus sanguineus tick impairs T cell

proliferation and IFN- γ -induced macrophage microbicidal activity. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 64, n. 3, p. 279–293, 1998.

FERREIRA, B. R.; SILVA, J. S. Successive tick infestations selectively promote a T-helper 2 cytokine profile in mice. **Immunology**, v. 96, n. 3, p. 434–439, 1999.

FOGAÇA, A. C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: Isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 28, n. 3, p. 191–200, 2004.

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

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

FORATTINI, O. P. **Culicidologia médica: identificação, biologia e epidemiologia**. São Paulo: EDUSP, 2002.

FÖRSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: Regulation and function. **European Heart Journal**, v. 33, n. 7, p. 829–837, 2012.

GARCIA, G. et al. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 430, 2014.

GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, v. 22, n. 7, p. 319–331, 2000.

GRIENEISEN, M. L. et al. Biodiversity, taxonomic infrastructure, international collaboration, and new species discovery. **BioScience**, v. 64, n. 4, p. 322–332, 2014.

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.

GWAKISA, P. et al. Salivary gland extract of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks inhibits in vitro transcription and secretion of cytokines and production of nitric oxide by LPS-stimulated JA-4 cells. **Veterinary Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 53–61, 2001.

HALL, L. R.; TITUS, R. G. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. **J Immunol**, v. 155, n. 7, p. 3501–3506, 1995.

HARRINGTON, L. C.; EDMAN, J. D.; SCOTT, T. W. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 411–422, 2001.

HINZ, B.; BRUNE, K. Cyclooxygenase-2 - 10 years later. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 300, n. 2, p. 367–375, 2002.

ITO, R.; KISHIDA, T. Interferon-gamma is causatively involved in experimental inflammatory bowel disease in mice. n. II, p. 330–338, 2006.

KÜHL, A. A. et al. Diversity of intestinal macrophages in inflammatory bowel diseases. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. DEC, p. 1–7, 2015.

KUTHEJLOVÁ, M. et al. Tick salivary gland extract inhibits killing of *Borrelia afzelii* spirochetes by mouse macrophages. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 1, p. 575–578, 2001.

KYCKOVA, K.; KOPECKY, J. Effect of tick saliva on mechanisms of innate immune response against *Borrelia afzelii*. **J Med Entomol**, v. 43, n. 6, p. 1208–1214, 2006.

LEBOULLE, G. et al. Characterization of a novel salivary immunosuppressive protein from *Ixodes ricinus* ticks. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 12, p. 10083–10089, 2002.

LERNER, E. A. et al. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 266, n. 17, p. 11234–11236, 1991.

LIU, Y. J. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 259–262, 2001.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

LO PRESTI, A. et al. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. 12, p. 925–932, 2014.

MAHIDA, Y. R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. **Inflammatory bowel diseases**, v. 6, n. 1, p. 21–33, 2000.

MACIEL, C. Evans Blue as a simple method to discriminate mosquitoes' feeding choice on small laboratory animals. **PLOS One**, v. 9, n. 10, 2014.

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

MAHIDA, Y. R. The key role of macrophages in the immunopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Inflammatory Bowel Disease*, v. 6, n. 1, p. 21–33, 2000.

MANS, B. J. Evolution of vertebrate hemostatic and inflammatory control mechanisms in blood-feeding arthropods. **Journal of Innate Immunity**, v. 3, n. 1, p. 41–51, 2011.

MARINOTTI, O.; JAMES, A. A. An α -glucosidase in the salivary glands of the vector

mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry**, v. 20, n. 6, p. 619–623, 1990.

MCNELIS, J. C.; OLEFSKY, J. M. Macrophages, Immunity, and Metabolic Disease. **Immunity**, v. 41, n. 1, p. 36–48, 2014.

MESSINA, J. P. et al. Global spread of dengue virus types: Mapping the 70 year history. **Trends in Microbiology**, v. 22, n. 3, p. 138–146, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/dezembro/20/2016-033---Dengue-SE49-publicacao.pdf>> Acesso em: Dezembro de 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/619-secretaria-svs/l1-svs/27300-febre-amarela-informacao-e-orientacao>> Acesso em: Maio de 2017.

MONATH, T. P.; VASCONCELOS, P. F. C. Yellow fever. **Journal of Clinical Virology**, v. 64, p. 160–173, 2015.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 460–460, 2010.

MUDTER, J.; NEURATH, M. F. IL-6 signaling in inflammatory bowel disease: Pathophysiological role and clinical relevance. **Inflammatory Bowel Diseases**, v. 13, n. 8, p. 1016–1023, 2007.

MURAILLE, E.; LEO, O.; MOSER, M. Th1/Th2 paradigm extended: Macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. NOV, p. 1–12, 2014.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **The Lancet**, v. 386, n. 9990, p. 243–244, 2015.

NAKANISHI, S. Mammalian tachykinin receptors. **Annual review of neuroscience**, v. 14, p. 123–136, 1991.

NELSON, M. J. **Aedes aegypti: biologia y ecologia**. Washington: Organização Mundial da Saúde, 1986.

NENE, V. et al. Genome Sequence of *Aedes aegypti*, a Major Arbovirus Vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718–1723, 2007.

NOGUEIRA, R. M. R.; DE ARAÚJO, J. M. G.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Pan American journal of public health**, v. 22, n. 5, p. 358–363, 2007.

OLIVEIRA, C. J. F. et al. Deconstructing tick saliva: Non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 13, p. 10960–10969, 2011.

PAHL, H. L. Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. **Oncogene**, v. 18, n. 49, p. 6853–66, 1999.

PAPADAKIS, K.; TARGAN, S. R. Role of Cytokines in the Pathogenesis of. **Annual Reviews of Medicine**, v. 51, n. 1, p. 289–298, 2000.

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

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

PICHU, S.; RIBEIRO, J. M. C.; MATHER, T. N. Purification and characterization of a novel salivary antimicrobial peptide from the tick, *Ixodes scapularis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 511–515, 2009.

POOLE, N. M. et al. Prostaglandin E(2) in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. **Parasites & vectors**, v. 6, n. 1, p. 261, 2013.

POWELL, J. R.; TABACHNICK, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. October, p. 11–17, 2013.

PREVOT, P. P. et al. Exosites mediate the anti-inflammatory effects of a multifunctional serpin from the saliva of the tick *Ixodes ricinus*. **FEBS Journal**, v. 276, n. 12, p. 3235–3246, 2009.

QURESHI, A. A. et al. Immunomodulatory properties of maxadilan, the vasodilator peptide from sand fly salivary gland extracts. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 6, p. 665–671, 1996.

RAIKHEL, A. S. et al. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: From basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 32, n. 10, p. 1275–1286, 2002.

RAMOS, Anderson Daniel. **Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato de glândula salivar de *Aedes aegypti***. 2014. Tese (Doutorado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. Acesso em: 2017-06-06.

REINECKER, H.-C. et al. Monocyte-chemoattractant protein 1 gene expression in intestinal epithelial cells and inflammatory bowel disease mucosa. **Gastroenterology**, v. 108, n. 1, p. 40–50, 1995.

REINECKER, H. C. et al. Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with

ulcerative colitis and Crohn's disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 94, n. 1, p. 174–181, 1993.

RENO, H. E.; NOVAK, R. J. Characterization of apyrase-like activity in *Ochlerotatus triseriatus*, *Ochlerotatus hendersoni*, and *Aedes aegypti*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 3, p. 541–545, 2005.

RIBEIRO, J. M. et al. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. **Science**, v. 243, n. 4888, p. 212–4, 1989.

RIBEIRO, J. M. et al. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 136, 2011.

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

RIBEIRO, J. M. C. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. **Annual Review of Entomology**, v. 32, n. 1, p. 463–478, 1987.

RIBEIRO, J. M. C. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *aedes aegypti*. **J. exp. Biol**, v. 165, p. 61–71, 1992.

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

RIBEIRO, J. M. C. et al. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC genomics**, v. 8, p. 6, 2007.

RIBEIRO, J. M. C. et al. A deep insight into the sialome of male and female *aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, p. 1–20, 2016.

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI, I. M. B. R. Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**, v. 48, n. 1, p. 73–88, 2003.

RIBEIRO, J. M. C.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. *Aedes aegypti*: Model for blood finding strategy and prediction of parasite manipulation. **Experimental Parasitology**, v. 60, n. 1, p. 118–132, 1985.

RIBEIRO, J. M.; ROSSIGNOL, P. A; SPIELMAN, A. Role of mosquito saliva in blood vessel location. **The Journal of experimental biology**, v. 108, n. 0022–0949 (Print), p. 1–7, 1984.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n. 5, p. 986–1000, 2011.

RICHARDS, A G.; RICHARDS, P. A. The peritrophic membranes of insects. **Annual review of entomology**, v. 22, n. 9448, p. 219–240, 1977.

SA-NUNES, A. et al. Prostaglandin E2 Is a Major Inhibitor of Dendritic Cell Maturation and Function in Ixodes scapularis Saliva. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 3, p. 1497–1505, 2007.

SÁ-NUNES, A. et al. Maturation and Function in Ixodes scapularis Saliva 1. **The Journal of Immunology**, 2012.

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

SALES-CAMPOS, H. et al. Classical and recent advances in the treatment of inflammatory bowel diseases. **Brazilian journal of medical and biological research** v. 48, n. 2, p. 96–107, 2015b.

SCHMID, M. A. et al. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 6, p. 1–25, 2016.

SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and Th1/Th2 cytokines responses to sindbis virus infection. **Viral Immunology**, v. 17, n. 4, p. 565-573, 2004.

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.

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

SEN, R.; BALTIMORE, D. Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. **Cell**, v. 46, p. 705–716, 1986.

SIM, S.; RAMIREZ, J. L.; DIMOPOULOS, G. Dengue virus infection of the aedes aegypti salivary gland and chemosensory apparatus induces genes that modulate infection and blood-feeding behavior. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 3, 2012.

SKALLOVÁ, A. et al. Tick Saliva Inhibits Dendritic Cell Migration, Maturation, and Function while Promoting Development of Th2 Responses. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 9, p. 6186–6192, 2008.

SMARTT, C.T. The apyrase gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, is expressed specifically in the adult female salivary glands. **Experimental Parasitology**, v.82, n. 3, p.239-248, 1995.

SOARES, M. B. P. et al. The vasoactive peptide Maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF- α and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the

pituitary adenylate cyclase-activating. **Journal of Immunology**, v. 160, p. 1811-1816, 1998.

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

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

STILS, H. F. Adjuvants and Antibody Production: Dispelling the Myths Associated with Freund's Complete and Other Adjuvants. **ILAR Journal**, v. 46, n. 3, p. 280–293, 2005.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 1, p. 281–4, 2014.

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.

TAK, P. P. et al. NF-kappaB: a key role in inflammatory diseases. **The Journal of clinical investigation**, v. 107, n. 1, p. 7–11, 2001.

TEIXEIRA, M. G. et al. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000-2010): A Systematic Literature Search and Analysis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013.

THANGAMANI, S. et al. Host immune response to mosquito-transmitted chikungunya virus differs from that elicited by needle inoculated virus. **PLoS ONE**, v. 5, n. 8, p. 1–8, 2010.

THIBOUTOT, M. M. et al. Chikungunya: A potentially emerging epidemic? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 4, 2010.

TILAK, R. et al. Dengue, chikungunya ... and the missing entity – Zika fever: A new emerging threat. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 72, n. 2, p. 157, 2016.

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

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

TOLLE, M. A. Mosquito-borne Diseases. **Current Problems in Pediatric and Adolescent Health Care**, v. 39, n. 4, p. 97–140, 2009.

VALENZUELA, J. G. et al. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. v. 2864, p. 2843–2864, 2002a.

VALENZUELA, J. G. et al. 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, 2002b.

WANASEN, N. et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 18, n. 2, p. 191–199, 2004.

WASINPIYAMONGKOL, L. et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. **Proteomics**, v. 10, n. 10, p. 1906–1916, 2010.

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

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

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

WEDEMEYER, J.; GALLI, S. J. Mast cells and basophils in acquired immunity. **British medical bulletin**, v. 56, n. 4, p. 936–955, 2000.

WERE, F. The dengue situation in Africa. **Paediatrics and International Child Health**, v. 32, n. sup1, p. 18–21, 2012.

WIKEL, S. K.; ALARCON-CHAIDEZ, F. J. Progress toward molecular characterization of ectoparasite modulation of host immunity. **Veterinary Parasitology**, v. 101, n. 3–4, p. 275–287, 2001.

WILDER-SMITH, A. et al. Update on dengue: Epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Current Infectious Disease Reports**, v. 12, n. 3, p. 157–164, 2010.

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic Expansion of Dengue: The Impact of International Travel. **Medical Clinics of North America**, v. 92, n. 6, p. 1377–1390, 2008.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **The Journal of biological chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4705–4708, 1994.

YACTAYO, S. et al. Epidemiology of chikungunya in the americas. **Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. Suppl 5, p. S441–S445, 2016.

YAN, X. et al. An immunoregulatory peptide from salivary glands of the horsefly, *Hybomitra atriperoides*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 32, n. 10, p. 1242–1247, 2008.

YU, D. et al. A novel antimicrobial peptide from salivary glands of the hard tick, *Ixodes sinensis*. **Peptides**, v. 27, n. 1, p. 31–35, 2006.

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

ZHANG, H. et al. Identification of a cysteine-rich antimicrobial peptide from salivary glands of the tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Peptides**, v. 32, n. 3, p. 441–446, 2011.

ZHAO, R. et al. Immunoregulatory peptides from salivary glands of the horsefly, *Tabanus pleskei*. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 154, n. 1, p. 1–5, 2009.