BRUNA BIZZARRO

**EFEITO DA SALIVA DE *Aedes aegypti* SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO, MATURAÇÃO E FUNÇÃO DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS E NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2012

BRUNA BIZZARRO

**EFEITO DA SALIVA DE *Aedes aegypti* SOBRE A
DIFERENCIAÇÃO, MATURAÇÃO E FUNÇÃO DE CÉLULAS
DENDRÍTICAS E NA PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS T**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

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.

São Paulo
2012

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

Bizzarro, Bruna.

Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T / Bruna Bizzarro. -- São Paulo, 2012.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Sá-Nunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Imunomodulação por componentes salivares de artrópodes hematófagos

Versão do título para o inglês: Effects of *Aedes aegypti* saliva on dendritic cell differentiation, maturation and function and on T lymphocyte proliferation.

1. *Aedes aegypti* 2. Extrato de glândula salivar 3. Células dendríticas
4. Linfócitos T 5. Apoptose 6. Memória Imunológica I. Sá-Nunes, Prof. Dr. Anderson II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB054/2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bruna Bizzarro.

Título da Dissertação: Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T.

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

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

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

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAL

Decl. CEUA.028/10

DECLARAÇÃO

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

São Paulo, 08 de junho de 2010.

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

Dedico este trabalho ao meu orientador Dr. Anderson de Sá Nunes, responsável pela minha formação científica. Aos meus pais Antonio e Lia, a minha avó Alzira e aos meus irmãos Marcus e Paulo pelo constante incentivo. Ao meu namorado André pelo companheirismo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes pela oportunidade de fazer parte de seu laboratório e pelo privilégio de compartilhar seus conhecimentos científicos e suas experiências. Seus conselhos foram fundamentais para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Agradeço aos meus pais por me ensinar a nunca desistir diante de um obstáculo. Pelo carinho e amor em todos os momentos e por não poupar esforços no incentivo a minha educação. Pelo sorriso diante de cada degrau avançado e por todas as palavras de conforto. Vocês são a razão do meu sucesso.

À minha avó por todo amor e por todas as orações em meu favor. Ao meu avô Nino (*in memoriam*), por ser o meu anjo da guarda. Ao meu avô Cardoso pelo carinho e apoio. Aos meus irmãos, cunhada e sogros por me apoiarem sempre, pela torcida, e por vibrarem com as minhas conquistas. À minha amiga-irmã Juliana por estar sempre ao meu lado.

Ao André por ser a melhor pessoa que eu já conheci e por me ensinar a ser uma pessoa melhor a cada dia. Obrigada por todo o amor, paciência e incentivo. Obrigada pelo ombro nos momentos difíceis, pelas caronas e por me buscar na USP quando os experimentos iam até tarde.

Aos professores dos departamentos de Imunologia e Parasitologia do ICB/USP pelas aulas ministradas que foram essenciais para o meu desenvolvimento intelectual.

Aos professores do ICB/USP, Dr. José Alexandre Marzagão Barbuto do Departamento de Imunologia e às professoras Dra. Silvia Beatriz Boscardin e Dra. Sirlei Daffre do Departamento de Parasitologia pelas discussões e sugestões durante meu exame de qualificação.

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

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

Ao Dr. Jesus G. Valenzuela do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health, por disponibilizar os insetos *Phlebotomus duboscqi* e *Phlebotomus papatasi*.

Ao Dr. José Marcos Ribeiro e Dr. Eric Calvo do National Institute of Allergy and Infectious Diseases/National Institutes of Health pelas discussões e colaboração com os experimentos de cromatografia e espectrometria de massa que foram essenciais para o fechamento do meu trabalho.

Ao Prof. Dr. João Gustavo Pessini Amarante Mendes do Departamento de Imunologia do ICB/USP e sua doutoranda Júlia Cortina Campopiano pela colaboração com os experimentos de apoptose e à Luciana Paroneto Medina pelas explicações sobre o assunto.

À Profa. Dra. Ana Paula Lepique do Departamento de Imunologia do ICB/USP por ensinar a técnica de determinação de citocinas por citometria de fluxo (CBA – Cytometric Bead Array).

Aos funcionários do Biotério, em especial à Silvia Maria Gomes Massironi e Rosalia Regina de Luca, e todos os outros que foram fundamentais para realização desse trabalho.

À secretária Silvia do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro e à Eni, secretária do Programa de Pós-Graduação em Imunologia, por toda a ajuda e paciência na resolução das questões burocráticas.

À Jotelma, secretária do Departamento de Imunologia e à Amanda, Gerente de projetos do mesmo departamento pelo suporte institucional.

A todos os membros do Laboratório de Imunologia Experimental: Michele, Daniele, Ciro, Ceres, Anderson, Thamy e Natany, pela ajuda nos experimentos, por tornar meus dias mais divertidos e por serem mais do que grandes amigos, e sim, minha segunda família.

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

À minha amiga Karen pelas longas e frequentes conversas sobre a vida, por todas as discussões científicas e pelos momentos de descontração. À minha mãe postíça Sueli, por toda a ajuda e apoio.

A todos os meus colegas de departamento pelas discussões e explicações em imunologia e pela troca de reagentes. À Thaís Boccia pela ajuda em alguns experimentos e discussão sobre os resultados.

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

Obrigado a todos!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.”

Cora Coralina (1889-1985)

**Este trabalho foi realizado com o apoio da
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)**

RESUMO

BIZZARRO, B. **Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T.** 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Mosquitos são os mais importantes vetores de patógenos humanos, transmitindo um amplo espectro de doenças infecciosas emergentes e reemergentes. Nesse cenário, o mosquito *Aedes aegypti* está entre as espécies mais relevantes, uma vez que quase metade da população do planeta vive em áreas de risco de doenças transmitidas por esse vetor, como a febre amarela, a febre Chikungunya e a dengue. Para se alimentar com sucesso, os mosquitos hematófagos encontram dois grandes desafios após a ruptura física da pele: a) a barreira da hemostasia e; b) o sistema imunológico dos hospedeiros. Durante a evolução, esses insetos desenvolveram um coquetel salivar com um arsenal de moléculas apresentando diferentes efeitos farmacológicos. Porém, enquanto as atividades anti-hemostáticas da saliva de vetores hematófagos estão mais bem compreendidas, muito pouco se sabe sobre seus efeitos na imunidade do hospedeiro vertebrado. Diversos trabalhos vêm demonstrando que a saliva de vetores tem um papel essencial na transmissão de patógenos, confirmando sua atividade imunomoduladora. Entretanto, os mecanismos pelos quais a saliva atua na imunidade ainda são em grande parte desconhecidos e no caso específico do *Ae. aegypti*, a literatura científica é escassa. No presente estudo investigamos as atividades do extrato de glândula salivar (EGS) desse mosquito vetor na biologia das células dendríticas e dos linfócitos T. Nossos dados revelam que o EGS não interfere na diferenciação das células dendríticas derivadas da medula óssea de camundongos, mesmo na concentração mais alta utilizada (40 µg/mL). O EGS também não altera a expressão das moléculas CD40, CD80, CD86 e MHC de classe II em células dendríticas estimuladas ou não com LPS ultra puro. A proliferação antígeno específica de células T induzida por células dendríticas pré-incubadas com o EGS não foi diferente daquela induzida pelas células pré-incubadas somente com meio de cultura. Entretanto, se o EGS é mantido no meio de cultura, tanto a proliferação antígeno-específica, quanto a proliferação policlonal de células T CD4⁺ é fortemente inibida, sugerindo que os componentes salivares possuem um efeito direto sobre linfócitos, mas não sobre as células dendríticas. Essa é uma atividade única da saliva de *Ae. aegypti*, uma vez que o EGS de outras espécies de mosquitos e flebotomos não apresenta qualquer efeito na proliferação quando utilizadas nas mesmas condições. A purificação do EGS por FPLC mostrou uma fração ativa predominante com mais de 400 kDa, cuja análise por espectrometria de massa revelou um único candidato em que a quantificação se correlacionou com a atividade observada. Como o mecanismo de ação do EGS envolveu a morte de células T *naïve* por apoptose, testamos sua atividade em sistemas contendo células T de

memória. Em todos eles, os resultados sugerem fortemente que células de memória são resistentes aos efeitos do EGS de *Ae. aegypti*. Em conjunto, os resultados gerados por esse trabalho contribuem com a elucidação dos efeitos biológicos da saliva de *Ae. aegypti* na imunidade de seus hospedeiros e, conseqüentemente, seu papel na transmissão de doenças.

Palavras chave: *Aedes aegypti*. extrato de glândula salivar. células dendríticas. linfócitos T. apoptose. memória imunológica.

ABSTRACT

BIZZARRO, B. **Effect of *Aedes aegypti* saliva on the differentiation, maturation and function of dendritic cells and on lymphocyte proliferation.** 2012. 99 f. Master Thesis (Parasitology) – Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Sao Paulo, 2012.

Mosquitoes are the most important vectors of human pathogens, transmitting a wide range of emerging and re-emerging infectious diseases. In this scenario, *Aedes aegypti* is a relevant mosquito species, since almost half of the world's population lives in risk areas of disease transmitted by this vector, such as yellow fever, Chikungunya fever and dengue fever. In order to successfully nourish themselves, hematophagous mosquitoes find two major challenges once they break the skin's physical integrity: a) the hemostasis and; b) the immunological system of their hosts. During the evolution, these insects evolved a salivary cocktail with an arsenal of molecules presenting several pharmacological effects. However, while the anti-hemostatic activities from saliva of hematophagous vectors are better understood, very little is known about its effects on the immunity of the vertebrate host. Several works have demonstrated that vector's saliva has an essential role in transmitting pathogens, confirming its immunomodulatory activity. Nevertheless, the mechanisms by which the saliva acts on immunity are mostly unknown and, specifically for *Ae. aegypti*, the scientific literature is rare. In the present study, we have investigated the activities of the salivary gland extract (SGE) of this mosquito vector on the dendritic cells and T lymphocytes biology. Our data reveals that the SGE does not interfere on the differentiation of murine bone marrow-derived dendritic cells, even in the higher concentration employed (40 µg/mL). The SGE does not alter the expression of CD40, CD80, CD86 and MHC II molecules in dendritic cells stimulated or not with ultra pure LPS. Antigen-specific proliferation of T cells induced by dendritic cells preincubated with SGE is similar to that induced by the cells preincubated with culture medium only. However, if the SGE is maintained in the culture medium, either the antigen-specific or polyclonal CD4⁺ T cell proliferation is strongly inhibited, suggesting that the salivary components possess a direct effect on lymphocytes, but not on dendritic cells. This is a unique activity of *Ae. aegypti* saliva, since the SGE of other mosquito and phlebotomine species do not present any effect on the proliferation when incubated in the same conditions. The SGE purification by FPLC revealed a predominant active fraction with more than 400 kDa, and the mass spectrometry analysis showed a single candidate whose quantification correlated with the observed activity. Because the mechanism of action of SGE involved death of naïve T cell by apoptosis, we have tested its activity in systems containing memory T cells. In all of them, the results strongly suggest that memory cells are resistant to the effects of *Ae. aegypti* SGE. Taken together, the results generated by this work contribute to the understanding of the biological effects of *Ae. aegypti* saliva on the host and, consequently, its role on the transmission of diseases.

Key words: *Aedes aegypti*. salivary gland extract. dendritic cell. T lymphocytes. apoptosis. immunological memory.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estratégia de análise para os ensaios de diferenciação de células dendríticas a partir de culturas de células de medula óssea estimuladas com GM-CSF	44
Figura 2 - Expressão de CD11b e CD11c em células não aderentes provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c na presença de GM-CSF (Controle) ou GM-CSF e EGS de <i>Ae. aegypti</i> (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) durante 4 e 7 dias	45
Figura 3 - Estratégia de análise para os ensaios de maturação de células dendríticas a partir de culturas de células de medula óssea estimuladas com GM-CSF	48
Figura 4 - Expressão de MHC II em células CD11c ⁺ provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c diferenciadas com GM-CSF durante 6 dias, incubadas “overnight” na presença de meio somente (Controle) ou EGS de <i>Ae. aegypti</i> (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e estimuladas ou não com upLPS (100 ng/mL)	49
Figura 5 - Expressão de MHC II e CD40 em células não aderentes provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c diferenciadas com GM-CSF durante 6 dias, incubadas “overnight” na presença de meio somente (Controle) ou EGS de <i>Ae. aegypti</i> (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e incubadas novamente na presença ou ausência de upLPS (100 ng/mL)	50
Figura 6 - Avaliação da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ de camundongos DO11.10 estimulados por células dendríticas que foram previamente incubadas com EGS de <i>Ae. aegypti</i> e pulsadas com OVA e upLPS por 4 horas	53
Figura 7 - Estratégia de análise para os ensaios de proliferação de células T CD4 ⁺	54
Figura 8 - Avaliação da proliferação de linfócitos T CD4 ⁺ de camundongos DO11.10 estimulados por células dendríticas que foram previamente incubadas com EGS de <i>Ae. aegypti</i> e pulsadas com OVA e upLPS por 4 horas	55
Figura 9 - Efeito do EGS de <i>Ae. aegypti</i> na proliferação de células totais de baço de camundongos BALB/c estimulados com Con A	58
Figura 10 - Efeito do EGS de <i>Ae. aegypti</i> no número de células viáveis em cultura após 72 horas de incubação com meio somente ou Con A	59

Figura 11 - Estratégia de análise para avaliação da apoptose	60
Figura 12 - Avaliação da apoptose induzida por EGS de <i>Ae aegypti</i> em células de camundongos BALB/c após 72 horas de cultura estimuladas ou não por Con A	61
Figura 13 - Efeito do EGS das espécies <i>Ae. aegypti</i> , <i>An. aquasalis</i> , <i>P. duboscqi</i> e <i>P. papatasi</i> na proliferação de células totais de baço de camundongos BALB/c estimulados com Con A	62
Figura 14 - Fracionamento do EGS de <i>Ae. aegypti</i> por FPLC	65
Figura 15 - Abundância relativa das proteínas candidatas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 e determinadas por espectrometria de massa	66
Figura 16 - Proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c controle ou sensibilizados com picadas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	71
Figura 17 - Proliferação de células de um camundongo BALB/c incubadas com meio somente ou sobrenadante de suspensões celulares de camundongos controle ou sensibilizados com picadas de mosquitos <i>Ae. aegypti</i>	72
Figura 18 - Proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c sensibilizados com picadas de mosquitos <i>An. aquasalis</i>	73
Figura 19 - Proliferação das células do baço de camundongos controle (A) ou Imunizado com OVA (B)	74
Figura 20 - Estratégia de análise das células <i>naïve</i> ou de memória	75
Figura 21 - Análise das células <i>naïve</i> ou de memória de camundongos controle ou imunizados com OVA	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Células apresentadoras de antígenos
CCR7	Receptor 7 das quimiocinas
CD	“Cluster of Differentiation”
CEUA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
Con A	Concanavalina A
CR3, CR4	Receptor do complemento 3,... 4
DH/SCD	Dengue hemorrágica / Síndrome do choque da dengue
EGS	Extrato da glândula salivar
FACS	“Fluorescence-activated cell sorted”
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HLA-DR	Antígeno Leucocitário Humano-DR
FPLC	“Fast performance liquid cromatography”
ICB/USP	Instituto de Ciências Biomédicas / Universidade de São Paulo
IFN-γ	Interferon-gama
IL-2, IL-4, IL-5	Interleucina-2,... -4,... -5
MAC-1	“Macrophage-1 antigen”
MHC II	Complexo Principal de Histocompatibilidade classe II
OVA	Ovalbumina
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PGE2	Prostaglandina E2
SBCAL	Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório
TCR	Receptor de células T
Th1	Linfócitos T “helper” 1
Th2	Linfócitos T “helper” 2
TLR	Receptores do tipoToll
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
upLPS	Lipopolissacarídeo ultra puro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	28
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1 Animais	32
3.2 Extrato de Glândula Salivar (EGS)	32
3.3 Diferenciação de células dendríticas	33
3.4 Maturação das células dendríticas	34
3.5 Avaliação da função das células dendríticas	34
3.6 Efeito do EGS de <i>Ae. aegypti</i>, <i>An. Aquasalis</i>, <i>P. duboscqi</i> e <i>P. papatasi</i> na proliferação de linfócitos	36
3.7 Fracionamento do EGS por cromatografia líquida de rápida performance (FPLC) e identificação das frações por espectrometria de massa (MS)	36
3.8 Ensaio de proliferação de linfócitos de animais sensibilizados com picadas dos mosquitos <i>Ae. aegypti</i> e <i>An. aquasalis</i>	37
3.9 Ensaio de neutralização das atividades do EGS utilizando sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais sensibilizados por picadas de <i>Ae. aegypti</i>	37
3.10 Transferência adotiva e imunização de camundongos	38
3.11 Ensaios de apoptose.....	38
3.12 Fenotipagem celular por citometria de fluxo	39
3.13 Análise estatística dos resultados	40
4 RESULTADOS	41
4.1 Efeito do EGS de <i>Ae. aegypti</i> na diferenciação das células dendríticas..	42
4.2 Avaliação da atividade do EGS de <i>Aedes aegypti</i> na maturação das células dendríticas	46
4.3 Efeito do EGS na função das células dendríticas	51
4.4 Comparação do efeito do EGS de <i>Ae. aegypti</i> com EGS de <i>An. aquasalis</i>, <i>P. duboscqi</i> e <i>P. papatasi</i> na proliferação de linfócitos e seu	

mecanismo de ação.....	56
4.5 Fracionamento do EGS por FPLC e identificação de candidatos por espectrometria de massa	63
4.6 Avaliação da atividade de EGS em modelos de memória imunológica...	67
5 DISCUSSÃO	77
6 CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS	86
Anexo A.1 – Relatório da análise da fração F1 por espectrometria de massa	93
Anexo A.2 – Relatório da análise da fração F2 por espectrometria de massa	94
Anexo A.3 – Relatório da análise da fração F3 por espectrometria de massa	95
Anexo A.4 – Relatório da análise da fração F4 por espectrometria de massa.....	96
Anexo B.1 –. Análise das células <i>naïve</i> ou de memória de camundongos controle	98
Anexo B.2 – Análise das células <i>naïve</i> ou de memória de camundongos imunizados com OVA	99

1 INTRODUÇÃO

Mosquitos são os mais importantes vetores de patógenos humanos e são responsáveis por perdas humanas e econômicas significativas em todo o mundo, principalmente nos países em desenvolvimento. Esses insetos pertencem à ordem Diptera (a mesma das moscas), subordem Nematocera e família Culicidae, a qual é dividida em três subfamílias. A subfamília *Toxorhynchitinae* possui apenas o gênero *Toxorhynchites* e suas fêmeas são as únicas dessa família que não necessitam se alimentar de sangue para maturar seus ovários. A subfamília *Anophelinae* possui os gêneros *Chagasia*, *Bironella* e *Anopheles*, sendo este último amplamente conhecido pela importância epidemiológica por ser o vetor da malária. A subfamília *Culicinae* possui diversos gêneros, sendo *Culex* e *Aedes* os mais conhecidos. Neste grupo, a espécie mais bem caracterizada é *Aedes aegypti*, vetor primário de doenças emergentes e re-emergentes como a febre amarela, febre Chikungunya e dengue (BARRETT e HIGGS, 2007; BLACK et al., 2002; GUBLER, 2002a, b).

A despeito da existência de uma vacina eficaz, a febre amarela permanece uma das principais doenças na África e em partes da América do Sul, com aproximadamente 200.000 casos por ano e ao redor de 30.000 mortes (TOMORI, 2004). A primeira epidemia reconhecida da febre Chikungunya ocorreu na África Ocidental entre 1952 e 1953. Desde então, epidemias recorrentes vêm acontecendo em países asiáticos como Filipinas, Tailândia, Camboja, Vietnã, Índia, Burma e Sri Lanka. Uma epidemia extensa e persistente da doença vem ocorrendo nos últimos anos em países da região oceânica da Índia com pelo menos 300.000 casos estimados até o momento (LIGON, 2006). No caso da dengue, há uma incidência anual de 50-100 milhões de casos, e em torno de 3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco em todo o planeta. Suas manifestações clínicas variam da forma clássica à forma mais severa, conhecida como Dengue Hemorrágica/Síndrome do Choque da Dengue (DH/SCD) que representa até 1% dos casos (GUZMAN e ISTURIZ, 2010; MACKENZIE, GUBLER e PETERSEN, 2004). Dados oficiais mostram que epidemias recorrentes no período de 1981 a 2006, deixaram um saldo oficial de mais de 4 milhões de infectados, incluindo 5.817 casos de DH/SCD e um total de 338 casos fatais (NOGUEIRA, DE ARAUJO e SCHATZMAYR, 2007). Um grupo de pesquisadores publicou em 2010 um trabalho mostrando a epidemiologia da dengue nas últimas 3 décadas na região das Américas. O Brasil foi o país com o maior número de casos de dengue nos anos estudados (~4,63 milhões), sendo que em segundo lugar estava a Colômbia com um

pouco mais de 700 mil casos (SAN MARTIN et al., 2010). Infelizmente, não há vacinas disponíveis e a única prevenção disponível para a doença no momento é o combate ao mosquito.

Os mosquitos iniciaram sua distribuição pelo mundo devido à expansão da indústria naval e do comércio nos séculos XVIII e XIX. Eles usavam acúmulos de água em veleiros como criadouros e assim mantinham o seu ciclo, alcançando várias regiões (GUBLER, 1997). Algumas características biológicas e comportamentais do mosquito *Ae. aegypti* auxiliaram no aumento da sua distribuição geográfica, como a capacidade de procriar em água parada, a produção de ovos resistentes à dessecação e a preferência pela alimentação em humanos, o que também é um fator importante na expansão das doenças que são transmitidas por esse vetor (BARRETT e HIGGS, 2007). Dentro de um a três dias depois da emergência, os adultos copulam e as fêmeas buscam sua primeira refeição sanguínea. Somente alguns dias depois, os ovos são depositados em grande número (10 a 100 de cada vez) acima do nível da água, de modo que só ficam submersos e eclodem depois das chuvas. Na falta destas, resistem a prolongados períodos, geralmente por muitos meses, podendo chegar a um ano. As desovas se repetem com intervalos de 4 ou 5 dias, sempre precedidas de um repasto sanguíneo, até um total de 300 a 750 ovos por fêmea. As larvas alimentam-se principalmente de material orgânico presente nas paredes e fundo dos depósitos. Em condições favoráveis, o desenvolvimento larvário e pupal dura pelo menos uma semana, e o ciclo completo varia de 11 a 18 dias. Normalmente, uma fêmea vive cerca de dois meses, alimentando-se de sangue por volta de 12 ou mais vezes (REY, 1992).

Para se alimentar com sucesso, os mosquitos hematófagos necessitam localizar vasos sanguíneos da pele e a barreira da hemostasia é o primeiro desafio encontrado após a ruptura física desse tecido. A hemostasia é um sistema redundante e complexo e contra essa complexidade, os insetos hematófagos desenvolveram um coquetel salivar sofisticado no curso da evolução, com um arsenal de moléculas apresentando diferentes efeitos farmacológicos. Assim, três classes gerais de atividades anti-hemostáticas têm sido descritas na saliva de espécies hematófagas: antiagregante de plaquetas, vasodilatadora e anticoagulante (RIBEIRO, 2000). Alguns fatores responsáveis por essas atividades já estão identificados em *Ae. aegypti*. Por exemplo, uma enzima com atividade apirase foi demonstrada na saliva, resultando em inibição da agregação plaquetária por

hidrólise de ATP e ADP liberados por células lesadas ou plaquetas ativadas (RIBEIRO et al., 1984). Posteriormente essa enzima foi caracterizada como um membro da família de genes da 5'-nucleotidase (CHAMPAGNE et al., 1995). Aegyptina, um membro da família de alérgenos de 30 kDa, liga-se especificamente ao colágeno e bloqueia a agregação de plaquetas induzida por essa proteína (CALVO et al., 2007). Além disso, aegyptina também inibe a interação do fator de von Willebrand ao colágeno do tipo III sob condições estáticas assim como a adesão de plaquetas ao colágeno sob condições de fluxo de alta velocidade (CALVO et al., 2007). A atividade vasodilatadora deve-se a sialocininas I e II, peptídeos da família das taquicininas (CHAMPAGNE e RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992). Finalmente, foi encontrado também na saliva de *Ae. aegypti* um inibidor de serino-proteases que atua sobre o fator Xa (AFXa – Anticoagulant-Factor Xa) com atividade anti-coagulante (STARK e JAMES, 1995, 1998).

O papel da saliva na hematofagia não se limita apenas ao sistema vascular. Quando os mosquitos picam a pele para se alimentar de sangue, eles inoculam saliva no tecido dérmico que é capaz de exercer várias atividades biológicas. É bem conhecido que os componentes da saliva dos mosquitos podem causar reações na pele do hospedeiro que variam de pequenas pápulas a grandes edemas dependendo da espécie. Essas reações podem ser leves em indivíduos não sensibilizados, mas podem ser mais acentuadas se ocorrer sensibilização contra a saliva (DEMEURE et al., 2005). Assim, uma resposta inflamatória e imune mensurável é observada nos hospedeiros. Trabalhos clássicos demonstraram que a secreção salivar é a responsável pela sensibilização às picadas dos mosquitos e antígenos da glândula salivar estão envolvidos na elicitação de reações imediatas e tardias na pele causadas por essas picadas (HECHT, 1928; MCKIEL, 1959). De fato, quando o duto salivar de fêmeas de *Ae. aegypti* é cortado, esses mosquitos ainda são capazes de se alimentar, mas as reações cutâneas associadas às picadas em hospedeiros sensibilizados não ocorreram (HUDSON, BOWMAN e ORR, 1960). Por outro lado, se essas reações forem suficientemente fortes e/ou específicas, elas podem afetar a capacidade dos mosquitos de se alimentar e/ou de se reproduzir. Isso foi comprovado pela imunização de coelhos com um extrato total de *Ae. aegypti*, que causou uma redução de 24 a 31% na fecundidade das fêmeas que se alimentaram nesses animais (SUTHERLAND e EWEN, 1974).

Como a imunidade do hospedeiro pode, aparentemente, ter um efeito deletério no ciclo de vida dos mosquitos, é de se esperar que esses vetores também tenham desenvolvido moléculas imunomoduladoras em sua saliva durante a evolução da hematofagia e, de fato, alguns estudos corroboram essa hipótese. Por exemplo, o extrato da glândula salivar (EGS) de *Ae. aegypti* inibe a liberação de TNF- α em monocultura de mastócitos de rato (BISSENETTE et al., 1993). Além disso, o EGS também afeta a proliferação de linfócitos de camundongo *in vitro* (CROSS, CUPP e ENRIQUEZ, 1994; WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004) (WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004) e inibe a produção de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF- α) e Th1 (IL-2 e IFN- γ), mas pouco efeito foi observado nos níveis das citocinas Th2, IL-4 e IL-5 (WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004).

Como a saliva de *Ae. aegypti* e outros artrópodes hematófagos é capaz de modular a resposta imune de seus hospedeiros vertebrados, diversos patógenos co-evoluíram de forma a explorar essas atividades. Por exemplo, quando *Leishmania major*, o parasita causador da leishmaniose, é inoculado em camundongos na presença de EGS de seus flebótomos vetores (*Lutzomyia longipalpis* no “novo mundo” ou *Phlebotomus papatasi* no “velho mundo”) as lesões cutâneas resultantes são maiores do que aquelas observadas quando o parasita é inoculado sozinho (BELKAID et al., 1998; TITUS e RIBEIRO, 1988). Também foi observado que a infectividade do vírus Cache-Valley, um bunyavirus de importância veterinária, foi aumentada em camundongos quando o vírus foi inoculado nos locais onde mosquitos das espécies *Ae. triseriatus*, *Ae. aegypti*, ou *Culex pipiens* previamente se alimentaram, mas não em locais distantes das picadas (EDWARDS, HIGGS e BEATY, 1998). Da mesma forma, a infectividade do vírus da estomatite vesicular de Nova Jersey, um rhabdovirus também de importância veterinária, foi aumentada quando o vírus foi inoculado em camundongos na presença da saliva de *Ae. triseriatus* (LIMESAND et al., 2000). Entretanto, não há nenhum dado demonstrando que a saliva do mosquito *Ae. aegypti* afeta a infectividade dos vírus transmitidos por ele.

Quando o mosquito introduz a probóscide na pele à procura do vaso sanguíneo, os componentes salivares inoculados entram em contato com diversas células residentes que fazem parte do sistema imunológico, dentre elas as células de Langerhans, uma subpopulação de células dendríticas imaturas da pele. As

células dendríticas são células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) e vêm sendo extensivamente estudadas desde sua descoberta. Em 1973, as células dendríticas foram caracterizadas pela primeira vez quanto a sua morfologia, quantificação e distribuição em tecidos de camundongos (STEINMAN e COHN, 1973). No ano seguinte, foram demonstradas suas propriedades funcionais *in vitro* e *in vivo* (STEINMAN e COHN, 1974; STEINMAN, LUSTIG e COHN, 1974). Com isso, o interesse em estudar as células dendríticas foi crescendo entre os pesquisadores e conseqüentemente isso refletiu no número de trabalhos publicados. Dentro de poucos anos, várias características dessa célula foram demonstradas em uma sequência de elegantes trabalhos que ressaltam sua importância dentro do contexto imunológico (STEINMAN, ADAMS e COHN, 1975; STEINMAN et al., 1979; STEINMAN e WITMER, 1978). Essas células reconhecem patógenos e seus produtos pela ligação de receptores codificados por genes da linhagem germinativa (receptores de reconhecimento de padrões – PRRs) que reconhecem padrões moleculares conservados em diferentes classes de microorganismos e compartilhadas entre eles (padrões moleculares associados a patógenos – PAMPs). Dentre esses receptores, a família dos receptores do tipo Toll (Toll-like receptors – TLRs) é a mais bem estudada (WEST, KOBLANSKY e GHOSH, 2006). A ligação de um ou mais PAMPs aos respectivos TLRs induz um processo de maturação nas células dendríticas, que passam a produzir citocinas como TNF- α e IL-12 e aumentam a expressão de moléculas de MHC e moléculas coestimuladoras em sua superfície, como CD40, CD80 e CD86 (IWASAKI, 2007; WINZLER et al., 1997). Essas células passam a expressar o receptor de quimiocinas CCR7, que medeia sua migração para os órgãos linfóides secundários durante sua maturação, onde se tornarão eficientes estimuladoras das respostas de células T (BANCHEREAU et al., 2000; YANAGIHARA et al., 1998). Por esses motivos, as células dendríticas são essenciais para a comunicação entre a imunidade inata e adaptativa. As células T antígeno-específicas quando ativadas proliferam e se tornam células T efetoras dando início a resposta imune adaptativa, secretando citocinas que auxiliam na ativação de outras células (célula T CD4⁺ ou T “helper”) ou agindo diretamente no foco da infecção no combate das células alvo (célula T CD8⁺ ou T citotóxica). Quando o estímulo para a resposta imune acaba, grande parte dessas células morre e as células que sobrevivem se tornam células de memória de vida longa. Essas

células fazem com que a resposta ao segundo contato do mesmo antígeno seja muito mais rápida e eficaz (SPRENT e SURH, 2002).

Dois trabalhos recentes sugerem que tanto a saliva do carrapato *Ixodes ricinus*, vetor da bactéria causadora da doença de Lyme, quanto do mosquito *Anopheles stephensi*, vetor do protozoário causador da malária, podem afetar a migração de células dendríticas da pele para os linfonodos drenantes (DEMEURE et al., 2005; SKALLOVA et al., 2008). Entretanto, a literatura é escassa quanto às atividades da saliva de mosquitos, ou outros artrópodes vetores, sobre as células dendríticas. Alguns poucos trabalhos mostraram que a saliva de algumas espécies de carrapatos, por exemplo, consegue modular negativamente a produção das citocinas IL-12 e TNF- α e positivamente a produção de IL-10 em células dendríticas de camundongos estimuladas com LPS, um ligante típico de TLRs (CAVASSANI et al., 2005; SA-NUNES et al., 2007). Adicionalmente, a proliferação de células T induzida por células dendríticas incubadas com saliva desses carrapatos foi diminuída, sugerindo um papel inibidor da apresentação de antígenos por essas células (CAVASSANI et al., 2005; SA-NUNES et al., 2007; SKALLOVA et al., 2008). No caso de insetos, foi demonstrado que o EGS de *Lutzomyia longipalpis* afeta negativamente a maturação de células dendríticas humanas induzida por ligante de CD40, reduzindo a expressão de CD80, CD86 e HLA-DR nessas células (COSTA et al., 2004). Essa atividade foi reproduzida em células dendríticas murinas alguns anos mais tarde com a proteína maxadilan, um vasodilatador isolado dessa espécie com importante função no repasto sanguíneo (WHEAT et al., 2008). Em outro trabalho, células dendríticas incubadas com EGS de duas espécies de flebotomíneos, *Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi*, produziram IL-10 e PGE₂ e tiveram inibida sua capacidade de estimular a proliferação específica de células T. Além disso, a expressão de MHC classe II e CD86 induzida por LPS nessas células também foi reduzida (CARREGARO et al., 2008). Embora o EGS de *Ae. aegypti* tenha apresentado atividade antiproliferativa em linfócitos, como mencionado anteriormente (CROSS, CUPP e ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004), esses trabalhos utilizaram cultura de células totais de baço, não discriminando quais tipos celulares estariam sendo afetados na cultura, se as APCs (células dendríticas, macrófagos e linfócitos B), se as células T diretamente, ou ambas.

2 OBJETIVOS

O impacto de doenças transmitidas por vetores no contexto econômico e de saúde pública tem gerado interesse crescente de pesquisadores na biologia das interações vetor-hospedeiro e vetor-parasita. A importância desse fenômeno é representada pela publicação do genoma de *Ae. aegypti*, representando o segundo genoma de uma espécie de mosquito sequenciado (NENE et al., 2007). Diversos patógenos beneficiam-se dos efeitos biológicos do coquetel salivar de vetores para infectar seus hospedeiros e causar doenças (DE MOURA et al., 2007; EDWARDS, HIGGS e BEATY, 1998; LINESAND et al., 2000; TITUS e RIBEIRO, 1988). Também foi demonstrado que a imunidade contra componentes da saliva de diferentes espécies de mosquito é capaz de reduzir a transmissão das doenças causadas pelos mesmos (DONOVAN et al., 2007; GOMES et al., 2008; KAMHAWI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2008b). Da mesma forma, o ciclo de vida dos mosquitos pode também ser afetado pela imunização contra componentes da saliva (SUTHERLAND e EWEN, 1974).

Tendo em vista esse conjunto de evidências, fica clara a relevância de se conhecer mais profundamente as atividades dos componentes salivares do *Ae. aegypti*. Assim, o presente estudo teve como objetivo geral:

- ✓ Avaliar o efeito do EGS de fêmeas do mosquito *Ae. aegypti* na biologia das células dendríticas e dos linfócitos T.

Para isso, tivemos como objetivos específicos:

- ✓ Investigar o efeito do EGS de fêmeas de *Ae. aegypti* na diferenciação de células dendríticas;
- ✓ Analisar o efeito do EGS na expressão de moléculas características da maturação das células dendríticas, como o MHC de classe II e moléculas coestimuladoras (CD40, CD80 e CD86);
- ✓ Estudar possíveis alterações causadas pelo EGS na função das células dendríticas, especificamente na interação com os linfócitos T;

- ✓ Caracterizar o inibidor da proliferação de linfócitos presentes no EGS de *Ae. aegypti*.
- ✓ Determinar o mecanismo responsável pela inibição da proliferação do EGS de *Ae. aegypti*.
- ✓ Investigar os efeitos do EGS na proliferação de células de memória

3 MATERIAL E MÉTODOS

O delineamento experimental deste projeto se pautou nas recomendações dos 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) do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (ICB/USP), cujo parecer em anexo, registrado sob no. 91, na folha 73 do livro 02 para uso de animais em experimentação.

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas da linhagem BALB/c e DO11.10, entre 6 e 16 semanas, provenientes do Biotério de Animais Isogênicos do ICB/USP e mantidos no biotério do Departamento de Imunologia com água e alimento à vontade.

3.2 Extrato da glândula salivar (EGS)

Machos e fêmeas de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* 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. Glândulas salivares de fêmeas de *Phlebotomus duboscqi* e *Phlebotomus papatasi* coletados nas mesmas condições descritas acima foram gentilmente cedidas pelo Dr. Jesus G. Valenzuela, chefe da Vector Molecular Biology Section, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health.

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, USA) e alíquotas foram armazenadas a -80° C até o momento de uso.

3.3 Diferenciação de células dendríticas

Os camundongos descritos no item 3.1 foram fonte de células para os ensaios, após eutanásia. O fêmur esquerdo foi retirado e isolado do músculo quadríceps adjacente em condições assépticas e teve ambas as extremidades cortadas. As células da medula óssea foram coletadas pela inoculação de 3 mL de meio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen) no canal central do osso com a ajuda de uma agulha fina (0,45 x 13 mm – BD Precision Glide, Curitiba, PR, Brasil). As células foram centrifugadas a 300 *g* (5 min/4° C), e após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados com tampão de lise (ACK lysing buffer – Gibco Invitrogen). Após nova lavagem, as células foram contadas e ressuspensas a $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio completo (meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 2 mM de L-glutamina, 100 unidades/mL penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 25 mM HEPES, $2,5 \times 10^{-5}$ M 2-mercaptoetanol) (Gibco Invitrogen) contendo 20 ng/mL de GM-CSF (Sigma Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA), conforme previamente publicado (SA-NUNES et al., 2007; SA-NUNES et al., 2009). As células foram incubadas (37° C e 5% CO₂) em alíquotas de 1 mL/poço em placas de 24 poços estéreis, na presença de meio somente ou EGS de *Ae. aegypti* nas concentrações de 5, 10, 20 e 40 µg/mL em 6 replicatas por grupo.

Após 4 dias de incubação as células não aderentes de 3 replicatas de cada grupo foram coletadas pela lavagem dos poços com meio completo. Nas 3 replicatas restantes, metade do volume foi retirado e substituído pelo mesmo volume de meio completo novo, contendo 40 ng/mL de GM-CSF, na presença ou ausência das mesmas concentrações de EGS. Aos 7 dias de incubação, as células não aderentes das 3 replicatas restantes foram coletadas como descrito acima. Em ambos os casos, as células foram contadas e a diferenciação das células de medula óssea em células dendríticas nos diferentes tempos de cultura foi avaliada por citometria de fluxo (FACSCalibur ou FACSCanto II – BD Biosciences, San José, CA, EUA), através da expressão dos marcadores de superfície CD11b e CD11c. Para tanto, as células foram preparadas e marcadas conforme o item 3.12 descrito adiante.

3.4 Maturação das células dendríticas

Células de medula óssea de camundongos BALB/c foram obtidas como descrito no item 3.3. Dois milhões e meio de células foram ressuspensas em 10 mL de meio completo contendo 20 ng/mL de GM-CSF e incubadas (37° C e 5% CO₂) em placa de Petri estéril (100 × 20 mm) (BD Falcon, Franklin Lakes, NJ, USA). Após 4 dias de incubação, metade do volume (5 mL) foi retirado e substituído por 5 mL de RPMI completo contendo 40 ng/mL de GM-CSF. Aos 6 dias de incubação, as células não aderentes foram coletadas e ressuspensas a 10⁶ células/mL e distribuídas em placas de 24 poços em alíquotas de 1 mL por poço. Essas células foram incubadas “*overnight*” com meio somente ou EGS nas concentrações 5, 10, 20 e 40 µg/mL. Após esse período foram adicionados meio somente ou lipopolissacarídeo ultra puro (upLPS – Invivogen, San Diego, CA, EUA) aos poços (100 ng/mL, concentração final). As células foram incubadas por mais 24 horas e somente após esse período, as células foram lavadas, incubadas com anticorpo anti-CD16/CD32 (BD Biosciences) para bloqueio do receptor Fc e marcadas com anticorpos para MHC classe II, CD40, CD80 e CD86 (BD Biosciences) como será descrito no item 3.12.

3.5 Avaliação da função das células dendríticas

Células de medula óssea de camundongos BALB/c foram obtidas como descrito no item 3.4. Dois milhões e meio de células foram ressuspensas em 10 mL de meio completo contendo 20 ng/mL de GM-CSF e incubadas (37° C e 5% CO₂) em placa de Petri estéril (100 × 20 mm). Após 4 dias de incubação, metade do volume (5 mL) foi retirado e substituído por 5 mL de meio completo contendo 40 ng/mL de GM-CSF. Aos 7 dias de incubação, as células não aderentes foram coletadas e células CD11c⁺ foram purificadas utilizando colunas magnéticas MACS (Miltenyi Biotec Inc., Auburn, CA, EUA).

Uma suspensão de células CD11c⁺ contendo 2,5×10⁵ células/mL foram incubadas “*overnight*” (37° C e 5% CO₂) em tubos de fundo arredondado (BD Falcon) na ausência ou presença de EGS nas concentrações de 2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL. Após esse período, as células foram pulsadas com 100 µg/mL de ovalbumina (OVA - Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA) e incubadas na presença ou

ausência de 100 ng/mL de upLPS. Após 4 horas, as células foram lavadas 3 vezes com 3 mL de PBS, ressuspensas em meio completo e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço em placas de 96 poços. Paralelamente, um tubo extra contendo células CD11c⁺ previamente incubadas com meio completo apenas, foram pulsadas com OVA na presença ou ausência de upLPS por 4 horas. Após esse período foram lavadas com PBS e ressuspensas em meio contendo 40 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti*, de forma que EGS se manteve na cultura até o final da incubação. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço na placa de 96 poços. Linfócitos T CD4⁺ oriundos do baço de camundongos DO11.10 (que apresentam TCR transgênico para a sequência 323-339 da OVA) foram purificados utilizando colunas magnéticas MACS (Miltenyi Biotec Inc). Em alguns experimentos, foram utilizadas células total do baço desses animais. Uma suspensão contendo 10⁶ células/mL foi preparada e 100 µL foram adicionados aos poços na placa de cultura, que foi mantida à 37° C e 5% CO₂ por 72h. Após 48 h de incubação, 25 µL de resazurina 0,01% (preparada em meio completo) foram adicionados em todos os poços. A resazurina é um composto de cor azul, não tóxico, permeável e não fluorescente que utiliza as reações de redução provenientes de células metabolicamente ativas para converter a resazurina em uma molécula vermelha fluorescente chamada resofurina. A quantidade de fluorescência e também a variação na coloração produzida durante o ensaio é proporcional ao número de células vivas. Entre 18 e 24 horas após a adição da resazurina a densidade óptica (D.O.) de cada poço foi medida a 570 e 600 nm e a proliferação foi avaliada pela subtração dos valores obtidos entre a D.O. das duas leituras.

Em alguns casos, a proliferação celular também foi avaliada pela marcação com CFSE (do inglês Carboxifluoroscein Succinimidil Ester) (Invitrogen). Para isso, antes da co-incubação com as células CD11c⁺ e as células T CD4⁺ obtidas a partir do baço do camundongo DO11.10 foram incubadas com CFSE por 5 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz, depois foram lavadas 3 vezes com 10 mL de PBS. O CFSE é um composto não fluorescente que através da clivagem do grupo acetato pelas esterases intracelulares se torna fluorescente e liga proteínas citoplasmáticas de forma irreversível. Quando ocorre a divisão celular, metade da fluorescência vai para cada célula filha. Após 72 horas, as células foram marcadas com o anticorpo para CD4 e a intensidade da fluorescência dessas células foi avaliada por citometria de fluxo como descrito no item 3.12.

3.6 Efeito do EGS de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* na proliferação de linfócitos

Após eutanásia, camundongos BALB/c fêmeas tiveram o baço retirado em condições assépticas e colocado em 5 mL de RPMI 1640. O órgão foi macerado em peneiras com poros de 40 µm com a ajuda de um êmbolo de seringa estéril. As células foram centrifugadas a 300 *g* (5 min/4^o C), e após descarte do meio, os eritrócitos foram lisados. As células foram lavadas novamente e ressuspensas em meio completo para contagem em câmara de Neubauer. Suspensões celulares contendo 10⁶ células/mL foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço, em placas de 96 poços. A seguir, foram adicionados nos poços da cultura 50 µL do EGS das espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* em diversas concentrações. Após 30 minutos de pré-incubação, 50 µL de Con A na concentração final de 0,5 µg/mL, diluída em meio completo foram adicionados a cada poço e as culturas foram incubadas por 72 h a 37^o C e 5% CO₂. Após 48 h de incubação, 25 µL de resazurina 0,01% (preparada em meio completo) foram adicionados em todos os poços. Entre 24 e 48 horas após a adição da resazurina a densidade óptica de cada poço foi medida a 570 e 600 nm e a proliferação avaliada como descrito no item 3.5.

3.7 Fracionamento do EGS por cromatografia líquida de rápida performance (FPLC) e identificação das frações por espectrometria de massa (MS)

FPLC por filtração em gel (“peneira molecular”) foi realizada para fracionar preparações totais de EGS ou o material retido de filtros YM-100 (Millipore), usando colunas Superdex 75 e Superdex 200 (GE Healthcare Bio-Sciences Corp., Piscataway, NJ, EUA). Essas cromatografias foram realizadas no laboratório do Dr. José Marcos Ribeiro, da Section of Vector Biology, Laboratory of Malaria and Vector Research (NIAID/NIH). As frações foram eluídas a 0.2 mL/min com PBS (pH 7.4), usando uma bomba CM-4100 (Thermo Fisher Scientific) e a absorbância ultra violeta a 220 nm foi monitorada em espectrofotômetro (Thermo Fisher Scientific). As frações foram coletadas em placas de 96 poços com 1 minuto de intervalo entre as frações usando um coletor FC203-B (Gilson Inc., Middleton, WI, EUA) e um volume de 5 µL de cada fração foi utilizado para testar sua atividade em um ensaio de seleção de

larga escala (“highthrouput screening”) usando cultura de esplenócitos totais de camundongos BALB/c estimulados com Con A. A proliferação das células dos poços contendo as frações e a Con A e a avaliação dos resultados foram feitos da mesma maneira descrita no item 3.5.

Uma vez determinadas as frações ativas nos ensaios funcionais, alíquotas das mesmas foram enviadas ao centro de espectometria de massa (*core facility* – NIAID/NIH) onde foram analisadas.

3.8 Ensaio de proliferação de linfócitos de animais sensibilizados com picadas dos mosquitos *Ae. aegypti* e *An. aquasalis*

Para sensibilizar camundongos BALB/c com picadas de *Ae. aegypti* e *An. aquasalis* os animais foram anestesiados por inoculação intramuscular de acepromazina (0,1 mg/kg) e xilazina (0,8 mg/kg). Após observado o efeito da anestesia, cada animal foi posicionado com a barriga para baixo em telas montadas sobre recipientes plásticos de 12 cm de diâmetro, contendo 50 mosquitos machos e fêmeas de *Ae. aegypti* ou *An. aquasalis* na proporção de 1:3, que tiveram a alimentação com sacarose suspensa vinte e quatro horas antes da sensibilização. Os camundongos foram mantidos sobre a tela por 20-30 minutos para que os mosquitos tivessem contato direto com a pele do animal e tempo suficiente para realizar o repasto sanguíneo. Esse procedimento foi realizado 4 vezes com intervalos de 15 dias. Animais do grupo controle também foram anestesiados, porém não tiveram contato com os mosquitos. Quinze dias após a última sensibilização, os animais foram eutanasiados e tiveram o baço retirado. Suspensões celulares contendo 10^6 células/mL de cada grupo experimental e de seus respectivos controles não expostos às picadas foram preparadas e distribuídas em alíquotas de 100 µL por poço, em placas de 96 poços. A seguir, as células foram pré-incubadas com EGS de *Ae. aegypti* e de *An. aquasalis*, juntos ou separados por 30 minutos. As células foram então estimuladas com Con A na concentração final de 0,5 µg/mL. A proliferação foi determinada como descrito no item 3.5.

3.9 Ensaio de neutralização das atividades do EGS utilizando sobrenadante de cultura de esplenócitos de animais sensibilizados por picadas de *Ae. aegypti*

Animais foram sensibilizados por picadas de *Ae. aegypti* e as células do baço desses animais foram preparadas 15 dias após a última infestação como descrito no item 3.8. As células do baço foram preparadas como descrito no item 3.6. Suspensões celulares contendo 10^4 , 10^5 e 10^6 células/mL foram distribuídas em alíquotas de 1 mL em placas de 24 poços e colocadas em cultura por 72 horas. As placas foram então centrifugadas ($300\text{ g}/4^\circ\text{C}$) e o sobrenadante de cultura livre de células foram coletados e utilizados nos ensaios de inibição induzida pelo EGS de *Ae. aegypti*, conforme descrito no item 3.6.

3.10 Transferência adotiva e imunização de camundongos

Células totais de baço de camundongos DO11.10 foram preparadas em meio completo e incubadas a 37°C e 5% CO_2 por 2h em placas de Petri. As células não aderentes foram removidas e uma suspensão celular foi preparada em PBS contendo 1% de soro fetal bovino. Essas células foram transferidas i.v. para camundongos BALB/c, num volume de 200 μL contendo 3×10^6 células. Após 24 horas, esses camundongos foram imunizados subcutaneamente em dois sítios da região dorsal com 100 μL de uma emulsão volume/volume contendo OVA diluída em PBS e adjuvante completo de Freund (40 μg de OVA por animal). Após 7 dias as células do baço desses animais e dos animais controles foram coletadas e preparadas em suspensões com 10^6 células/mL. Ensaios de reestimulação *in vitro* foram conduzidos em células pré-incubadas com EGS ou meio somente por 30 minutos, seguido da estimulação com OVA (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ou Con A (0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A proliferação dessas células foi avaliada como descrito no item 3.5.

3.11 Ensaios de apoptose

Para avaliar se o EGS de *Ae. aegypti* induz apoptose nas células T *naïve* e de memória, foram preparadas culturas de células totais de baço de camundongos BALB/c *naïve* (controle negativo) e daqueles que receberam células de

camundongos DO11.10 e foram posteriormente imunizados com OVA. Essas células foram incubadas com meio somente, EGS e Con A como descrito no item 3.10. Após 8 e 24 horas de incubação, as células foram coletadas e marcadas com anticorpos para CD4, CD62L (células *naïve*), CD44 (células ativadas/memória) e anexina V (se liga a fosfatidilserina que é um componente exposto pela célula que entra em apoptose) e foram avaliadas por citometria de fluxo como descrito no item 3.12.

3.12 Fenotipagem celular por citometria de fluxo

Para verificar a relação de células vivas e debris celulares ao final do período de incubação dos experimentos de proliferação descritos nos itens 3.6 nas culturas quando incubadas com EGS de *Ae. aegypti*, células do baço de um camundongo BALB/c foram preparadas de acordo com o protocolo descrito no item 3.6. Uma suspensão contendo 10^6 células/mL foi preparada e distribuída em alíquotas de 100 μ L/poço em uma placa de 96 poços. Em seguida, 50 μ L de EGS de *Ae. aegypti* nas concentrações finais de 0,1, 0,5, 1, 5, 10 e 20 μ g/mL foram adicionadas aos poços e incubadas por 30 minutos. Após essa incubação, 50 μ L de meio de cultura ou Con A na concentração final de 0,5 μ g/mL foi adicionada aos poços. Após 72 horas de incubação, as células foram analisadas em função de seu tamanho (FSC) e complexidade interna (SSC) através da citometria de fluxo e comparadas com células frescas, preparadas de um baço recém removido.

Para a marcação das células obtidas nas culturas com os anticorpos descritos nos itens 3.3, 3.4, 3.5 e 3.11 as mesmas foram centrifugadas, ressuspensas em tampão de FACS (PBS contendo 1% de soro fetal bovino) e contadas. Alíquotas contendo o mesmo número de células de cada grupo foram transferidas para placas de 96 poços de fundo arredondado e incubadas por 15 minutos a 4^o C com anticorpo anti-CD16/CD32 (diluição final 1:1000) para bloqueio dos receptores Fc presentes em fagócitos. A seguir, foram adicionados anticorpos para os marcadores descritos nos itens 3.3, 3.4, 3.5 e 3.11, conjugados com fluorocromos e em diluições apropriadas, seguido de uma nova incubação por 30 minutos a 4^o C, protegida da luz. Após lavagem, as células foram transferidas para tubos de polipropileno de 12 x 75 mm (BD Biosciences) e as amostras foram adquiridas nos citômetros FACSCalibur ou FACSCanto II, do Serviço de Citometria

do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Os anticorpos utilizados foram tanto da empresa BD Biosciences quando da empresa Biolegend.

A análise dos resultados foi realizada utilizando-se o software FlowJo, versão 7.5.5 (Tree Star, Ashland, OR, EUA).

3.13 Análise estatística dos resultados

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

4 RESULTADOS

4.1 Efeito do EGS de *Ae. aegypti* na diferenciação das células dendríticas

Nosso primeiro objetivo foi avaliar se a presença do EGS de *Ae. aegypti* interfere na diferenciação de células dendríticas murinas a partir de células de medula óssea, induzida por GM-CSF. Monitoramos esse processo de diferenciação por citometria de fluxo que é uma técnica muito utilizada na imunologia, pois permite a avaliação de diversos parâmetros celulares como tamanho, complexidade interna, moléculas presentes na superfície celular e também moléculas intracelulares.

As células dendríticas são caracterizadas por expressar as moléculas CD11b e CD11c na sua superfície, dentre outras. O CD11b pode se associar ao CD18 formando o heterodímero CD11b/CD18 (MAC-1 ou CR3) que faz parte da família das integrinas e tem função importante na adesão leucocitária (ARNAOUT, 1990; CORBI et al., 1988; CORBI et al., 1987). Da mesma forma, o CD11c associado ao CD18 forma a integrina CD11c/CD18 (CR4) e tem funções semelhantes ao CD11b/CD18. Ambos são receptores de uma fração do complemento, o iC3b, e outras moléculas como fibrinogênio e heparina (LUO, CARMAN e SPRINGER, 2007). Diferentes tipos celulares expressam diferentes padrões dessas moléculas, e enquanto neutrófilos e macrófagos expressam apenas CD11b, mas não CD11c em sua superfície, células dendríticas possuem alta expressão de ambos marcadores.

Na Figura 1 apresentamos a estratégia de análise utilizada nos experimentos de diferenciação de células dendríticas descrito no item 3.3 de Material e Métodos. Inicialmente, fizemos a exclusão de células potencialmente mortas e debris celulares que normalmente aparecem na região inferior esquerda da figura em “dotplot” representando o tamanho (FSC) e a complexidade interna ou granulosidade (SSC) da amostra (Figura 1A). Em nossa experiência as culturas de células de medula óssea apresentam autofluorescência elevada em todos os canais de análise do citômetro. Por esse motivo, em todas as aquisições de amostras deixamos aberto um canal do citômetro que não estava sendo utilizado na análise, ou seja, sem nenhum fluorocromo para ser detectado. As células selecionadas no “gate” descrita acima foram então analisadas em função de seu tamanho (FSC) e a fluorescência nesse canal (FL3 do “dotplot” da Figura 1B) e as células que apresentam uma fluorescência natural nesse canal são então removidas para eliminar os eventos falsos positivos que incorreriam em uma análise imprecisa dos

resultados. Finalmente, partimos para a visualização da expressão das moléculas CD11b e CD11c utilizando quadrantes que separam as células simples positivas, duplo positivas ou duplo negativas (Figura 1C).

Uma vez determinada a estratégia correta de análise dos parâmetros do ensaio, avaliamos o efeito do EGS do mosquito *Ae. aegypti* na diferenciação das células dendríticas a partir de precursores da medula óssea incubadas com GM-CSF. As Figuras 2A e 2B mostram “*dotplots*” representativos de células de medula óssea cultivadas por 4 e 7 dias na presença de GM-CSF apenas (controle) ou GM-CSF e concentrações crescentes de EGS. Não foram notadas alterações nas porcentagens relativas de células duplo-positivas (CD11b⁺/CD11c⁺) com 4 dias (Figuras 2A e 2C) e 7 dias (Figuras 2B e 2D) de cultura, quando comparados os diferentes grupos experimentais.

Figura 1- Estratégia de análise para os ensaios de diferenciação de células dendríticas a partir de culturas de células de medula óssea estimuladas com GM-CSF.

(A) Exclusão das células mortas e debris celulares; (B) Exclusão dos eventos autofluorescentes em um canal do citômetro que não possui fluorocromo para ser detectado (FL3 nesse caso); (C) Avaliação da expressão das moléculas CD11b e CD11c.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 2 - Expressão de CD11b e CD11c em células não aderentes provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c na presença de GM-CSF (Controle) ou GM-CSF e EGS de *Ae. aegypti* (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) durante 4 e 7 dias.

(A) “Dotplot” representativo de cada grupo com 4 dias de cultura. (B) “Dotplot” representativo de cada grupo com 7 dias de cultura. (C) Média das porcentagens relativas das células duplo positivas (CD11b⁺/CD11c⁺) com 4 dias de cultura. (D) Média das porcentagens relativas das células duplo positivas (CD11b⁺/CD11c⁺) com 7 dias de cultura.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

4.2 Avaliação da atividade do EGS de *Aedes aegypti* na maturação das células dendríticas

Durante o processo de maturação, as células dendríticas sofrem diversas alterações. Dentre elas, há um aumento da expressão de MHC classe II e a modificação da expressão de moléculas coestimuladoras. Para avaliar se a incubação com EGS tem algum efeito na maturação dessas células, analisamos o padrão de expressão dessas moléculas em células dendríticas estimuladas ou não com upLPS.

A Figura 3 apresenta a estratégia de análise utilizada para os ensaios de maturação das células dendríticas. Assim como descrito na Figura 1, fizemos inicialmente a exclusão de células potencialmente mortas e debris celulares (Figura 3A) e em seguida removemos da análise as células autofluorescentes de um canal que foi deixado aberto, mas não que não foi utilizado para detecção de nenhum fluorocromo (Figura 3B). A seguir, selecionamos a população CD11c⁺ representando as células dendríticas (Figura 3C) e então avaliamos a expressão de MHC de classe II nessa população representando os resultados por um histograma (Figura 3D) ou a expressão desse mesmo marcador em função da expressão das moléculas coestimuladoras CD40 (Figura 3E), CD80 (Figura 3F) e CD86 (Figura 3G).

A Figura 4A mostra que células CD11c⁺ geradas em nossas condições apresentam uma expressão basal de MHC de classe II, com 3 picos de intensidade de fluorescência diferentes (baixo, médio e alto). Na presença de upLPS, essa expressão se torna bimodal, predominando o pico de alta intensidade de fluorescência, caracterizando o aumento da expressão de MHC de classe II nessas células (Figura 4B). A presença de EGS nas culturas não afeta o perfil de expressão dessas moléculas nas duas condições estudadas (meio – Figuras 4A e 4C ou upLPS – Figuras 4B e 4D).

Além da alteração na expressão de MHC de classe II pelas células CD11c⁺ quando incubadas com upLPS, existe também uma regulação positiva da expressão das moléculas coestimuladoras nessas células. O “gate” apresentado na Figura 5A mostra uma pequena porcentagem de células expressando a molécula CD40 em função da expressão de MHC de classe II quando incubadas com meio somente. Na presença de upLPS existe um aumento no número de células com alta expressão desses marcadores (Figura 5B). A presença de EGS de *Ae. aegypti* nas

concentrações 5, 10, 20 e 40 µg/mL não alterou a expressão da molécula CD40 nas células CD11c⁺ quando incubadas com meio somente, como mostram as Figuras 5A e 5C e também quando incubadas com upLPS (Figuras 5B e 5D).

A expressão das moléculas CD80 e CD86 nas células CD11c⁺ também foi avaliada. Quando essas células foram incubadas com upLPS também ocorreu um aumento na porcentagem de células expressando esses marcadores (dados não mostrados). A presença de EGS nas concentrações 5, 10, 20 e 40 µg/mL também não alterou a expressão dessas moléculas quando incubadas na presença ou ausência de upLPS (dados não mostrados).

Esses dados mostram que o EGS de *Ae. aegypti* não interfere na maturação das células CD11c⁺ diferenciadas com GM-CSF a partir de células da medula óssea de camundongos.

Figura 3- Estratégia de análise para os ensaios de maturação de células dendríticas a partir de culturas de células de medula óssea estimuladas com GM-CSF.

(A) Exclusão das células mortas e debris celulares; (B) Exclusão dos eventos autofluorescentes em um canal do citômetro que não possui fluorocromo para ser detectado (FL3-H nesse caso). (C) Seleção de células CD11c⁺. (D) Expressão das moléculas MHC II. (E) Expressão das moléculas CD40. (F) Expressão das moléculas CD80. (G) Expressão das moléculas CD86.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 4- Expressão de MHC II em células CD11c⁺ provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c diferenciadas com GM-CSF durante 6 dias, incubadas “overnight” na presença de meio somente (Controle) ou EGS de *Ae. aegypti* (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e estimuladas ou não com upLPS (100 ng/mL).

(A) Histograma representativo de cada grupo incubado com meio somente. (B) Histograma representativo de cada grupo incubado com upLPS. (C) Média das porcentagens relativas das células com expressão intermediária (MHC II^{INT}) e alta (MHC II^{HIGH}) incubadas com meio somente. (D) Média das porcentagens relativas das células expressando MHC II^{INT} e MHC II^{HIGH} incubadas com upLPS.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 5- Expressão de MHC II e CD40 em células não aderentes provenientes de culturas de medula óssea de camundongos BALB/c diferenciadas com GM-CSF durante 6 dias, incubadas “overnight” na presença de meio somente (Controle) ou EGS de *Ae. aegypti* (concentração final: 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e incubadas novamente na presença ou ausência de upLPS (100 ng/mL).

(A) “Dotplot” representativo de cada grupo incubado com meio somente. (B) “Dotplot” representativo de cada grupo incubado com upLPS. (C) Média das porcentagens relativas das células duplo positivas (MHC II^{HIGH}/CD40⁺) incubadas com meio somente. (D) Média das porcentagens relativas das células duplo positivas (MHC II^{HIGH}/CD40⁺) incubadas com upLPS.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

4.3 Efeito do EGS na função das células dendríticas

Com o objetivo de investigar o efeito do EGS de *Ae. aegypti* na apresentação de antígenos pelas células dendríticas, purificamos células CD11c⁺ utilizando colunas magnéticas e as incubamos “overnight” com EGS em várias concentrações. As células foram pulsadas com OVA e upLPS, após 4 horas foram lavadas 3 vezes com PBS e distribuídas em poços na placa de cultura. Linfócitos T CD4⁺ oriundos de camundongos DO11.10 (que possuem TCR transgênico para a sequência 323-339 da OVA) foram adicionados à cultura. A proliferação foi medida utilizando uma técnica colorimétrica que mede o metabolismo celular (AHMED, GOGAL e WALSH, 1994; SA-NUNES et al., 2007; SA-NUNES et al., 2009).

Como esperado, nos grupos onde as células dendríticas foram pulsadas com OVA e upLPS, foi observada a proliferação dos linfócitos T CD4⁺ em comparação aos grupos controle incubados com meio somente (Figura 6A). Porém, quando as células dendríticas foram pré-incubadas com diferentes concentrações de EGS, a proliferação das células T CD4⁺ induzida por OVA foi semelhante em todos os grupos (Figura 6A), demonstrando que os componentes salivares de *Ae. aegypti* não interferem na biologia das células dendríticas. Resultados similares foram observados com células dendríticas pré-incubadas com EGS e pulsadas com OVA somente (dados não mostrados).

Experimentos semelhantes foram realizados, porém incluindo um grupo onde o EGS foi recolocado na cultura após a lavagem das células dendríticas no momento da adição dos linfócitos T CD4⁺ do baço de camundongos DO11.10. Nessas condições, a proliferação antígeno-específica das células T CD4⁺ foi completamente inibida (Figura 6B). A mesma abordagem foi repetida, mas agora estimulando as células em cultura com Con A, um ativador policlonal de células T. A Figura 6C demonstra que quando o EGS é mantido na cultura, a proliferação policlonal de células T também é completamente inibida. Conjuntamente, esses dados mostram que o EGS afeta os linfócitos T de uma maneira independente de células dendrítica.

Diversos trabalhos empregam a resazurina para avaliar a proliferação celular, por ser um reagente barato, fácil de manipular e que gera dados reprodutíveis em qualquer laboratório com infra-estrutura mínima de cultura celular. Porém, como esse reagente avalia na realidade o metabolismo celular, realizamos

um experimento para confirmar nossos resultados marcando as células com CFSE e avaliando os ciclos celulares por citometria de fluxo. Na estratégia de análise das amostras marcadas com CFSE, células que passaram sozinhas pelo laser, denominadas “*singlets*”, foram selecionadas por ter altura (FSC-H) e área (FSC-A) de tamanhos similares (Figura 7A). Em seguida, células potencialmente mortas e debris celulares foram excluídas, assim como mostrado nas análises anteriores (Figura 7B). Por fim, o “gate” na Figura 7C mostra células CD4⁺ com intensidade de fluorescência do CFSE diminuída em razão da divisão celular. Essa metodologia permitiu confirmar que, de fato, o EGS não altera a apresentação de antígenos pelas células dendríticas (Figura 8A), porém a reposição do EGS nas culturas após a lavagem das células inibe a proliferação das células T CD4⁺ estimuladas por Con A (Figura 8B).

Figura 6- Avaliação da proliferação de linfócitos T CD4⁺ de camundongos DO11.10 estimulados por células dendríticas que foram previamente incubadas com EGS de *Ae. aegypti* e pulsadas com OVA e upLPS por 4 horas.

(A) Proliferação de células T CD4⁺ de camundongos DO11.10 estimulados por células dendríticas pré-incubadas com várias concentrações de EGS (2,5, 5, 10, 20 e 40 µg/mL) e pulsadas com OVA e upLPS por 4 horas. (B). Em alguns casos, as células foram pré-incubadas com meio somente ou com 40 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti* e pulsadas com OVA e up LPS por 4 horas. Após a lavagem dessas células 40 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti* foi repostado em alguns grupos. (C) Células foram pré-incubadas com meio somente ou com 40 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti*. Após a lavagem dessas células 40 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti* foi repostado em alguns grupos e estimulados com Con A. (* p ≤ 0,05 versus grupo controle; # p ≤ 0,05 versus grupo Con A).

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 7- Estratégia de análise para os ensaios de proliferação de células T CD4⁺.

(A) Seleção das células que passaram sozinhas pelo laser (*"singlets"*). (B) Exclusão das células mortas e debris celulares; (C) Seleção de células CD4⁺ com baixa intensidade de CFSE.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 8- Avaliação da proliferação de linfócitos T CD4⁺ de camundongos DO11.10 estimulados por células dendríticas que foram previamente incubadas com EGS de *Ae. aegypti* e pulsadas com OVA e upLPS por 4 horas.

Os linfócitos T CD4⁺ foram corados com CFSE antes da co-incubação com as células dendríticas e após 72 horas a proliferação foi avaliada por citometria de fluxo. “Dotplot” representativo de cada grupo incubado com meio somente ou 40 µg/mL de EGS. (A) As células dendríticas foram pulsadas com OVA e upLPS; (B) Os linfócitos foram estimulados com Con A.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

4.4 Comparação do efeito do EGS de *Ae. aegypti* com EGS de *An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* na proliferação de linfócitos e seu mecanismo de ação

Os efeitos observados no experimento de lavagem das células (Figura 6) foram obtidos com apenas uma concentração de EGS (40 µg/mL). Por essa razão, decidimos realizar uma curva concentração-resposta de inibição da proliferação para avaliar a potência dos componentes salivares de *Ae. aegypti* nesse ensaio. Para isso, pré-incubamos células totais de baço de camundongos BALB/c com concentrações crescentes de EGS por 30 minutos e estimulamos essas células com Con A por 72 horas, mantendo o extrato na cultura. Os resultados da Figura 9 mostram que o EGS de *Ae. aegypti* inibe a resposta proliferativa de células totais de baço de maneira concentração dependente. Como fazemos experimentos com diferentes preparações de EGS ao longo do tempo, a concentração onde o efeito máximo ocorre varia entre os experimentos, mas em geral observamos inibição completa da proliferação com concentrações de EGS ao redor de 10 µg/mL.

Os resultados apresentados na Figura 9 mostram que nas concentrações mais altas, o EGS inibiu mesmo o metabolismo basal das células, sugerindo que essas células estariam morrendo na cultura. De fato, quando avaliamos o fenótipo celular de uma preparação de células recém extraídas do baço de camundongos por citometria de fluxo, a maioria (66,8%) aparece na região considerada como sendo de células viáveis (Figura 10A). Após 3 dias de cultura em meio somente, o fenótipo dessas células muda completamente e somente 14,9% aparecem na região de viabilidade (Figura 10B), sendo que a incubação com quantidades crescentes de EGS diminui ainda mais essa porcentagem (Figuras 10C-G). Por outro lado, a incubação com Con A induz a proliferação e recupera o fenótipo viável dessas células (71,5%) e muitas aparecem maiores e com mais grânulos indicando sua ativação (Figura 10H). Entretanto, na presença de EGS, essa estimulação não surte efeito e o fenótipo fica muito parecido com aquele das células incubadas com meio somente (Figura 10I-N). Para investigar o mecanismo pelo qual as células estariam morrendo na presença de EGS, avaliamos a apoptose dessas células após 72 horas de cultura por citometria de fluxo. Como estratégia de análise, células que passaram sozinhas pelo laser (“*singlets*”) foram selecionadas (Figura 11A). Em seguida, células potencialmente mortas e debris celulares foram excluídas (Figura 11B). Por fim, células expondo anexina foram avaliadas por histograma (Figura 11C).

Paralelamente, selecionamos apenas as células positivas para o marcador CD4 (Figura 11D), para avaliar potenciais células em apoptose dentro dessa população (Figura 11E). Como esperado, a presença de EGS nas culturas inibe a proliferação de linfócitos por induzir apoptose nessas células (Figura 12). Células T CD8⁺ também foram avaliadas e apresentaram morte celular semelhante às células T CD4⁺ (dados não mostrados).

Para avaliar se o EGS de outras espécies também exerce algum efeito na proliferação de linfócitos, células do baço de camundongos BALB/c foram pré-incubadas com EGS de *Ae. aegypti*, *An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* em várias concentrações e estimuladas com Con A. De maneira interessante, o EGS de *Ae. aegypti* é o único a exibir atividade sobre a proliferação de linfócitos (Figura 13A), sendo que esse efeito não é observado no EGS das espécies *An. aquasalis* (Figura 13B), *P. duboscqi* (Figura 13C) e *P. papatasi* (Figura 13D).

Figura 9- Efeito do EGS de *Ae. aegypti* na proliferação de células totais de baço de camudongos BALB/c estimulados com Con A.

As células do baço foram pré-incubadas por 30 minutos com EGS de *Ae. aegypti* nas concentrações 0,1, 0,5, 1, 5, 10, 20 e 40 µg/mL e estimuladas por 96 horas com Con A. A proliferação foi medida utilizando uma técnica colorimétrica que mede o metabolismo celular (* $p \leq 0,05$ versus grupo "-").

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 10- Efeito do EGS de *Ae. aegypti* no número de células viáveis em cultura após 72 horas de incubação com meio somente ou Con A.

A avaliação indireta da viabilidade dessas células se deu através da análise do tamanho (FSC) e da complexidade interna (SSC) das células em cultura.]

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 11- Estratégia de análise para avaliação da apoptose.

(A) Seleção das células que passaram sozinhas pelo laser (*"singlets"*). (B) Exclusão das células mortas e debrís celulares; (C) Análise das células positivas para anexina V; (D) Seleção de células CD4⁺; (E) Análise das células positivas para anexina V dentro do *"gate"* de CD4⁺.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 12- Avaliação da apoptose induzida por EGS de *Ae aegypti* em células de camundongos BALB/c após 72 horas de cultura estimuladas ou não por Con A

A apoptose foi avaliada em função da exposição de anexina V por essas células.
 FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 13- Efeito do EGS das espécies *Ae. aegypti*, *An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi* na proliferação de células totais de baço de camundongos BALB/c estimulados com Con A.

As células do baço foram pré-incubadas por 30 minutos com EGS de *Ae. aegypti* (A), *An. aquasalis* (B), *P. duboscqi* (C) e *P. papatasi* (D) nas concentrações indicadas na figura e estimuladas por 72 horas com Con A. (* $p \leq 0,05$ versus grupo "-").

FONTE: BIZZARRO, 2012.

4.5 Fracionamento do EGS por FPLC e identificação de candidatos por espectrometria de massa

Com o objetivo de melhor caracterizar a atividade inibidora do EGS, realizamos o fracionamento do extrato bruto por FPLC em uma coluna de filtração em gel Superdex 75. A Figura 14A mostra que a atividade de inibição da proliferação do EGS eluiu em uma única fração que coincide com um grande pico no início da corrida. Pelas características da cromatografia, esse pico corresponde aos componentes que são maiores do que 75 kDa, e que por isso não penetraram nos poros da matriz da coluna, que só permitem a passagem de moléculas abaixo dessa massa molecular (*flow through*). Assim, realizamos outro FPLC do EGS com uma coluna Superdex 200, que possui um poder de discriminação melhor para moléculas maiores. Para diminuir a quantidade de moléculas de baixa massa molecular, uma alíquota de EGS foi filtrada em um Microcon YM-100 para retirar proteínas abaixo de 100 kDa. O material resultante foi então aplicado à coluna e o cromatograma representativo é mostrado na Figura 14B. Dessa vez a atividade apareceu em diversas frações, todas próximas entre si, e que correspondem ao final do segundo maior pico da cromatografia, que eluiu em volume equivalente a proteínas de massa molecular acima de 400 kDa (Figura 14C).

A fração correspondente ao pico da atividade, uma fração de cada lado que apresentou atividade parcial e uma fração não relacionada, indicadas pelas setas F1 a F4 na Figura 14B, foram coletadas e enviadas para análise por espectrometria de massa em um Centro de Facilidades (*“core facility”*) do National Institute of Allergy and Infectious Diseases / National Institutes of Health. O perfil da fragmentação iônica dos componentes detectados em cada fração foi comparado com uma base de dados composta pelo genoma e pelo transcriptoma de glândula salivar de *Ae. aegypti* e as proteínas correspondentes foram identificadas. Os resultados completos da análise de cada fração podem ser observados nos Anexos A.1 ao A.4 ao final dessa dissertação. De todos os potenciais candidatos, selecionamos somente aqueles que apareceram nas frações F1/F2/F3 ou em todas as frações, num total de 13 proteínas (Figura 15). Destas, 7 proteínas apareceram nas 4 frações (Figura 15A-G), e por isso provavelmente não estão relacionadas com a atividade de inibição da proliferação, enquanto 6 outras aparecerem justamente em F1/F2/F3 onde a atividade foi observada (Figura 14H-N). Três destas proteínas

apresentaram um perfil de abundância relativa condizente com a atividade observada no ensaio, ou seja, maior quantidade em F2 (efeito máximo), menor quantidade em F1 e F3 (efeito parcial) e não foram detectadas em F4 (Figura 15LI-N). Enquanto as duas primeiras possuem uma massa molecular mais baixa (31,0 kDa e 97,9 kDa), a terceira proteína apresenta massa molecular mais alta (185,4 kDa), sugerindo ser o candidato mais provável (Figura 15N). Adicionalmente, uma análise prévia de bioinformática realizada pelo nosso colaborador, Dr. José Marcos Ribeiro, do NIAID/NIH indica que esse transcrito (AAFLOO3655-PA) está truncado na anotação do genoma e que a proteína traduzida é muito maior do que o predito em nossos resultados, reforçando a hipótese de que de fato essa é a molécula responsável pela inibição da proliferação. Um estudo mais aprofundado poderá esclarecer se essa proteína é mesmo responsável pelo efeito biológico observados no EGS de *Ae. aegypti*.

Figura 14- Fracionamento do EGS de *Ae. aegypti* por FPLC.

(A) Efeito das frações obtidas por FPLC utilizando coluna Superdex 75 na proliferação de linfócitos T – EGS total. (B) Efeito das frações obtidas por FPLC utilizando coluna Superdex 200 na proliferação de linfócitos T – retido de Microcon YM-100. As setas indicam 3 frações com atividade inibidora (F1/F2/F3) e 1 fração não relacionada (F4). As linhas pontilhadas representam a inibição causada por cada fração e a linha contínua representa os picos dos componentes eluídos. (C) Curva padrão preparada com moléculas de peso molecular conhecidos.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 15- Abundância relativa das proteínas candidatas encontradas nas frações F1, F2, F3 e F4 e determinadas por espectometria de massa.

Candidatos selecionados por aparecerem nas frações F1, F2 e F3 ou em todas as frações. A lista completa das proteínas detectadas em cada fração encontra-se nos Anexos A.1 ao A.4.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

4.6 Avaliação da atividade de EGS em modelos de memória imunológica

Como o EGS de *Ae. aegypti* induziu apoptose nas células T *naïve* presentes nos ensaios de proliferação, testamos o quanto esse efeito também ocorreria em células T de memória que são sabidamente mais resistentes à apoptose. Assim, desenvolvemos um modelo de sensibilização natural aos componentes da saliva, expondo camundongos ao *Ae. aegypti* por 4 vezes com intervalos de 15 dias entre as exposições. Após 15 dias da última exposição, avaliamos a proliferação das células do baço desses animais nas mesmas condições apresentadas na Figura 7. Como já demonstrado anteriormente, o EGS de *Ae. aegypti* inibe tanto a proliferação basal quanto a proliferação induzida por Con A em células totais de baço, de forma concentração-dependente, alcançando inibição máxima com 10 µg/mL, valor que se reproduz na maioria dos experimentos realizados (Figura 16A). Por outro lado, quando as células utilizadas são provenientes de baços de animais previamente sensibilizados com picadas de *Ae. aegypti*, uma pequena quantidade de EGS já é capaz de induzir proliferação antígeno específica dessas células que chega ao pico com 0,5 µg/mL e não é reduzida na presença de concentrações superiores de EGS. Por outro lado, em presença de Con A, um fenômeno duplo ocorre. Em baixas concentrações de EGS (0,1 µg/mL), a proliferação induzida por Con A é potencializada, enquanto em concentrações maiores, há uma inibição concentração-dependente da proliferação, mas que é apenas parcial (Figura 16B). De maneira interessante, a proporção de células resistentes a essa inibição mesmo com a mais alta concentração (10µg/mL) é sempre similar à proporção de células que proliferam de forma antígeno específica, como mostra a barra pontilhada na Figura 16B.

Para descartar a possibilidade de que linfócitos B presentes na cultura das células de baço de animais previamente expostos às picadas de *Ae. aegypti* estejam produzindo anticorpos contra componentes salivares do mosquito e assim neutralizando parcialmente os efeitos do EGS, células de animais controles ou sensibilizados por picadas de *Ae. aegypti* foram cultivadas por três dias em diferentes quantidades de células. Meio de cultura sem a presença de células também foi mantido nas mesmas condições como controle. Após o período de incubação, o sobrenadante dessas células e o meio de cultura controle foram coletados e utilizados para ressuspender células do baço de um camundongo

controle. Essas células foram pré-incubadas com meio somente ou EGS na concentração de 10 µg/mL por 30 minutos e em seguida estimuladas com Con A por 72 horas. Como pode ser observado na Figura 17, as células de um animal que nunca foi picado por um mosquito, quando incubadas com o sobrenadante das células de animais controle (Figura 17A) ou de animais sensibilizados por picadas (Figura 16B) proliferam da mesma maneira na presença de Con A. E a inibição dessa proliferação também é observada de maneira similar nas células ressuspendidas com os diferentes sobrenadantes de cultura. Esses resultados demonstram que o bloqueio parcial da atividade do EGS de *Ae. aegypti* em células de animais sensibilizados à picada do mosquito não é devido à presença de anticorpos produzidos pelos linfócitos B na cultura. Esses resultados reforçam a hipótese de que o EGS de *Ae. aegypti* afeta diferencialmente células *naïve* e de memória geradas pela sensibilização.

Para confirmar esses resultados em outro sistema, investigamos também os efeitos do EGS de *Ae. aegypti* na proliferação de células de baço provenientes de animais sensibilizados com picadas de *An. aquasalis*, um mosquito de outra subfamília e não relacionado ao *Ae. aegypti*. Como esperado, as células de baço de camundongos sensibilizados com *An. aquasalis* proliferam na presença de EGS dessa mesma espécie, mas não na presença de EGS de *Ae. aegypti*, indicando estimulação antígeno específica. Quando essas mesmas células são incubadas com os dois EGS ao mesmo tempo, a resposta proliferativa persiste, comprovando a ausência de atividade do EGS de *Ae. aegypti* sobre as células de memória específicas para os componentes salivares de *An. aquasalis* (Figura 18). Adicionalmente, quando as células de baço dos animais sensibilizados com *An. aquasalis* são estimuladas com Con A, observa-se uma grande proliferação, provavelmente tanto de células *naïve* quanto de memória. Na presença do EGS de *Ae. aegypti*, essa proliferação é apenas parcialmente inibida, sugerindo que as células de memória presentes na cultura continuam vivas e proliferando (Figura 18). Isso sugere que o EGS de *Ae. aegypti* também não afeta as células de memória dos animais sensibilizados com outra espécie de mosquito.

Com o objetivo de reforçar ainda mais nossa hipótese, realizamos a transferência adotiva de células não aderentes do baço de camundongos DO11.10 para camundongos BALB/c. Os animais receptores foram então imunizados com OVA para induzir a expansão das células do doador e permitir a geração de células

de memória. Após uma semana, as células do baço dos animais receptores foram pré-incubadas com EGS como descrito e estimuladas com OVA ou Con A para avaliar a proliferação antígeno-específica e policlonal, respectivamente. Observamos que em animais controle (aqueles que não receberam células de doadores DO11.10), as células do baço não proliferam quando estimuladas por OVA mas proliferam quando estimuladas com Con A, como esperado. Essa proliferação policlonal é significativamente inibida na presença de baixas concentrações de EGS (0,5 µg/mL) sendo totalmente inibida com 10 µg/mL, reproduzindo os experimentos anteriores (Figura 19A). Já as células do baço de animais que receberam as células de doadores DO11.10, proliferam após estimulação com OVA e também Con A. Porém, a proliferação antígeno específica é apenas discretamente inibida na presença da concentração mais alta de EGS de *Ae. aegypti* (Figura 19B) e a proliferação policlonal estimulada pela Con A foi parcialmente inibida (Figura 19B), diferente do que foi mostrado no animal controle (Figura 19A). Realizamos também a fenotipagem dessas células com marcadores de células T *naïve* e de ativação/memória e avaliamos a presença dessas populações após 8, 24 e 72 horas de estimulação. Para isso, seguimos estratégias de análise similares às demonstradas anteriormente. Os “*singlets*” foram selecionados (Figura 20A) e células potencialmente mortas e debris celulares foram excluídos (Figura 20B). Apenas as células positivas para o marcador CD4 foram selecionadas (Figura 20C) e as populações de células *naïve* e de memória foram analisadas segundo a expressão de CD62L e CD44 (Figura 20D). Células *naïve* expressam os marcadores CD62L^{HIGH} e CD44^{LOW}, enquanto as células T de memória são divididas em dois subtipos: células T de memória efetora que apresentam CD62L^{LOW} e CD44^{HIGH}; e células T de memória central que expressam CD62L^{HIGH} e CD44^{HIGH} (DUTTON, BRADLEY e SWAIN, 1998; SALLUSTO, 2004). Essas moléculas também são altamente expressas em células ativadas e por isso, quando as células dos animais controle e imunizado são estimuladas com Con A, um ativador policlonal, há um aumento no número de células CD62L^{HIGH} e CD44^{HIGH} após 72 horas de incubação (Figura 21A), porém quando OVA foi adicionada às culturas, apenas o animal imunizado apresentou um aumento nessa população (Figura 21B). Quando adicionamos EGS às culturas em várias concentrações, as células CD62L^{HIGH} e CD44^{LOW} (*naïve*) são afetadas tanto nos animais controle como nos imunizados. Já as células CD62L^{HIGH} e CD44^{HIGH} são afetadas no animal controle e

proporcionalmente mais protegidas nos animais imunizados. As células CD62L^{LOW} e CD44^{HIGH} também foram protegidas da morte celular induzida pelo EGS em ambos os animais (Figura 21). Esse efeito foi observado de forma similar após 8 e 24 horas de incubação (dados não mostrados). Analisados em conjunto, esses dados comprovam que células *naïve* são suscetíveis à atividade apoptótica do EGS de *Ae. aegypti*, enquanto células de memória são resistentes.

Figura 16- Proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c controle (A) ou sensibilizados com picadas de mosquitos *Ae. aegypti* (B).

As células foram incubadas na presença ou ausência de várias concentrações de EGS e estimulados ou não por Con A. As linhas mostram que a inibição do EGS, mesmo na concentração mais alta (10 $\mu\text{g/mL}$), não foi maior do que a proliferação antígeno específica (* $p \leq 0,05$ versus grupo controle).

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 17- Proliferação de células de um camundongo BALB/c incubadas com meio somente ou sobrenadante de suspensões celulares de camundongos controle ou sensibilizados com picadas de mosquitos *Ae. aegypti*.

As células foram incubadas com meio somente, ConA ou ConA na presença de 10 µg/mL de EGS de *Ae. aegypti*. Figura representativa de 2 experimentos realizados nas mesmas condições. (* $p \leq 0,05$ versus grupo controle; # $p \leq 0,05$ versus grupo Con A).
FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 18- Proliferação de esplenócitos de camundongos BALB/c sensibilizados com picadas de mosquitos *An. aquasalis*.

As células foram incubadas com 5 µg/mL de EGS de *Aedes aegypti*, *An. aquasalis*, ambos ou meio somente e estimulados ou não por ConA. (* $p \leq 0,05$ versus grupo controle).

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 19- Proliferação das células do baço de camundongos controle (A) ou imunizados com OVA (B).

(A) Células do baço de camundongos BALB/c controle; (B) Células do baço de camundongos BALB/c que receberam transferência de células de camundongos DO11.10 e foram imunizados com OVA. As células foram incubadas na presença ou ausência de várias concentrações de EGS e estimulados ou não por ConA ou OVA. (* $p \leq 0,05$ versus "-").

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 20- Estratégia de análise das células *naïve* ou de memória.

(A) Exclusão das células mortas e debris celulares; (B) Seleção das células que passaram sozinhas pelo laser (*"singlets"*); (C) Seleção de células CD4⁺; (D) Análise das populações CD44 e CD62L.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

Figura 21- Análise das células *naïve* ou de memória de camundongos controle ou imunizados com OVA.

(A) Células do baço de camundongos BALB/c controle; (B) Células do baço de camundongos BALB/c que receberam transferência de células de camundongos DO11.10 e foram imunizados com OVA. As células foram incubadas com meio somente ou 10 µg/mL de EGS de *Aedes aegypti* e estimuladas ou não por ConA ou OVA. As células foram avaliadas pela expressão dos marcadores CD62L e CD44.

FONTE: BIZZARRO, 2012.

5 DISCUSSÃO

A hematofagia evoluiu de forma independente pelo menos seis vezes durante os períodos Cretáceo e Jurássico, em aproximadamente 15.000 espécies de 400 gêneros de artrópodes hematófagos, em um período estimado entre 145 e 65 milhões de anos atrás (MANS et al., 2004). A hematofagia está presente em diversas ordens de insetos que adquiriram recursos genéticos e morfofuncionais para sugar, digerir e utilizar o sangue de seus hospedeiros vertebrados (LEHANE, 1991). Ainda assim, pode ser dito que se alimentar de sangue é um hábito alimentar relativamente raro entre os insetos e restrito a algumas famílias apenas. Nesses milhões de anos de evolução, os mosquitos hematófagos desenvolveram um verdadeiro coquetel farmacológico em sua saliva, que claramente possui funções no sistema vascular e imune do hospedeiro, embora apenas uma fração desse conhecimento está disponível. O presente estudo teve como objetivo desvendar um pouco mais das funções imunomoduladoras da saliva de artrópodes hematófagos, através da avaliação dos efeitos de componentes salivares de fêmeas do mosquito vetor *Ae. aegypti* na diferenciação, maturação e função das células dendríticas e também na proliferação de linfócitos T.

Para nossa surpresa, os experimentos iniciais que realizamos revelaram que o EGS do *Ae. aegypti* não possui efeito na diferenciação (Figura 2) e maturação (Figura 4 e 5) das células dendríticas, nem na apresentação de antígenos para os linfócitos T (Figura 6A). Vale ressaltar que o EGS de *Ae. aegypti* também não apresentou efeitos na maturação de células dendríticas da linhagem de camundongo C57BL/6, indicando que a ausência de atividade observada não se deve à linhagem de camundongos empregada (dados não mostrados). A diferenciação de macrófagos a partir de precursores de medula óssea também não foi alterada pela presença de EGS nas culturas (dados não mostrados). Esses resultados contrastam enormemente com os dados descritos em outras espécies de artrópodes hematófagos. Há poucos anos, um trabalho pioneiro demonstrou que a saliva de *Rhipicephalus sanguineus*, o carrapato do cão, é capaz de inibir a diferenciação e a maturação de células dendríticas murinas (CAVASSANI et al., 2005). Posteriormente, foi demonstrado que a saliva dessa mesma espécie inibe a migração de células dendríticas induzida pelas quimiocinas MIP-1 α , MIP-1 β e RANTES (OLIVEIRA et al., 2008a). Nessa mesma linha, células dendríticas pulsadas com a saliva do carrapato *Ixodes ricinus* tornaram-se capazes de polarizar a resposta de células T para o padrão Th2 (MEJRI e BROSSARD, 2007). SÁ-

NUNES et al. (2007) foram os primeiros a isolar e caracterizar uma molécula moduladora de células dendríticas diretamente da saliva de um carrapato. Nesse trabalho, foi demonstrado que a prostaglandina E_2 (PGE_2) é o componente majoritário da saliva de *Ixodes scapularis*, o vetor da doença de Lyme, com atividade inibidora sobre a maturação de células dendríticas (SA-NUNES et al., 2007). Além disso, foi demonstrado recentemente que *R. sanguineus* também possui PGE_2 em sua saliva, mas em quantidades menores do que o *I. scapularis* e que a atividade moduladora de células dendríticas presente na saliva daquela espécie é complementada pela presença de adenosina (OLIVEIRA et al., 2011). Outros trabalhos demonstraram que componentes protéicos da saliva de carrapatos também são capazes de modular a função de células dendríticas, como a Salp15 (HOVIUS et al., 2008) e a Sialostatina L (SA-NUNES et al., 2009) ambas identificadas na saliva de *I. scapularis*. Porém, vale ressaltar que a quantidade necessária dessas moléculas para promover as atividades descritas é muito superior àquelas encontradas na saliva dessa espécie.

Apesar das evidências acima mostrarem um efeito inequívoco da saliva de carrapatos nas células dendríticas, muito pouco se sabe sobre a modulação dessas células pela saliva de insetos hematófagos. O primeiro trabalho a demonstrar que o EGS de *Lutzomyia longipalpis*, um dos vetores da leishmaniose no novo mundo, afeta a produção de citocinas e a atividade coestimuladora de células dendríticas, foi publicado somente em 2004 (COSTA et al., 2004). Alguns anos depois, foi demonstrado que o EGS de duas espécies de flebótomos do velho mundo (*Phlebotomus papatasi* e *Phlebotomus duboscqi*) induziram a produção de IL-10 e PGE_2 por células dendríticas (CARREGARO et al., 2008). Posteriormente, se descobriu que o efeito observado no EGS de *P. papatasi* foi devido à presença de adenosina e adenosina monofosfato (5' AMP) e esse parece ter sido, pelo menos em parte, o mecanismo pelo qual o EGS dessa espécie foi capaz de diminuir os sintomas da artrite em um modelo autoimune induzido pelo colágeno (CARREGARO et al., 2011). No caso específico de *Ae. aegypti*, nossos resultados demonstram que a modulação direta de células dendríticas pelos componentes salivares não parece ser uma das prioridades dessa espécie de mosquito.

Diferente do que foi apresentado na Figura 6A, a reposição de EGS de *Ae. aegypti* às culturas de células CD11c⁺ após lavagem, causou uma inibição significativa na proliferação antígeno específica (Figura 6B) e policlonal (Figura 6C)

dos linfócitos T CD4⁺. Isso mostra que o EGS age diretamente nos linfócitos T e não por intermédio das células apresentadoras de antígeno. Esses dados corroboram achados da literatura mostrando que o EGS do *Ae. aegypti* modula negativamente a função dos linfócitos (CROSS, CUPP e ENRIQUEZ, 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004). Exploramos também se o EGS de outras espécies de insetos (*An. aquasalis*, *P. duboscqi* e *P. papatasi*) apresentam esse mesmo efeito (Figura 13). Entretanto, nenhum outro EGS apresentou efeito sobre a proliferação de linfócitos T, demonstrando que essa atividade é única da saliva de *Ae. aegypti*. (Figura 13). Apesar de não termos avaliado em nossos ensaios o efeito do EGS do gênero *Culex*, que pertence à mesma subfamília de *Aedes*, um estudo anterior confirmou a ausência dessa atividade na saliva de *Culex quinquefasciatus*, o vetor da filariose e do vírus do Nilo Ocidental (WANASEN et al., 2004). Também conseguimos caracterizar parcialmente o potencial inibidor da proliferação de células T através de purificação por FPLC (Figura 14) e identificação por espectrometria de massa (Figura 15). Os fracionamentos cromatográficos realizados com o EGS indicam se tratar de um ou mais componentes com alta massa molecular (>400 kDa), corroborando um estudo anterior de WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004). Porém, conseguimos avançar nessa busca e analisar por espectrometria de massa os componentes presentes nas frações ativas da cromatografia (Anexos 1-4). Encontramos 13 proteínas presentes concomitantemente nas 3 frações de maior atividade (F1/F2/F3). Porém, sete dessas proteínas também estavam presentes em uma fração não relacionada que eluiu distante das demais (Figura 15A-G). Dos 6 candidatos restantes que foram detectados apenas em F1/F2/F3, três deles não apresentaram um perfil de abundância relativa semelhante àquele encontrado na cromatografia (Figura 15H-J). E dentre os três finalistas, um deles possui massa molecular alta, que embora não seja igual à encontrada na cromatografia, é o candidato mais provável para a atividade descrita (Figura 15N). Análises de bioinformática realizadas pelo Dr. José Marcos Ribeiro do NIAID/NIH, nosso colaborador nesse projeto, indicam que esse transcrito, inicialmente anotado no transcriptoma salivar de *Ae. aegypti* como uma proteína de 185,4 kDa, está na verdade truncado. Comparações com os transcriptomas de outras espécies de mosquitos indicam que essa proteína deve ser bem maior, o que confirmaria os dados de FPLC. Entretanto, ainda precisamos demonstrar esse fato. Vale ressaltar que outros tipos de cromatografia foram

empregadas para tentar isolar melhor o mediador responsável por esse efeito biológico (troca iônica, fase reversa), porém a atividade sempre se perdia após esses procedimentos (dados não mostrados). Em nosso projeto de doutorado, trabalharemos com a sequência em questão de forma a confirmar se é mesmo este o modulador de células T encontrado na saliva de *Ae. aegypti*.

Exploramos também os mecanismos de ação pelos quais o EGS de *Ae. aegypti* inibe a proliferação de células T. Nossos resultados mostram que essa inibição ocorre porque o EGS induz apoptose nessas células (Figura 12). Essa parece ser uma atividade específica sobre as células T, uma vez que a diferenciação, maturação e função das células dendríticas não foram afetadas, mesmo quando essas células foram incubadas com 40 µg/mL de EGS, uma concentração 4 vezes maior do que aquela onde foi observada a atividade máxima de inibição da proliferação na maioria de nossos experimentos. Como já relatado anteriormente, trabalhos publicados em 2004 mostram uma diminuição na proliferação celular induzida pela saliva do *Ae. aegypti* que é explicada pela diminuição da viabilidade celular, avaliada por citometria de fluxo pela presença de células expressando PI (iodeto de propídio) (WASSERMAN, SINGH e CHAMPAGNE, 2004) ou 7-AAD (7-amino actinomycin) (WANASEN et al., 2004) ambos marcadores de DNA. É importante ressaltar que esses marcadores não são característicos de morte celular por apoptose. Em nossos resultados, observamos que o EGS de *Ae. aegypti* induz apoptose nos linfócitos T CD4⁺ (Figura 11) e T CD8⁺ (dados não mostrados), avaliada pela exposição de fosfatidilserina (marcada com anexina V) na superfície dessas células.

Como as células T de memória são conhecidamente mais resistentes à apoptose por expressarem mais proteínas anti-apoptóticas (WOJCIECHOWSKI et al., 2007), investigamos se o EGS de *Ae. aegypti* teria efeito também sobre essas células e para isso, realizamos diferentes estratégias para gerá-las *in vivo*. Inicialmente, sensibilizamos camundongos com picadas do próprio mosquito *Ae. aegypti* e avaliamos o efeito da resposta proliferativa das células de baço desses animais. Ao contrário do observado em células de animais controle, aquelas provenientes de animais sensibilizados proliferam na presença de EGS (Figura 16). Adicionalmente, nas células estimuladas por Con A, a inibição observada foi apenas parcial, sugerindo que as células de memória presentes na cultura continuam a proliferar mesmo na presença do fator inibidor do EGS. Também confirmamos que a

possível produção de anticorpos neutralizantes pelos linfócitos B presentes na cultura não explica a inibição parcial observada, uma vez que o sobrenadante de culturas de 3 dias contendo essas células não bloqueou o efeito do EGS sobre linfócitos T *naïve* (Figura 17). Também demonstramos que o efeito do EGS não ocorre quando células de memória foram desenvolvidas contra outros antígenos. Por exemplo, quando células do baço de camundongos sensibilizados com *An. aquasalis* são estimuladas com EGS do próprio mosquito, o efeito supressor do EGS de *Ae. aegypti* não ocorre. E quando essas células são estimuladas com Con A, a inibição é parcial apenas, indicando mais uma vez que somente as células *naïve* são afetadas pela presença do EGS na cultura (Figura 18).

Essa hipótese foi reforçada pela análise da proliferação das células do baço de camundongos que receberam células de um doador DO11.10 e foram posteriormente imunizados com OVA. Quando essas células foram estimuladas com Con A, a proliferação foi apenas parcialmente inibida (Figura 19B), enquanto nos animais controle a mesma concentração de EGS inibiu totalmente a proliferação (Figura 19A). Já a proliferação antígeno específica induzida por OVA não ocorreu em animais controle, como esperado (Figura 19A), e nos animais imunizados a proliferação observada foi apenas discretamente inibida com a concentração mais alta utilizada (10 µg/mL) (Figura 19B). O EGS também afetou as células CD62L^{HIGH} e CD44^{LOW} (características de células *naïve*) em animais controle e imunizado (Figura 21), enquanto as células CD62L^{HIGH} e CD44^{HIGH} (memória central) e células CD62L^{LOW} e CD44^{HIGH} (memória efetora) foram mais resistentes nos animais imunizados com OVA, corroborando com os resultados mostrados anteriormente. (Figura 21B). O único trabalho da literatura que mostra seletividade de ação de um componente salivar em subpopulações de células T foi demonstrado com a proteína Salp15 do carrapato *Ixodes scapularis* que se liga aos co-receptores CD4, mas não CD8 de células T (GARG et al, 2006). Entretanto em um trabalho subsequente foi demonstrado que Salp15 também é capaz de ligar o receptor DC-SIGN presentes em células dendríticas e modular sua função, evidenciando que há outros ligantes para essa molécula *in vivo* (HOVIUS et al, 2008). Em nosso conhecimento esse é o primeiro trabalho a demonstrar que a saliva de um artrópode hematófago afeta diferencialmente subpopulações de células T *naïve* e de memória. Novos experimentos serão necessários para confirmar essa especificidade, assim como a identidade desse mediador.

Assim os resultados gerados por este trabalho auxiliam no esclarecimento dos mecanismos utilizados pelo mosquito *Ae. aegypti* para escapar do sistema imunológico de seus hospedeiros e se alimentar satisfatoriamente.

CONCLUSÕES

- ✓ O EGS de fêmeas de *Ae. aegypti* não altera a diferenciação, a maturação e a função das células dendríticas murinas;
- ✓ A proliferação de células T é afetada diretamente pelo EGS de *Ae. aegypti*, que induz apoptose nas subpopulações de células T CD4⁺ e CD8⁺.
- ✓ A proteína (AAEL003655-PA) presente no EGS de *Ae. aegypti* é o candidato mais provável responsável pela inibição da proliferação de linfócitos T.
- ✓ Subpopulações de células T *naïve* e de memória são afetadas diferencialmente pelo EGS de *Ae. aegypti*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- AHMED, S. A.; GOGAL, R. M., JR.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. **J. Immunol. Methods.** v.170, p.211-24,1994.
- ARNAOUT, M. A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood.** v.75, p.1037-50,1990.
- BANCHEREAU, J., et al. Immunobiology of dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** v.18, p.767-811,2000.
- BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu. Rev. Entomol.** v.52, p.209-29,2007.
- BELKAID, Y., et al. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. **J. Exp. Med.** v.188, p.1941-53,1998.
- BIZZARRO, B. Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T. 2012. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BLACK, W. C. T., et al. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. **Arch. Med. Res.** v.33, p.379-88,2002.
- 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. **J. Biol. Chem.** v.282, p.26928-38,2007.
- CARREGARO, V., et al. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE₂/IL-10 sequential pathway. **J. Leukoc. Biol.** v.84, p.104-14,2008.
- CAVASSANI, K. A., et al. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. **Immunology.** v.114, p.235-45,2005.
- CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.91, p.138-42,1994.
- CHAMPAGNE, D. E., et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.92, p.694-8,1995.

¹ De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

CORBI, A. L., et al. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit. Cloning, primary structure, and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. **J. Biol. Chem.** v.263, p.12403-11,1988.

CORBI, A. L., et al. cDNA cloning and complete primary structure of the alpha subunit of a leukocyte adhesion glycoprotein, p150,95. **EMBO. J.** v.6, p.4023-8,1987.

COSTA, D. J., et al. Lutzomyia longipalpis salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. **Infect. Immun.** v.72, p.1298-305,2004.

CROSS, M. L.; CUPP, E. W.; ENRIQUEZ, F. J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of Aedes aegypti. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.51, p.690-6,1994.

DE MOURA, T. R., et al. Enhanced Leishmania braziliensis Infection Following Pre-Exposure to Sandfly Saliva. **PLoS. Negl. Trop. Dis.** v.1, p.e84,2007.

DEMEURE, C. E., et al. Anopheles mosquito bites activate cutaneous mast cells leading to a local inflammatory response and lymph node hyperplasia. **J. Immunol.** v.174, p.3932-40,2005.

DONOVAN, M. J., et al. Uninfected mosquito bites confer protection against infection with malaria parasites. **Infect. Immun.** v.75, p.2523-30,2007.

DUTTON, R. W.; BRADLEY, L. M.; SWAIN, S. L. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.** v.16, p.201-23,1998.

EDWARDS, J. F.; HIGGS, S.; BEATY, B. J. Mosquito feeding-induced enhancement of Cache Valley Virus (Bunyaviridae) infection in mice. **J. Med. Entomol.** v.35, p.261-5,1998.

GARG, R., et al. Cutting edge: CD4 is the receptor for the tick saliva immunosuppressor Sap15. **J. Immunol.** v.177, p.6579-83, 2006.

GOMES, R., et al. Immunity to a salivary protein of a sand fly vector protects against the fatal outcome of visceral leishmaniasis in a hamster model. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.105, p.7845-50,2008.

GRAYSON, J. M., et al. Cutting edge: increased expression of Bcl-2 in antigen-specific memory CD8+ T cells. **J. Immunol.** v.164, p.3950-4,2000.

GUBLER, D. J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In: GUBLER, D. J.; KUNO, G. (Ed.). Dengue and dengue hemorrhagic fever: London: CAB International. 1997 p.1-22

GUBLER, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. **Trends Microbiol.** v.10, p.100-3,2002a.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med. Res.** v.33, p.330-42,2002b.

GUZMAN, A.; ISTURIZ, R. E. Update on the global spread of dengue. **Int. J. Antimicrob. Agents.** v.36 Suppl 1, p.S40-2,2010.

HECHT, O. Über die Sprossspitze der Oesophagusastolpungen und über die Giftigverkung der Speicheldrüsen von Stechmücken. **Arch. Schiffs. Trop. Hyg.** v.32, p.561-575,1928.

HOVIUS, J. W., et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. **PLoS Pathog.** v.4, p.e31,2008.

HUDSON, A.; BOWMAN, L.; ORR, C. W. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. **Science.** v.131, p.1730-1,1960.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. **Annu. Rev. Immunol.** v.25, p.381-418,2007.

KAMHAWI, S., et al. Protection against cutaneous leishmaniasis resulting from bites of uninfected sand flies. **Science.** v.290, p.1351-4,2000.

LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. **Curr. Opin. Immunol.** v.17, p.326-32, 2005.

LIGON, B. L. Reemergence of an unusual disease: the chikungunya epidemic. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.** v.17, p.99-104,2006.

LIMESAND, K. H., et al. Potentiation of vesicular stomatitis New Jersey virus infection in mice by mosquito saliva. **Parasite Immunol.** v.22, p.461-7,2000.

LUO, B. H.; CARMAN, C. V.; SPRINGER, T. A. Structural basis of integrin regulation and signaling. **Annu Rev. Immunol.** v.25, p.619-47,2007.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nat. Med.** v.10, p.S98-109,2004.

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

MEJRI, N.; BROSSARD, M. Splenic dendritic cells pulsed with Ixodes ricinus tick saliva prime naive CD4⁺T to induce Th2 cell differentiation in vitro and in vivo. **Int. Immunol.** v.19, p.535-43,2007.

NENE, V., et al. Genome sequence of Aedes aegypti, a major arbovirus vector. **Science.** v.316, p.1718-23,2007.

NOGUEIRA, R. M.; DE ARAUJO, J. M.; SCHATZMAYR, H. G. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. **Rev. Panam. Salud. Publica.** v.22, p.358-63,2007.

OLIVEIRA, C. J., et al. Tick saliva inhibits the chemotactic function of MIP-1 α and selectively impairs chemotaxis of immature dendritic cells by down-regulating cell-surface CCR5. **Int J Parasitol.** v.38, p.705-16,2008a.

OLIVEIRA, C. J., et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. **J. Biol. Chem.** 2011.

OLIVEIRA, F., et al. Immunity to Distinct Sand Fly Salivary Proteins Primes the Anti-Leishmania Immune Response towards Protection or Exacerbation of Disease. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v.2, p.e226,2008b.

REY, L. **Bases da parasitologia médica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1992.349 p.

RIBEIRO, J. M. 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. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med. Vet. Entomol.** v.14, p.142-8,2000.

RIBEIRO, J. M., et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol. B.** v.79, p.81-6,1984.

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Ann. Rev. immunol.** v.22, p.745-63, 2004.

SA-NUNES, A., et al. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. **J. Immunol.** v.182, p.7422-9,2009.

SA-NUNES, A., et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. **J. Immunol.** v.179, p.1497-505,2007.

SAN MARTIN, J. L., et al. The epidemiology of dengue in the americas over the last three decades: a worrisome reality. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v.82, p.128-35,2010.

SKALLOVA, A., et al. Tick saliva inhibits dendritic cell migration, maturation, and function while promoting development of Th2 responses. **J. Immunol.** v.180, p.6186-92,2008.

SPRENT, J.; SURH, C. D. T cell memory. **Annu. Rev. Immunol.** v.20, p.551-79,2002.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.** v.81, p.321-31,1995.

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*. **J. Biol. Chem.** v.273, p.20802-9,1998.

STEINMAN, R. M.; ADAMS, J. C.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. **J. Exp. Med.** v.141, p.804-20,1975.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.** v.137, p.1142-62,1973.

STEINMAN, R. M.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. **J. Exp. Med.** v.139, p.380-97,1974.

STEINMAN, R. M., et al. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. V. Purification of spleen dendritic cells, new surface markers, and maintenance in vitro. **J. Exp. Med.** v.149, p.1-16,1979.

STEINMAN, R. M.; LUSTIG, D. S.; COHN, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. **J. Exp. Med.** v.139, p.1431-45,1974.

STEINMAN, R. M.; WITMER, M. D. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** v.75, p.5132-6,1978.

SUTHERLAND, G. B.; EWEN, A. B. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **J. Insect. Physiol.** v.20, p.655-60,1974.

TITUS, R. G.; RIBEIRO, J. M. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. **Science.** v.239, p.1306-8,1988.

TOMORI, O. Yellow fever: the recurring plague. **Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.** v.41, p.391-427,2004.

VEIS, D. J., et al. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. **Cell.** v.75, p.229-40,1993.

WANASEN, N., et al. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Med. Vet. Entomol.** v.18, p.191-9,2004.

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

WEST, A. P.; KOBLANSKY, A. A.; GHOSH, S. Recognition and signaling by toll-like receptors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** v.22, p.409-37,2006.

WHEAT, W. H., et al. Lutzomyia longipalpis salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **J. Immunol.** v.180, p.8286-98,2008.

WINZLER, C., et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. **J. Exp. Med.** v.185, p.317-28,1997.

WOJCIECHOWSKI, S., et al. Bim/Bcl-2 balance is critical for maintaining naïve and memory T cell homeostasis. **J. Exp. Med.** v.204, p.1665-75,2007.

YANAGIHARA, S., et al. EBI1/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. **J. Immunol.** v.161, p.3096-102,1998.

Anexo A.1 – Relatório da análise da fração F1 por espectrometria de massa.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area	Description
AAEL000749-PA	57,93	357	17	290	33,4	6,10	1822,41	6,481E9	description supercont1.15:2852946:2853941:1 gene:AAEL000749
AAEL000726-PA	33,33	181	12	291	33,6	6,42	816,40	4,202E9	description supercont1.15:2838199:2839199:1 gene:AAEL000726
AAEL003655-PA	26,21	56	35	1629	185,4	6,27	238,53	7,893E7	description supercont1.94:2210612:2215851:-1 gene:AAEL003655
AAEL009955-PA	20,42	71	54	3321	367,2	7,50	320,86	5,023E7	description supercont1.441:666495:677733:1 gene:AAEL009955
AAEL003694-PA	23,52	22	18	846	97,9	5,12	104,37	4,082E7	description supercont1.94:2220548:2223088:-1 gene:AAEL003694
AAEL002761-PG	45,39	15	12	271	31,0	4,74	70,52	3,151E7	description supercont1.67:2634261:2717763:-1 gene:AAEL002761
AAEL002759-PA	40,85	22	9	284	32,4	4,89	83,52	3,053E7	description supercont1.67:2549249:2550872:1 gene:AAEL002759
AAEL009992-PA	19,61	76	57	3340	379,8	7,88	338,43	2,329E7	description supercont1.445:483273:501887:1 gene:AAEL009992
AAEL000748-PA	18,79	9	8	580	66,2	0,15	01,83	1,699E7	description supercont1.15:1338057:1339799:1 gene:AAEL000748
AAEL009993-PA	18,97	54	48	3364	379,7	8,02	263,20	1,867E7	description supercont1.445:462217:472311:-1 gene:AAEL009993
AAEL000732-PA	24,30	14	11	568	64,6	6,39	65,36	1,783E7	description supercont1.15:1357702:1359408:1 gene:AAEL000732
AAEL007306-PA	22,32	17	15	896	103,6	5,60	85,81	9,723E6	description supercont1.247:341872:381397:-1 gene:AAEL007306
AAEL003600-PA	16,35	5	5	312	35,8	6,42	29,28	8,865E6	description supercont1.92:2370127:2371065:1 gene:AAEL003600
AAEL006424-PA	20,87	5	5	321	36,9	7,78	23,14	8,819E6	description supercont1.204:345910:347111:-1 gene:ALL2_AEDAE
AAEL005656-PA	11,08	20	16	1940	221,3	5,99	121,40	8,628E6	description supercont1.168:1186737:1238994:-1 gene:AAEL005656
AAEL005672-PA	13,36	10	6	524	59,8	6,86	44,77	8,445E6	description supercont1.169:649555:651184:-1 gene:AAEL005672
AAEL002956-PA	13,92	6	5	467	51,6	8,82	23,62	7,985E6	description supercont1.73:53696:90638:-1 gene:CISY1_AEDAE
AAEL006347-PA	18,15	11	9	562	62,7	8,16	43,65	7,496E6	description supercont1.201:1129123:1131245:-1 gene:APY_AEDAE
AAEL003601-PA	17,72	5	5	316	36,2	5,31	19,63	7,212E6	description supercont1.92:2373093:2374043:1 gene:AAEL003601
AAEL013559-PA	3,60	12	12	4560	516,5	6,30	58,97	4,602E6	description supercont1.869:90787:109948:1 gene:AAEL013559
AAEL002827-PA	21,63	8	7	504	53,9	5,12	35,72	4,514E6	description supercont1.69:133469:149465:-1 gene:AAEL002827
AAEL000517-PA	31,07	5	3	103	11,4	11,36	19,09	4,340E6	description supercont1.9:3658697:3659008:1 gene:AAEL000517
AAEL003182-PA	25,36	8	8	418	47,0	5,57	36,17	4,150E6	Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue - unlikely to be inhibitory supercont1.81:289404:290790:-1 gene:SRPN26
AAEL002565-PA	1,44	8	8	7100	796,6	6,48	42,15	3,918E6	description supercont1.60:1501342:1524042:-1 gene:AAEL002565
AAEL010235-PA	17,22	7	5	273	29,1	4,27	35,77	3,898E6	description supercont1.464:161472:162363:1 gene:ALL3_AEDAE
AAEL006417-PA	22,29	8	7	332	38,6	9,23	26,92	3,464E6	description supercont1.204:322860:324089:1 gene:AAEL006417
AAEL004616-PA	7,45	3	3	376	41,7	5,48	17,00	2,662E6	description supercont1.125:2451488:2452676:-1 gene:AAEL004616
AAEL004461-PA	13,53	4	4	340	37,8	5,20	14,58	2,431E6	description supercont1.120:834917:842888:-1 gene:AAEL004461
AAEL004452-PA	7,77	2	2	489	54,9	8,76	8,75	2,018E6	description supercont1.120:844657:851292:-1 gene:AAEL004452
AAEL016984-PB	6,63	3	2	332	35,4	8,18	12,27	1,957E6	description supercont1.157:405434:406432:1 gene:AAEL016984
AAEL015065-PA	4,52	0	8	2414	277,8	5,25	38,60	1,822E6	description supercont1.1440:5050:25836:-1 gene:AAEL015065
AAEL012910-PA	1,19	4	4	5644	604,7	4,81	12,30	1,620E6	description supercont1.757:179607:198864:1 gene:AAEL012910
AAEL008166-PA	16,23	4	4	419	44,2	9,00	19,14	1,479E6	description supercont1.304:1072918:1089871:-1 gene:AAEL008166
AAEL003107-PA	4,97	2	2	342	38,6	5,41	5,96	1,385E6	description supercont1.77:425430:431539:1 gene:AAEL003107
AAEL012905-PA	2,14	3	3	5429	581,6	5,38	8,87	9,197E5	description supercont1.757:207131:233617:1 gene:AAEL012905
AAEL003671-PA	2,53	2	2	1344	142,9	4,44	7,61	8,395E5	description supercont1.94:793807:824900:1 gene:AAEL003671
AAEL009185-PA	7,04	2	2	355	39,8	6,40	8,88	6,502E5	description supercont1.377:1030526:1046490:1 gene:AAEL009185
AAEL017096-PA	9,07	2	2	483	50,4	9,09	6,75	6,145E5	description supercont1.32:3146741:3148132:1 gene:AAEL017096
AAEL011741-PA	14,29	2	2	203	23,2	5,20	8,35	3,038E5	glutathione transferase supercont1.607:107190:117128:-1 gene:GSTS1
AAEL002558-PA	2,71	2	2	924	104,5	7,06	8,32	1,774E5	description supercont1.60:1546178:1583899:-1 gene:AAEL002558

Anexo A.2 – Relatório da análise da fração F2 por espectrometria de massa.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area	Description
AAEL000749-PA	52,41	273	16	290	33,4	6,10	1321,23	5,721E9	description supercont1.15:2852946:2853941:1 gene:AAEL000749
AAEL000726-PA	31,27	114	10	291	33,6	6,42	464,96	2,106E9	description supercont1.15:2838199:2839199:1 gene:AAEL000726
AAEL002759-PD	61,27	43	18	284	32,4	4,86	205,86	2,015E8	description supercont1.67:2539222:2550872:-1 gene:AAEL002759
AAEL002761-PG	60,89	24	18	271	31,0	4,74	132,59	1,775E8	description supercont1.67:2634261:2717763:-1 gene:AAEL002761
AAEL003655-PA	23,33	50	35	1629	185,4	6,27	193,37	1,709E8	description supercont1.94:2210612:2215851:-1 gene:AAEL003655
AAEL003694-PA	25,65	29	19	846	97,9	5,12	117,02	7,764E7	description supercont1.94:2220548:2223088:-1 gene:AAEL003694
AAEL009992-PA	21,11	76	63	3340	379,8	7,88	350,86	4,225E7	description supercont1.445:483273:501887:1 gene:AAEL009992
AAEL009955-PA	16,53	64	45	3321	367,2	7,50	284,81	3,298E7	description supercont1.441:666495:677733:1 gene:AAEL009955
AAEL000748-PA	22,76	12	10	580	66,2	6,15	65,02	3,130E7	description supercont1.15:1338057:1339799:1 gene:AAEL000748
AAEL000732-PA	28,87	16	13	568	64,6	6,39	74,40	2,873E7	description supercont1.15:1357702:1359408:1 gene:AAEL000732
AAEL009993-PA	14,86	53	44	3364	379,7	8,02	212,16	2,493E7	description supercont1.445:462217:472311:-1 gene:AAEL009993
AAEL007306-PA	26,57	29	23	896	103,6	5,60	129,03	2,269E7	description supercont1.247:341872:381397:-1 gene:AAEL007306
AAEL003601-PA	16,35	6	5	316	36,2	5,31	28,78	1,971E7	description supercont1.92:2373093:2374043:1 gene:AAEL003601
AAEL003600-PA	26,92	8	8	312	35,8	6,42	31,01	1,324E7	description supercont1.92:2370127:2371065:1 gene:AAEL003600
AAEL006347-PA	12,46	9	6	562	62,7	8,16	40,77	7,197E6	description supercont1.201:1129123:1131245:-1 gene:APY_AEDAE
AAEL005672-PA	10,11	6	5	524	59,8	6,86	36,11	6,409E6	description supercont1.169:649555:651184:-1 gene:AAEL005672
AAEL005656-PA	7,42	15	13	1940	221,3	5,99	85,00	6,264E6	description supercont1.168:1186737:1238994:-1 gene:AAEL005656
AAEL004461-PA	25,00	7	7	340	37,8	5,20	32,34	6,153E6	description supercont1.120:834917:842888:-1 gene:AAEL004461
AAEL003182-PA	20,57	8	6	418	47,0	5,57	35,70	4,193E6	Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue - unlikely to be inhibitory supercont1.81:289404:290790:-1 gene:SRPN26
AAEL010235-PA	13,55	4	4	273	29,1	4,27	20,03	4,155E6	description supercont1.464:161472:162363:1 gene:ALL3_AEDAE
AAEL000517-PA	31,07	3	3	103	11,4	11,36	11,55	3,435E6	description supercont1.9:3658697:3659008:1 gene:AAEL000517
AAEL013559-PA	1,80	7	7	4560	516,5	6,30	35,19	3,243E6	description supercont1.869:90787:109948:1 gene:AAEL013559
AAEL004452-PA	6,13	2	2	489	54,9	8,76	19,76	2,868E6	description supercont1.120:844657:851292:-1 gene:AAEL004452
AAEL006417-PA	15,36	4	4	332	38,6	9,23	19,31	2,777E6	description supercont1.204:322860:324089:1 gene:AAEL006417
AAEL002827-PA	13,89	5	4	504	53,9	5,12	23,33	2,753E6	description supercont1.69:133469:149465:-1 gene:AAEL002827
AAEL006424-PA	17,76	3	3	321	36,9	7,78	17,24	2,602E6	description supercont1.204:345910:347111:-1 gene:ALL2_AEDAE
AAEL015065-PA	3,81	8	8	2414	277,8	5,25	32,63	2,141E6	description supercont1.1440:5959:25836:-1 gene:AAEL015065
AAEL002558-PA	4,00	3	3	924	104,5	7,06	16,13	2,120E6	description supercont1.60:1546178:1583899:-1 gene:AAEL002558
AAEL007226-PA	2,70	2	2	1298	143,3	4,77	8,52	1,932E6	description supercont1.244:1541056:1554845:-1 gene:AAEL007226
AAEL012910-PA	2,20	12	7	5644	604,7	4,81	29,04	1,585E6	description supercont1.757:179607:198864:1 gene:AAEL012910
AAEL002565-PA	0,58	4	4	7100	796,6	6,48	19,22	1,416E6	description supercont1.60:1501342:1524042:-1 gene:AAEL002565
AAEL001673-PA	7,45	3	2	376	41,7	5,39	20,53	1,384E6	description supercont1.39:1692453:1695841:-1 gene:AAEL001673
AAEL008166-PA	8,35	4	3	419	44,2	9,00	13,28	1,289E6	description supercont1.304:1072918:1089871:-1 gene:AAEL008166
AAEL006333-PA	5,77	2	2	572	63,2	8,38	9,18	1,274E6	description supercont1.201:221091:222943:1 gene:AAEL006333
AAEL009847-PA	0,74	3	3	4478	490,6	5,05	9,09	1,052E6	description supercont1.432:618856:654162:-1 gene:AAEL009847
AAEL007385-PA	10,58	2	2	208	23,6	5,97	11,33	1,017E6	description supercont1.252:573121:581576:1 gene:FRI_AEDAE
AAEL011604-PA	1,62	4	4	3652	404,7	5,17	18,48	9,402E5	description supercont1.593:353354:468862:1 gene:AAEL011604
AAEL006096-PA	5,66	2	2	389	43,0	9,04	7,70	7,412E5	description supercont1.189:2000883:2002111:1 gene:AAEL006096
AAEL002158-PA	10,65	2	2	216	24,2	6,01	8,45	7,219E5	description supercont1.50:332841:334065:1 gene:AAEL002158
AAEL005845-PA	0,87	2	2	2299	266,0	5,33	8,09	7,004E5	description supercont1.177:1669285:1694081:-1 gene:AAEL005845
AAEL000641-PA	6,48	2	2	494	55,9	5,02	8,10	5,957E5	description supercont1.13:668270:683719:-1 gene:AAEL000641

Anexo A.3 – Relatório da análise da fração F3 por espectrometria de massa.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area	Description
AAEL000749-PA	43,79	69	12	290	33,4	6,10	502,29	7,514E8	description supercont1.15:2852946:2853941:1 gene:AAEL000749
AAEL000726-PA	26,46	23	7	291	33,6	6,42	204,62	4,438E8	description supercont1.15:2838199:2839199:1 gene:AAEL000726
AAEL002759-PA	48,94	20	14	284	32,4	4,89	116,00	2,032E8	description supercont1.67:2549249:2550872:-1 gene:AAEL002759
AAEL002761-PG	52,03	14	12	271	31,0	4,74	103,08	1,071E8	description supercont1.67:2634261:2717763:-1 gene:AAEL002761
AAEL003655-PA	9,88	15	13	1629	185,4	6,27	94,31	3,082E7	description supercont1.94:2210612:2215851:-1 gene:AAEL003655
AAEL003601-PA	10,44	3	3	316	36,2	5,31	17,40	2,072E7	description supercont1.92:2373093:2374043:1 gene:AAEL003601
AAEL009993-PA	5,23	14	13	3364	379,7	8,02	98,20	1,267E7	description supercont1.445:462217:472311:-1 gene:AAEL009993
AAEL009992-PA	6,17	18	16	3340	379,8	7,88	93,82	1,166E7	description supercont1.445:483273:501887:1 gene:AAEL009992
AAEL000748-PA	12,41	7	5	580	66,2	6,15	47,09	1,106E7	description supercont1.15:1338057:1339799:1 gene:AAEL000748
AAEL003694-PA	2,84	2	2	846	97,9	5,12	38,18	9,606E6	description supercont1.94:2220548:2223088:-1 gene:AAEL003694
AAEL014367-PA	2,09	4	2	2055	221,7	4,48	20,00	6,460E6	description supercont1.1090:61531:69082:1 gene:AAEL014367
AAEL005672-PA	8,97	6	4	524	59,8	6,86	46,78	6,152E6	description supercont1.169:649555:651184:-1 gene:AAEL005672
AAEL000732-PA	10,21	4	4	568	64,6	6,39	32,31	5,903E6	description supercont1.15:1357702:1359408:1 gene:AAEL000732
AAEL008340-PA	2,96	3	2	1182	132,7	5,25	20,83	5,705E6	description supercont1.318:1088837:1117829:1 gene:AAEL008340
AAEL002834-PA	4,85	2	2	557	61,1	6,43	13,21	4,377E6	description supercont1.69:294091:332856:1 gene:AAEL002834
AAEL009955-PA	1,57	4	4	3321	367,2	7,50	17,89	2,957E6	description supercont1.441:666495:677733:1 gene:AAEL009955
AAEL001091-PA	5,21	2	2	652	72,0	7,52	7,30	1,412E6	description supercont1.22:3631020:3633167:1 gene:AAEL001091

Anexo A.4 – Relatório da análise da fração F4 por espectrometria de massa.

Accession	Coverage	# PSMs	# Peptides	# AAs	MW [kDa]	calc. pI	Score	Area	Description
AAEL006424-PA	77,88	485	37	321	36,9	7,78	2558,04	3,125E10description supercont1.204:345910:347111:-1 gene:ALL2_AEDAE	
AAEL006417-PA	65,36	232	34	332	38,6	9,23	1808,48	2,663E10description supercont1.204:322860:324089:1 gene:AAEL006417	
AAEL003601-PA	46,20	80	15	316	36,2	5,31	284,89	5,144E9description supercont1.92:2373093:2374043:1 gene:AAEL003601	
AAEL003600-PA	71,15	53	23	312	35,8	6,42	273,90	4,994E9description supercont1.92:2370127:2371065:1 gene:AAEL003600	
AAEL002704-PB	35,25	41	14	417	47,8	6,70	210,87	3,586E9Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue - unlikely to be inhibitory supercont1.65:1197986:1199365:-1 gene:SRPN23	
AAEL000533-PA	53,90	43	11	154	17,7	5,81	116,37	2,447E9C-Type Lectin (CTL) supercont1.10:2735183:2735704:1 gene:CTL16	
AAEL010235-PA	28,57	21	12	273	29,1	4,27	97,37	1,096E9description supercont1.464:161472:162363:1 gene:ALL3_AEDAE	
AAEL010228-PA	36,74	17	12	215	23,6	4,72	83,65	7,040E8description supercont1.464:160395:161109:-1 gene:AAEL010228	
AAEL006096-PA	56,30	29	19	389	43,0	9,04	134,67	5,312E8description supercont1.189:2000883:2002111:1 gene:AAEL006096	
AAEL015450-PA	64,23	7	6	137	14,4	7,24	32,48	4,508E8description supercont1.2327:5745:6275:1 gene:AAEL015450	
AAEL003182-PA	28,47	13	11	418	47,0	5,57	70,44	2,951E8Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue - unlikely to be inhibitory supercont1.81:289404:290790:-1 gene:SRPN26	
AAEL006347-PA	21,89	19	13	562	62,7	8,16	88,12	2,741E8description supercont1.201:1129123:1131245:-1 gene:APY_AEDAE	
AAEL000200-PA	33,04	2	2	112	12,3	6,34	11,56	2,609E8description supercont1.3:4498680:4499150:-1 gene:AAEL000200	
AAEL000274-PA	60,13	12	6	153	15,4	6,24	57,07	2,116E8description supercont1.5:1342653:1363914:1 gene:CUSOD3	
AAEL003835-PA	23,75	4	3	160	17,6	5,57	23,69	2,007E8description supercont1.98:1736237:1744846:-1 gene:AAEL003835	
AAEL006406-PA	37,93	7	6	145	16,4	6,00	37,78	1,926E8description supercont1.204:283186:286136:1 gene:AAEL006406	
AAEL004088-PC	29,97	10	6	317	35,5	6,19	49,25	1,537E8description supercont1.107:2167816:2173698:1 gene:AAEL004088	
AAEL003057-PB	35,25	7	7	261	29,6	9,38	39,58	1,458E8description supercont1.76:1255699:1256752:-1 gene:AAEL003057	
AAEL011741-PA	38,42	7	7	203	23,2	5,20	43,23	1,241E8glutathione transferase supercont1.607:107190:117128:-1 gene:GSTS1	
AAFI 007420-PB	16,18	7	6	414	47,4	9,25	46,84	1,129F8Serine Protease Inhibitor (serpin) homologue - unlikely to be inhibitory supercont1.255:1148690:1150060:1 gene:SRPN25	
AAFI 000793-PA	23,53	5	4	255	28,9	8,88	28,14	1,094F8description supercont1.16:3232231:3233119:-1 gene:AAFI 000793	
AAEL000749-PA	21,72	7	5	290	33,4	6,10	119,23	9,968E7description supercont1.15:2852946:2853941:1 gene:AAEL000749	
AAFI 000726-PA	17,53	5	3	291	33,6	6,42	29,73	9,935F7description supercont1.15:2838199:2839199:1 gene:AAFI 000726	
AAEL006576-PB	19,27	7	6	327	36,1	5,95	27,61	9,202E7description supercont1.211:701942:703047:-1 gene:AAEL006576	
AAEL000732-PA	4,93	3	2	568	64,6	6,39	29,44	8,961E7description supercont1.15:1357702:1359408:1 gene:AAEL000732	
AAEL002833-PA	19,76	4	4	339	38,0	6,10	16,38	7,803E7description supercont1.69:336765:369776:-1 gene:AAEL002833	
AAEL013005-PA	13,73	3	2	204	23,3	4,84	23,25	7,532E7description supercont1.774:396708:397320:1 gene:AAEL013005	
AAEL012175-PA	5,26	2	2	551	59,4	8,94	9,14	6,946E7description supercont1.662:87647:99145:-1 gene:AAEL012175	
AAEL011741-PB	19,21	5	3	203	23,2	5,17	23,40	6,510E7glutathione transferase supercont1.607:101818:117128:-1 gene:GSTS1	
AAEL000611-PA	14,17	7	6	494	55,9	5,02	40,23	6,406E7description supercont1.13:668270:683719:-1 gene:AAEL000611	
AAEL004081-PA	23,66	4	4	186	19,8	7,30	14,39	5,934E7description supercont1.106:2454080:2455267:-1 gene:AAEL004081	
AAEL009993-PA	2,26	8	7	3364	379,7	8,02	54,27	5,672E7description supercont1.445:462217:472311:-1 gene:AAEL009993	
AAEL006108-PA	47,47	8	8	158	18,1	8,41	35,36	5,543E7description supercont1.204:271631:272186:1 gene:AAEL006108	
AAEL008166-PA	23,15	9	7	419	44,2	9,00	43,39	5,255E7description supercont1.304:1072918:1089871:1 gene:AAEL008166	
AAEL002764-PA	2,85	2	2	491	51,9	9,22	6,52	4,987E7description supercont1.67:160745:212147:1 gene:AAEL002764	
AAEL004118-PA	13,44	3	3	320	36,4	7,03	25,85	4,802E7description supercont1.107:2116117:2117210:1 gene:AAEL004118	
AAEL002542-PA	21,05	4	4	247	26,3	6,34	27,65	4,746E7description supercont1.60:534041:534939:1 gene:AAEL002542	
AAEL011302-PA	13,58	4	4	324	35,6	4,78	21,72	4,671E7description supercont1.565:605037:627163:1 gene:AAEL011302	
AAEL004112-PA	15,63	2	2	192	21,4	5,96	9,39	4,414E7Thioredoxin Peroxidase supercont1.107:2094566:2095144:-1 gene:TPX2	
AAEL006070-PA	28,63	6	6	255	28,5	6,81	23,89	4,282E7description supercont1.188:1032279:1033173:1 gene:AAEL006070	
AAEL006333-PA	10,31	7	4	572	63,2	8,38	37,91	3,520E7description supercont1.201:221091:222943:1 gene:AAEL006333	

Accession	Coverage	#PSMs	#Peptides	#AAs	MW[kDa]	calc. pl	Score	Area	Description
AAEL009337-PC	33,17	7	5	202	22,4	5,54	41,02	3,227E7	description supercont1.390:142116:157131:-1 gene:AAEL009337
AAEL002504-PB	21,12	3	2	161	17,0	5,31	13,92	3,131E7	description supercont1.59:964612:972428:1 gene:AAEL002504
AAEL003872-PA	21,64	3	3	171	19,6	4,78	14,21	2,943E7	description supercont1.99:1134679:1146717:1 gene:TCTP_AEDAE
AAEL007281-PA	4,35	2	2	712	79,5	5,26	13,83	2,825E7	description supercont1.247:860421:932863:-1 gene:AAEL007281
AAEL000748-PA	4,66	2	2	580	66,2	6,15	15,99	2,792E7	description supercont1.15:1338057:1339799:1 gene:AAEL000748
AAEL009872-PA	9,19	5	3	544	59,5	8,28	31,28	2,645E7	description supercont1.435:409834:445789:1 gene:AAEL009872
AAEL014583-PC	23,00	2	2	100	9,8	8,13	6,43	2,607E7	description supercont1.1174:72735:73037:-1 gene:AAEL014583
AAEL003491-PA	12,02	3	2	258	29,1	8,07	18,60	2,535E7	description supercont1.88:1409292:1428756:-1 gene:AAEL003491
AAEL010242-PA	27,71	2	2	83	8,6	8,84	8,92	2,531E7	description supercont1.464:147144:147458:1 gene:AAEL010242
AAEL005515-PF	10,77	2	2	325	34,7	8,00	14,60	2,410E7	description supercont1.161:378497:390893:-1 gene:AAEL005515
AAEL012326-PA	28,19	3	3	149	16,8	4,22	13,29	2,406E7	description supercont1.678:468840:567462:1 gene:AAEL012326
AAEL008489-PA	13,02	2	2	215	24,0	5,07	9,50	2,354E7	description supercont1.328:709134:709901:1 gene:AAEL008489
AAEL009906-PB	11,74	4	2	298	33,6	6,37	16,65	2,320E7	description supercont1.437:360562:388840:-1 gene:AAEL009906
AAEL002417-PC	10,22	3	3	362	43,7	4,83	26,35	2,317E7	description supercont1.56:2760579:2771438:1 gene:AAEL002417
AAEL007135-PA	17,10	2	2	193	20,7	8,88	8,89	2,311E7	description supercont1.238:1466413:1495763:1 gene:AAEL007135
AAEL009852-PA	30,47	2	2	128	13,7	5,12	9,56	2,289E7	description supercont1.432:687355:687803:1 gene:AAEL009852
AAEL004102-PA	11,64	2	2	318	35,8	6,84	18,71	2,266E7	description supercont1.107:2129696:2130775:-1 gene:AAEL004102
AAEL013138-PA	12,80	4	3	289	31,0	8,88	20,35	2,093E7	description supercont1.795:52110:52979:-1 gene:AAEL013138
AAEL001022-PA	13,23	7	4	310	34,1	5,44	31,70	2,083E7	description supercont1.21:2629154:2630221:-1 gene:AAEL001022
AAEL006885-PA	10,08	2	2	248	28,2	4,88	7,54	2,054E7	description supercont1.225:245241:259051:-1 gene:1433Z_AEDAE
AAEL003053-PC	19,61	3	3	255	29,5	8,69	20,92	1,997E7	description supercont1.76:1230328:1231673:1 gene:AAEL003053
AAEL008789-PA	31,12	6	6	196	22,1	5,72	31,18	1,996E7	description supercont1.349:808698:809368:1 gene:AAEL008789
AAEL008257-PA	9,55	4	3	398	42,2	7,03	16,00	1,878E7	description supercont1.309:672352:673548:1 gene:AAEL008257
AAEL001005-PA	5,90	2	2	407	46,7	4,56	7,90	1,764E7	description supercont1.20:3615914:3622930:-1 gene:AAEL001005
AAEL012731-PA	18,67	3	3	241	26,3	7,03	21,98	1,651E7	description supercont1.732:399146:412740:-1 gene:AAEL012731
AAEL008620-PA	7,72	3	2	311	35,2	5,35	13,50	1,588E7	description supercont1.336:1106349:1107354:-1 gene:AAEL008620
AAEL002023-PA	9,30	3	3	441	48,0	8,21	15,09	1,549E7	description supercont1.47:1697432:1721392:-1 gene:AAEL002023
AAEL009216-PB	18,95	4	4	306	34,8	5,69	16,85	1,506E7	description supercont1.381:1041703:1085219:-1 gene:AAEL009216
AAEL001061-PB	13,88	2	2	209	23,8	6,07	21,77	1,334E7	glutathione transferase supercont1.22:2946644:2964060:-1 gene:GSTD1
AAEL008569-PA	11,44	2	2	236	25,5	9,19	8,48	1,271E7	description supercont1.332:1070587:1086484:1 gene:AAEL008569
AAEL004086-PA	9,15	2	2	284	32,3	5,63	14,37	1,209E7	description supercont1.107:2110965:2112219:1 gene:AAEL004086
AAEL004930-PA	13,41	6	2	276	31,3	6,14	25,14	1,197E7	description supercont1.135:950648:1003191:-1 gene:AAEL004930
AAEL005407-PA	13,08	3	3	321	35,7	4,75	14,70	1,085E7	description supercont1.155:618843:640262:1 gene:AAEL005407
AAEL009992-PA	1,05	3	3	3340	379,8	7,88	21,22	9,311E6	description supercont1.445:483273:501887:1 gene:AAEL009992
AAEL011414-PA	23,21	2	2	112	12,7	9,38	16,86	8,831E6	description supercont1.579:614255:614694:1 gene:AAEL011414
AAEL000037-PA	9,37	2	2	363	39,8	7,17	6,96	8,680E6	Clip-Domain Serine Protease, family B supercont1.1:2191296:2192938:-1 gene:CLIPB35
AAEL005102-PA	6,52	2	2	322	35,7	6,47	20,14	8,208E6	description supercont1.142:580980:589516:1 gene:AAEL005102
AAEL014959-PA	6,74	2	2	430	45,7	7,17	7,10	5,079E6	description supercont1.1359:18527:46295:1 gene:AAEL014959
AAEL007915-PA	2,92	2	2	583	69,0	6,01	5,99	5,035E6	description supercont1.288:79547:136590:1 gene:AAEL007915
AAEL011288-PA	5,32	3	2	432	48,9	7,68	12,07	5,015E6	description supercont1.563:142142:152240:1 gene:AAEL011288
AAEL009169-PA	2,76	2	2	832	91,7	6,11	9,20	4,443E6	description supercont1.375:1113257:1143484:-1 gene:AAEL009169
AAEL012904-PA	8,35	2	2	443	49,9	5,59	10,70	4,296E6	description supercont1.757:273696:293775:-1 gene:AAEL012904

Anexo B.1 – Análise das células *naïve* ou de memória de camundongos controle .

Células do baço de camundongos BALB/c receberam células do doador DO11.10 e foram imunizados com OVA. As células foram incubadas com meio somente ou EGS de *Aedes aegypti* nas concentrações 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL e estimuladas ou não por ConA ou OVA. As células CD4⁺ foram avaliadas pela expressão dos marcadores CD62L e CD44.

FONTE: Bizzarro, (2012)

Anexo B.2 – Análise das células *naïve* ou de memória de camundongos imunizados com OVA.

Células do baço de camundongos BALB/c controle foram incubadas com meio somente ou EGS de *Aedes aegypti* nas concentrações 0,5, 1, 5 e 10 µg/mL e estimuladas ou não por ConA ou OVA. As células CD4⁺ foram avaliadas pela expressão dos marcadores CD62L e CD44.

FONTE: Bizzarro, (2012)