

BRUNA BIZZARRO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOFUNCIONAL DE UM INIBIDOR
DE LINFÓCITOS PRESENTE NA SALIVA DE *Aedes aegypti***

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

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

São Paulo
2016

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

RESUMO

BIZZARRO, B. **Caracterização imunofuncional de um inibidor de linfócitos presente na saliva de *Aedes aegypti***. 2016. 102 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Artrópodes hematófagos utilizam o sangue de hospedeiros vertebrados como a sua principal fonte de alimentação, uma vez que o repasto sanguíneo é necessário para a maturação dos ovários das fêmeas dessas espécies. Para obter a ingestão adequada de sangue, esses organismos precisam enfrentar o sistema hemostático e o sistema imune do hospedeiro vertebrado. Como a saliva desses artrópodes é o elemento de interação entre o vetor e o hospedeiro vertebrado, a elucidação de sua composição e de suas atividades biológicas é essencial para entender as interações envolvidas no processo de hematofagia. No presente trabalho, descrevemos a indução de morte celular seletiva para linfócitos causada pela saliva do mosquito *Aedes aegypti*. Essa atividade é caracterizada pela rápida exposição de fosfatidilserina, incorporação de iodeto de propídio, diminuição do tamanho celular, perda da expressão de CD62L e seletividade para linfócitos *naïve*, não afetando linfócitos ativado/memória e nem células dendríticas. Além disso, essa atividade é mais potente em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ do que em linfócitos B. Para identificar a molécula responsável por essa atividade, fracionamos o extrato da glândula salivar (EGS) do mosquito por HPLC e analisamos as frações ativas por espectrometria de massas. A análise diferencial das frações por bioinformática identificou como possível candidato, o transcrito AAEL003655 cujo produto tem massa molecular esperada de 338.16 kDa. Mostramos que esse transcrito está abundantemente expresso em glândulas salivares de *A. aegypti* fêmeas mas não de machos, sugerindo sua participação no repasto sanguíneo. RNA de interferência foi utilizado para silenciar o gene responsável por essa atividade em fêmeas de *A. aegypti* e o EGS desses mosquitos perdeu a capacidade de induzir a morte de linfócitos, confirmando que essa é a molécula responsável pela atividade inibidora observada na saliva desse vetor. Em conclusão, esse trabalho identifica uma nova molécula presente na saliva de *A. aegypti* com atividade seletiva sobre linfócitos e potenciais implicações para o entendimento da biologia do mosquito e em sua interação com o hospedeiro vertebrado.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*. Extrato da glândula salivar. Linfócitos. Morte celular. Imunomodulação.

ABSTRACT

BIZZARRO, B. **Immunofunctional characterization of a lymphocyte inhibitor from *Aedes aegypti* saliva**. 2016. 102 p. Ph. D. Thesis (Immunology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

Hematophagous arthropods use blood from vertebrate hosts as their main source of nutrition, since the blood meal is necessary for ovary maturation of this species' females. In order to nourish themselves, these organisms need to counteract the hemostatic system and the immune system of their vertebrate hosts. Because saliva of these arthropods is the key element of interaction between the vector and the vertebrate host, the elucidation of its composition and its biological activities is essential to understand the interactions involved in the process of hematophagy. In the present work, we described the induction of cell death selective for lymphocytes caused by the saliva of *Aedes aegypti* mosquito. This activity is characterized by fast exposure of phosphatidylserine, incorporation of propidium iodide, cell shrinkage, loss of CD62L expression, and selectivity for *naïve* lymphocytes, but no effect on activated/memory lymphocytes or dendritic cells. Moreover, this activity is more potent in CD4⁺ and CD8⁺ T cells than in B lymphocytes. To identify the molecule responsible for this activity, we fractionated the mosquito's salivary gland extract (SGE) by HPLC and analyzed the active fractions by mass spectrometry. Differential bioinformatics analyses of the fractions identified as the putative candidate, the transcript AAEL003655 that presents a molecular mass of 338.16 kDa. We demonstrated that this transcript is abundantly expressed in salivary glands of *A. aegypti* females but not of males, suggesting a role in blood-feeding. RNA interference was employed to silence the gene responsible for this activity in *A. aegypti* females and the SGE of these mosquitoes lost the ability to induce lymphocyte death, confirming that this is the molecule responsible for the inhibitory activity observed in the saliva of the vector. In conclusion, this work identifies a new molecule from *A. aegypti* saliva with selective activity on lymphocytes and potential implications for the understanding of mosquito biology and its interaction with vertebrate host.

Keywords: *Aedes aegypti*. Salivary gland extract. Lymphocytes. Cell death. Immunomodulation.

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* é um artrópode hematófago pertencente à família Culicidae e o principal vetor de arbovírus causadores da Dengue, Febre Amarela, Chikungunya e Zika, doenças que geram um grande impacto social e econômico em muitos países do mundo. Algumas características desse vetor contribuem para sua importância epidemiológica e grande capacidade vetorial, como o fato de se alimentar preferencialmente em humanos, realizar os repastos sanguíneos durante o dia, sua picada quase imperceptível, capacidade de procriar em pequenas quantidades de água parada e os ovos resistentes a dessecação (BARRETT; HIGGS, 2007; GUBLER, 2002; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Esse conjunto de fatores, somado a falta de vacinas eficazes para combater muitos desses vírus, resultam em epidemias recorrentes que se alastram por grande parte do planeta, principalmente em regiões tropicais e subtropicais onde esses mosquitos estão distribuídos.

Atualmente, as arboviroses transmitidas pelo *A. aegypti* estão criando um cenário preocupante, devido ao grande aumento no número de casos e a velocidade de sua distribuição geográfica. Algumas razões que explicam essa rápida distribuição pelo mundo são: o aumento das viagens internacionais, migrações ilegais através das fronteiras, moradias inadequadas, saneamento básico precário e pouca ou nenhuma estratégia de controle dos vetores (TILAK et al., 2016; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Mudanças nas condições climáticas, como as oscilações causadas pelo *El Niño*, podem acarretar a prática da coleta e armazenamento de água nas residências em recipientes muitas vezes inadequados, gerando um aumento dos focos para reprodução desses vetores (TILAK et al., 2016; WILDER-SMITH; GUBLER, 2008). Em algumas regiões do Brasil, temos observado uma redução na disponibilidade de água das represas nos últimos anos, o que também estimula a prática de armazenar água em casa, refletindo no aumento da população de vetores e conseqüentemente na transmissão de doenças. Além disso, outra preocupação é o aumento da severidade de doenças previamente tidas como brandas, como por exemplo a infecção pelo vírus Zika. Esse vírus foi recentemente introduzido no Brasil e inicialmente diagnosticado com sintomas semelhantes à infecção pelo vírus da Dengue, porém mais amenos. Entretanto, evidências mostram

que infecções pelo vírus estão associadas a quadros graves envolvendo malformações congênitas, síndrome de Guillain-Barré e problemas neurológicos como microcefalia, dentre outras complicações (CUGOLA et al., 2016; TILAK et al., 2016).

A importância desse vetor no cenário atual tem elevado o número de cientistas trabalhando em pesquisas envolvendo o mosquito. Como consequência, o número de publicações contendo a palavra-chave "*Aedes aegypti*" nos últimos 10 anos quase dobrou (2005 = 248 artigos / 2015 = 497 artigos), segundo dados da US National Library of Medicine, National Institutes of Health (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

1.2 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos na hemostasia do hospedeiro

Assim como outras espécies de artrópodes hematófagos, o *A. aegypti* utiliza o sangue de seus hospedeiros como a principal fonte de nutrientes para a maturação dos ovários e desenvolvimento dos ovos nas fêmeas. Para realizar um repasto sanguíneo adequado, esses mosquitos necessitam de mecanismos que impeçam a ativação do sistema hemostático e do sistema imunológico do seu hospedeiro vertebrado. Neste contexto, a saliva desses organismos desempenha um papel essencial, atuando como principal elemento de interação entre o vetor e o hospedeiro.

Além das funções fisiológicas da saliva, como quebra de açúcares e lubrificação das peças bucais, a saliva possui outras funções importantes para a hematofagia (RIBEIRO, 1987). A saliva é composta por uma grande variedade de moléculas com atividades anticoagulante, anti-agregante de plaquetas e vasodilatadora, que facilitam a obtenção de sangue durante o repasto sanguíneo (CHAMPAGNE, 2004; CHMELAR et al., 2012; FRANCISCHETTI et al., 2009; KAZIMIROVA; STIBRANIOVA, 2013; RIBEIRO, 1987). Por exemplo, a aegyptina é uma proteína que por se ligar aos colágenos do tipo I ao IV, bloqueia completamente a adesão de plaquetas ao colágeno e afeta a interação do fator de von Willebrand ao colágeno tipo III (CALVO et al., 2007). Outro exemplo de proteína com atividade anti-agregante de plaquetas presente na saliva do *A. aegypti* é a apirase, que é capaz de hidrolisar ADP e ATP e assim reduzir a ativação e o recrutamento de plaquetas (CHAMPAGNE et al., 1995; RENO; NOVAK, 2005; RIBEIRO et al., 1984). A saliva desse vetor possui também as sialocininas I e II que são peptídeos que fazem parte

da família das taquicininas e possuem atividade vasodilatadora (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992). Outro composto dessa saliva é um inibidor de serino-proteases com atividade anticoagulante específica para o Fator Xa (AFXa, do inglês “*Anticoagulant-factor Xa*”) (STARK; JAMES, 1995, 1998). Além disso, outro inibidor de serino-protease foi descrito, o AaTI (do inglês “*A. aegypti trypsin inhibitor*”), capaz de se ligar a trombina e atuar como anticoagulante (WATANABE et al., 2010; WATANABE et al., 2011).

A importância da presença de fatores anti-hemostáticos na saliva desses vetores pode ser observada pelo fato de que mosquitos transgênicos com níveis reduzidos de aegyptina, gerados por silenciamento gênico, levaram mais tempo para conseguir se alimentar e apresentam quantidades reduzidas de sangue ingerido comparado com mosquitos controle colocados para se alimentar em camundongos anestesiados (CHAGAS et al., 2014).

1.3 Saliva do *A. aegypti* e seus efeitos no sistema imune do hospedeiro

Muitos componentes do sistema hemostático também são capazes de influenciar o sistema imune. Por exemplo, a serotonina e a histamina liberadas por plaquetas e mastócitos são indutores de dor, o que pode fazer com que o mosquito seja percebido pelo hospedeiro e tenha sua alimentação comprometida (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Dessa forma, é de se esperar que os componentes salivares do mosquito também tenham efeito sobre o sistema imune do hospedeiro. Sabe-se que o extrato de glândula salivar (EGS) do *A. aegypti* pode inibir a proliferação de linfócitos (BIZZARRO et al., 2013; CROSS et al., 1994; WANASEN et al., 2004; WASSERMAN et al., 2004), através da indução de apoptose nestas células (BIZZARRO et al., 2013). O EGS de *A. aegypti* também afeta o perfil de citocinas em cultura de esplenócitos estimulados, suprimindo citocinas do tipo Th1 como IL-2 e IFN- γ e pró-inflamatórias como GM-CSF e TNF- α , enquanto citocinas do perfil Th2 (IL-4 e IL-5) são pouco afetadas (CROSS et al., 1994; WASSERMAN et al., 2004). O EGS desse mosquito também é capaz de inibir a liberação de TNF- α em mastócitos de rato (BISSONNETTE et al., 1993). Além disso, a exposição de camundongos infectados com o vírus do Nilo Ocidental às picadas do mosquito altera a migração e sinalização de células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas, e afeta o recrutamento de leucócitos para o tecido, assim como aumenta a expressão de IL-10 e diminui a expressão de iNOS e

IFN- β prejudicando a resposta antiviral (SCHNEIDER et al., 2010). Outros trabalhos mostram que os componentes salivares desse vetor não afetam a diferenciação, maturação e a função de células dendríticas (DCs) (BIZZARRO et al., 2013), além de não alterar a expressão de moléculas como CD40, CD83, MHC I e MHC II e a produção de citocinas como IFN- α e TNF- α em DCs humanas (ADER et al., 2004). Entretanto, a produção de IL12p70 por essas células parecem aumentar após contato com a saliva desse vetor (ADER et al., 2004). Uma das moléculas identificadas e caracterizadas na saliva do *A. aegypti* com atividade imunomoduladora é a SAAG-4, responsável pela programação de células T CD4⁺ para expressar IL-4 (BOPPANA et al., 2009). Outra molécula presente na saliva do *A. aegypti*, a sialocinina I, inicialmente descrita como um vasodilatador, também é capaz de inibir citocinas do tipo Th1 e aumentar a produção de citocinas do tipo Th2 quando inoculada em camundongos (ZEIDNER et al., 1999).

Patógenos capazes de infectar esses mosquitos podem ser transmitidos pela saliva no momento da picada, e as atividades acima descritas podem ser utilizadas por esses patógenos, que se beneficiam do efeito imunomodulador da saliva para facilitar sua transmissão (ARGENTINE; JAMES, 1995). De fato, foi demonstrado que a saliva de *A. aegypti* gera um aumento da infecção pelo vírus do Nilo Ocidental na pele de camundongos, associado com a inibição do recrutamento de linfócitos T e das atividades antivirais em APCs (SCHNEIDER et al., 2010). Outras evidências mostram que a infecção de queratinócitos humanos pelo vírus da dengue é exacerbada na presença da saliva devido à supressão de fatores da resposta imune inata (SURASOMBATPATTANA et al., 2014; SURASOMBATPATTANA et al., 2012). Um trabalho recente mostra que a saliva do *A. aegypti* pode aumentar a permeabilidade endotelial, estimular o extravasamento de plasma, aumentar a carga viral em macrófagos e células dendríticas da derme em um modelo murino de infecção secundária pelo vírus da dengue e ajudar a espalhar esse patógeno mais rapidamente na pele, aumentando a severidade da doença (SCHMID et al., 2016). Esses trabalhos demonstram que a saliva exerce um papel crucial na transmissão desses patógenos e que o entendimento dos aspectos fisiológicos da saliva no repasto sanguíneo e seus efeitos no sistema imune do hospedeiro tem uma importância significativa e inclusive pode ser usado como alvo para novas vacinas e desenvolvimento de outros métodos profiláticos para essas doenças.

1.4 Efeito da saliva do *A. aegypti* em linfócitos e a importância dessas células no sistema imune do hospedeiro

Nosso grupo mostrou recentemente que, ao contrário do que já foi descrito para algumas espécies de artrópodes hematófagos, os componentes salivares de *A. aegypti* não exercem efeito na diferenciação, maturação e função das células dendríticas. Por outro lado, atuam diretamente nos linfócitos T, induzindo uma potente atividade citotóxica seletiva para linfócitos *naïve* (BIZZARRO et al., 2013).

Os linfócitos T têm papel fundamental na proteção contra patógenos, pois são responsáveis por orquestrar a resposta imune adaptativa. O desenvolvimento dessas células ocorre no timo e, em condições normais, células funcionais e não autorreativas sobrevivem e migram para compartimentos linfóides periféricos, em especial órgãos linfóides secundários (DAVIS, 1990; KLEIN et al., 2009; ZINKERNAGEL et al., 1978). Os receptores das células T (TCR) reconhecem peptídeos associados às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) em APCs como linfócitos B, macrófagos e células dendríticas. Moléculas coestimuladoras geram o segundo sinal para a ativação, enquanto integrinas como LFA-1 e ICAM-1 auxiliam na formação da sinapse imunológica que é fundamental para a completa ativação dessas células (DUSTIN et al., 2006; SIMS; DUSTIN, 2002; VAN SEVENTER et al., 1990). Em seguida ocorre uma expansão clonal dessas células que se diferenciam em células T efetoras por ação do microambiente de citocinas produzidas no local. A maior parte dessas células morre por apoptose ao final de uma resposta para que a homeostase do organismo seja mantida. As células que sobrevivem, cerca de 10-20%, se tornam células de memória e são responsáveis por uma resposta mais rápida, potente e eficaz ao reconhecer o mesmo antígeno em um contato subsequente (SALLUSTO et al., 2004; SPRENT et al., 2008).

As células T que apresentam TCR α/β são divididas em três subpopulações principais: células T CD4⁺ ou auxiliares (Th, do inglês "*T helper*"), células T CD8⁺ ou citotóxicas (Tc) e células T reguladoras (Treg) (LEWINSOHN et al., 2011). As células T CD4⁺ secretam citocinas e quimiocinas que auxiliam a produção e troca de classe de anticorpos pelas células B, aumentam a capacidade microbicida de macrófagos e são capazes de recrutar neutrófilos, eosinófilos e basófilos para os locais de inflamação (ZHU; PAUL, 2008). Uma série de revisões tem atualizado o conhecimento sobre as subpopulações de células T CD4⁺, identificadas e

classificadas até o momento de acordo com o padrão de citocinas secretadas e suas funções (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; ZHOU et al., 2009; ZHU; PAUL, 2008; ZHU et al., 2010). As células Th1 secretam principalmente IFN- γ e atuam na proteção contra patógenos intracelulares. O subtipo de células Th2 secreta as citocinas IL-4, IL-5 e IL-13, dentre outras, e tem papel importante contra alguns parasitas extracelulares. Células Th9 também exercem proteção contra parasitas e secretam citocinas como IL-9 e IL-10. Já as células Th17 são eficientes contra bactérias extracelulares e fungos, e secretam as citocinas IL-17, IL-21 e IL-22 principalmente (HIRAHARA; NAKAYAMA, 2016; ZHOU et al., 2009; ZHU; PAUL, 2008; ZHU et al., 2010). As células T auxiliares foliculares (T_{FH} , do inglês “*follicular helper T cells*”) estão presentes nos centros germinativos e são essenciais para a produção de anticorpos pelos linfócitos B e mudança de classe dessas imunoglobulinas (KING, 2009). Já as células T $CD8^+$ são responsáveis por destruir células infectadas e possuem mecanismos efetores eficientes no combate a vírus, bactérias intracelulares e tumores. Além disso, a geração e expansão de células T $CD8^+$ são aumentadas pelas citocinas produzidas por células T $CD4^+$ (BOURGEOIS; TANCHOT, 2003; WILLIAMS et al., 2006). Finalmente, as células Treg foram descritas por sua capacidade em suprimir a proliferação de células T *naïve*, sua diferenciação em células T efectoras e as funções das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ diferenciadas. São ainda capazes de suprimir as funções de células B, NK, NKT, macrófagos, osteoclastos e células dendríticas (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SAKAGUCHI et al., 2008; SHEVACH, 2006; TANG; BLUESTONE, 2008; VON BOEHMER, 2005). Os mecanismos supressores das células Treg envolvem secreção de citocinas anti-inflamatórias como IL-10 e TGF- β , modulação das funções das células apresentadoras de antígenos ou supressão dependente de contato celular (MIYARA; SAKAGUCHI, 2007; SAKAGUCHI et al., 2008). Caracterizadas pela presença do fator de transcrição FoxP3, essas células foram descritas inicialmente como sendo $CD4^+CD25^+$; entretanto outros subtipos de células Treg também foram descritos posteriormente, como as células $CD8^+$ Treg, Tr1, Th3 e células NKT reguladoras (BATTAGLIA et al., 2006; BELIZARIO et al., 2016; GOL-ARA et al., 2012; KIM et al., 2010).

Os linfócitos T são essenciais para o estabelecimento de uma resposta imune apropriada para a eliminação de agentes patogênicos. A ausência dessas células, observada em diversos tipos de imunodeficiências severas e combinadas

(BUCKLEY, 2004; COSSU, 2010) é incompatível com a vida, exceto em ambientes extremamente controlados. Além disso, disfunções de linfócitos T podem resultar em diversas doenças autoimunes como diabetes melitus tipo 1, artrite reumatóide, esclerose múltipla, doença de Crohn, entre outras (MILLS, 2011). Reações de hipersensibilidade, rejeição a transplantes e linfomas também têm os linfócitos T como as principais células envolvidas.

Decifrar o que acontece com as células T durante a picada de um artrópode hematófago envolve uma série de variáveis e um complexo sistema de interação entre o vetor e o hospedeiro vertebrado, por vezes envolvendo um terceiro elemento, o patógeno (LEITNER et al., 2012). Além do intrincado conjunto de subtipos de linfócitos T e suas diferentes condições dependendo de cada situação em que se encontram, o conteúdo da saliva de vetores também pode variar de acordo com cada espécie e sua necessidade de alimentação, complicando ainda mais o entendimento dessa interação. A composição da saliva pode mudar drasticamente em resposta a sinais ambientais como co-infecções com patógenos, presença de microrganismos comensais/microbiota, alimentação prévia com sangue, oscilação circadiana dos níveis de algumas proteínas e diferenças na saliva entre linhagens criadas em laboratório e coletadas no campo (LEITNER et al., 2012). Entretanto, todas as espécies de artrópodes hematófagos e também os microrganismos potencialmente transmitidos, desde vírus até parasitas, tem um objetivo em comum que é sobreviver, resistindo aos mecanismos de defesa de seus hospedeiros.

3 CONCLUSÃO

Neste trabalho, concluímos que:

- A morte celular induzida pelo EGS de *A. aegypti* é caracterizada pela exposição de fosfatidilserina, incorporação de PI, diminuição no tamanho celular e perda da expressão de CD62L.
- O EGS dessa espécie é capaz de induzir a morte seletiva de linfócitos *naïve*, não afetando células ativadas.
- Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ são mais sensíveis a essa atividade do que linfócitos B.
- Células dendríticas não são afetadas por essa atividade.
- A morte celular induzida pelo EGS parece ser independente de caspases.
- O transcrito AAEL003655 foi identificado como o candidato mais provável responsável pela atividade.
- A atividade está presente somente em fêmeas dessa espécie, assim como o transcrito AAEL003655, sugerindo um papel no repasto sanguíneo.
- Anticorpos monoclonais contra a proteína foram capazes de neutralizar parcialmente a atividade.
- O silenciamento do gene responsável pela atividade por RNAi aboliu o efeito do EGS dos mosquitos silenciados em linfócitos.

REFERÊNCIAS*

ADER, D. B. et al. Modulation of dengue virus infection of dendritic cells by *Aedes aegypti* saliva. **Viral Immunol.** v. 17, n. 2, p. 252-265, 2004.

AKAGI, E. M. et al. Pro-apoptotic effects of Amblyomin-X in murine renal cell carcinoma "in vitro". **Biomed Pharmacother.** v. 66, n. 1, p. 64-69, Feb 2012.

ARGENTINE, J. A.; JAMES, A. A. Characterization of a salivary gland-specific esterase in the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect Biochem Mol Biol.** v. 25, n. 5, p. 621-630, May 1995.

BARRETT, A. D.; HIGGS, S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. **Annu Rev Entomol.** v. 52, p. 209-229, 2007.

BATTAGLIA, M. et al. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. **Semin Immunol.** v. 18, n. 2, p. 120-127, Apr 2006.

BELIZARIO, J. E. et al. Thymic and Postthymic Regulation of Naive CD4(+) T-Cell Lineage Fates in Humans and Mice Models. **Mediators Inflamm.** v. 2016, p. 9523628, 2016.

BERNARD, Q.; JAULHAC, B.; BOULANGER, N. Smuggling across the border: how arthropod-borne pathogens evade and exploit the host defense system of the skin. **J Invest Dermatol.** v. 134, n. 5, p. 1211-1219, May 2014.

BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite Immunol.** v. 15, n. 1, p. 27-33, Jan 1993.

BIZZARRO, B. **Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T.** 2012. (Mestrado em Parasitologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

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

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

BOURGEOIS, C.; TANCHOT, C. Mini-review CD4 T cells are required for CD8 T cell memory generation. **Eur J Immunol.** v. 33, n. 12, p. 3225-3231, Dec 2003.

BUCKLEY, R. H. Molecular defects in human severe combined immunodeficiency and approaches to immune reconstitution. **Annu Rev Immunol.** v. 22, p. 625-655, 2004.

BUSBY, J. N. et al. The BC component of ABC toxins is an RHS-repeat-containing protein encapsulation device. **Nature.** v. 501, n. 7468, p. 547-550, Sep 26 2013.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. **J Biol Chem.** v. 282, n. 37, p. 26928-26938, Sep 14 2007.

CARNEIRO-LOBO, T. C. et al. Ixolaris, a tissue factor inhibitor, blocks primary tumor growth and angiogenesis in a glioblastoma model. **J Thromb Haemost.** v. 7, n. 11, p. 1855-1864, Nov 2009.

CHAGAS, A. C. et al. Collagen-binding protein, Aegyptin, regulates probing time and blood feeding success in the dengue vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 111, n. 19, p. 6946-6951, May 13 2014.

CHAMPAGNE, D. E. Antihemostatic strategies of blood-feeding arthropods. **Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.** v. 4, n. 4, p. 375-396, Dec 2004.

CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 91, n. 1, p. 138-142, Jan 4 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 U S A.** v. 92, n. 3, p. 694-698, Jan 31 1995.

CHMELAR, J. et al. Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. **J Proteomics.** v. 75, n. 13, p. 3842-3854, Jul 16 2012.

CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M. et al. A new tick Kunitz type inhibitor, Amblyomin-X, induces tumor cell death by modulating genes related to the cell cycle and targeting the ubiquitin-proteasome system. **Toxicon.** v. 56, n. 7, p. 1145-1154, Dec 15 2010.

COSSU, F. Genetics of SCID. **Ital J Pediatr.** v. 36, p. 76, 2010.

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, n. 5, p. 690-696, Nov 1994.

CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature.** v. 534, n. 7606, p. 267-271, Jun 9 2016.

DAVIS, M. M. T cell receptor gene diversity and selection. **Annu Rev Biochem.** v. 59, p. 475-496, 1990.

DECATHELINÉAU, A. M.; HENSON, P. M. The final step in programmed cell death: phagocytes carry apoptotic cells to the grave. **Essays Biochem.** v. 39, p. 105-117, 2003.

DERUAZ, M. et al. Ticks produce highly selective chemokine binding proteins with antiinflammatory activity. **J Exp Med.** v. 205, n. 9, p. 2019-2031, Sep 1 2008.

DREWES, C. C. et al. Actions of the Kunitz-type serine protease inhibitor Amblyomin-X on VEGF-A-induced angiogenesis. **Toxicon.** v. 60, n. 3, p. 333-340, Sep 1 2012.

DUSTIN, M. L. et al. T cell-dendritic cell immunological synapses. **Curr Opin Immunol.** v. 18, n. 4, p. 512-516, Aug 2006.

FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosci (Landmark Ed).** v. 14, p. 2051-2088, 2009.

GOL-ARA, M. et al. The role of different subsets of regulatory T cells in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis. **Arthritis.** v. 2012, p. 805875, 2012.

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 U S A.** v. 105, n. 22, p. 7845-7850, Jun 3 2008.

GREEN, D. R.; OGUIN, T. H.; MARTINEZ, J. The clearance of dying cells: table for two. **Cell Death Differ.** v. 23, n. 6, p. 915-926, Jun 2016.

GUBLER, D. J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. **Arch Med Res.** v. 33, n. 4, p. 330-342, Jul-Aug 2002.

HEADLAND, S. E.; NORLING, L. V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol.** v. 27, n. 3, p. 149-160, May 2015.

HENSON, P. M.; HUME, D. A. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **Trends Immunol.** v. 27, n. 5, p. 244-250, May 2006.

HEPBURN, N. J. et al. In vivo characterization and therapeutic efficacy of a C5-specific inhibitor from the soft tick *Ornithodoros moubata*. **J Biol Chem.** v. 282, n. 11, p. 8292-8299, Mar 16 2007.

HIRAHARA, K.; NAKAYAMA, T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond the Th1/Th2 paradigm. **Int Immunol.** v. 28, n. 4, p. 163-171, Apr 2016.

KAZIMIROVA, M.; STIBRANIOVA, I. Tick salivary compounds: their role in modulation of host defences and pathogen transmission. **Front Cell Infect Microbiol.** v. 3, p. 43, 2013.

KIM, H. J. et al. Inhibition of follicular T-helper cells by CD8(+) regulatory T cells is essential for self tolerance. **Nature.** v. 467, n. 7313, p. 328-332, Sep 16 2010.

KING, C. New insights into the differentiation and function of T follicular helper cells. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 11, p. 757-766, Nov 2009.

KLEIN, L. et al. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. **Nat Rev Immunol.** v. 9, n. 12, p. 833-844, Dec 2009.

KOH, C. Y. et al. Variegin, a novel fast and tight binding thrombin inhibitor from the tropical bont tick. **J Biol Chem.** v. 282, n. 40, p. 29101-29113, Oct 5 2007.

KOSKINIEMI, S. et al. Rhs proteins from diverse bacteria mediate intercellular competition. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 110, n. 17, p. 7032-7037, Apr 23 2013.

KROEMER, G. et al. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ.** v. 16, n. 1, p. 3-11, Jan 2009.

KRYSKO, D. V. et al. Macrophages use different internalization mechanisms to clear apoptotic and necrotic cells. **Cell Death Differ.** v. 13, n. 12, p. 2011-2022, Dec 2006.

LEITNER, W. W.; COSTERO-SAINT DENIS, A.; WALI, T. Immunological consequences of arthropod vector-derived salivary factors. **Eur J Immunol.** v. 41, n. 12, p. 3396-3400, Dec 2011.

_____. Role of immune cell subsets in the establishment of vector-borne infections. **Eur J Immunol.** v. 42, n. 12, p. 3110-3115, Dec 2012.

LEWINSOHN, D. A.; GOLD, M. C.; LEWINSOHN, D. M. Views of immunology: effector T cells. **Immunol Rev.** v. 240, n. 1, p. 25-39, Mar 2011.

LIU, S. et al. Induction of Fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by *Armigeres subalbatus* saliva. **PLoS One.** v. 7, n. 7, p. e41145, 2012.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods.** v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.

MARTIN, C. J.; PETERS, K. N.; BEHAR, S. M. Macrophages clean up: efferocytosis and microbial control. **Curr Opin Microbiol.** v. 17, p. 17-23, Feb 2014.

MEDEIROS, A. I. et al. Efferocytosis impairs pulmonary macrophage and lung antibacterial function via PGE2/EP2 signaling. **J Exp Med.** v. 206, n. 1, p. 61-68, Jan 16 2009.

MILLS, K. H. TLR-dependent T cell activation in autoimmunity. **Nat Rev Immunol.** v. 11, n. 12, p. 807-822, Dec 2011.

MIYARA, M.; SAKAGUCHI, S. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. **Trends Mol Med.** v. 13, n. 3, p. 108-116, Mar 2007.

MORAIS, K. L. et al. Amblyomin-X induces ER stress, mitochondrial dysfunction, and caspase activation in human melanoma and pancreatic tumor cell. **Mol Cell Biochem.** v. 415, n. 1-2, p. 119-131, Apr 2016.

PACHECO, M. T. et al. Dynein function and protein clearance changes in tumor cells induced by a Kunitz-type molecule, Amblyomin-X. **PLoS One.** v. 9, n. 12, p. e111907, 2014.

PACHECO, M. T. et al. Specific role of cytoplasmic dynein in the mechanism of action of an antitumor molecule, Amblyomin-X. **Exp Cell Res.** v. 340, n. 2, p. 248-258, Jan 15 2016.

PRATES, D. B. et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J Leukoc Biol.** v. 90, n. 3, p. 575-582, Sep 2011.

RAFFLER, N.; RIVERA-NIEVES, J.; LEY, K. L-selectin in inflammation, infection and immunity. **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**. v. 2, n. 3, p. 213-220, 2005.

RAMOS, A. D. **Imunomodulação da encefalomielite autoimune experimental pelo extrato da glândula salivar de Aedes aegypti**. 2014. Tese (Doutorado em Imunologia). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

RENO, H. E.; NOVAK, R. J. Characterization of apyrase-like activity in Ochlerotatus triseriatus, Ochlerotatus hendersoni, and Aedes aegypti. **Am J Trop Med Hyg**. v. 73, n. 3, p. 541-545, Sep 2005.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol**. v. 32, p. 463-478, 1987.

_____. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito Aedes aegypti. **J Exp Biol**. v. 165, p. 61-71, Apr 1992.

RIBEIRO, J. M.; FRANCISCHETTI, I. M. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. **Annu Rev Entomol**. v. 48, p. 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of Aedes aegypti: characterization and secretory fate. **Comp Biochem Physiol B**. v. 79, n. 1, p. 81-86, 1984.

RISSIEK, B. et al. P2X7 on Mouse T Cells: One Channel, Many Functions. **Front Immunol**. v. 6, p. 204, 2015.

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, n. 12, p. 7422-7429, Jun 15 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, n. 3, p. 1497-1505, Aug 1 2007.

SAKAGUCHI, S. et al. Regulatory T cells and immune tolerance. **Cell**. v. 133, n. 5, p. 775-787, May 30 2008.

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

SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu Rev Immunol.** v. 22, p. 745-763, 2004.

SCHMID, M. A. et al. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. **PLoS Pathog.** v. 12, n. 6, p. e1005676, Jun 2016.

SCHNEIDER, B. S. et al. Aedes aegypti saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection. **PLoS One.** v. 5, n. 7, p. e11704, 2010.

SEGAWA, K.; NAGATA, S. An Apoptotic 'Eat Me' Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends Cell Biol.** v. 25, n. 11, p. 639-650, Nov 2015.

SEMAN, M. et al. NAD-induced T cell death: ADP-ribosylation of cell surface proteins by ART2 activates the cytolytic P2X7 purinoceptor. **Immunity.** v. 19, n. 4, p. 571-582, Oct 2003.

SENGSTAKE, S.; BONEBERG, E. M.; ILLGES, H. CD21 and CD62L shedding are both inducible via P2X7Rs. **Int Immunol.** v. 18, n. 7, p. 1171-1178, Jul 2006.

SHEVACH, E. M. From vanilla to 28 flavors: multiple varieties of T regulatory cells. **Immunity.** v. 25, n. 2, p. 195-201, Aug 2006.

SIMONS, S. M. et al. The action of Amblyomma cajennense tick saliva in compounds of the hemostatic system and cytotoxicity in tumor cell lines. **Biomed Pharmacother.** v. 65, n. 6, p. 443-450, Sep 2011.

SIMS, T. N.; DUSTIN, M. L. The immunological synapse: integrins take the stage. **Immunol Rev.** v. 186, p. 100-117, Aug 2002.

SOUSA, A. C. et al. Exploring the anti-tumoral effects of tick saliva and derived components. **Toxicon.** v. 102, p. 69-73, Aug 2015.

SPRENT, J. et al. T cell homeostasis. **Immunol Cell Biol.** v. 86, n. 4, p. 312-319, May-Jun 2008.

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, n. 3, p. 321-331, Nov 1995.

_____. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J Biol Chem.** v. 273, n. 33, p. 20802-20809, Aug 14 1998.

STIBRANIOVA, I.; LAHOVA, M.; BARTIKOVA, P. Immunomodulators in tick saliva and their benefits. **Acta Virol.** v. 57, n. 2, p. 200-216, 2013.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. *Aedes aegypti* saliva contains a prominent 34-kDa protein that strongly enhances dengue virus replication in human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** v. 134, n. 1, p. 281-284, Jan 2014.

SURASOMBATPATTANA, P. et al. *Aedes aegypti* saliva enhances dengue virus infection of human keratinocytes by suppressing innate immune responses. **J Invest Dermatol.** v. 132, n. 8, p. 2103-2105, Aug 2012.

TANG, Q.; BLUESTONE, J. A. The Foxp3⁺ regulatory T cell: a jack of all trades, master of regulation. **Nat Immunol.** v. 9, n. 3, p. 239-244, Mar 2008.

TILAK, R. et al. Dengue, chikungunya ... and the missing entity - Zika fever: A new emerging threat. **Med J Armed Forces India.** v. 72, n. 2, p. 157-163, Apr 2016.

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

TRITARELLI, A. et al. p53 localization at centrosomes during mitosis and postmitotic checkpoint are ATM-dependent and require serine 15 phosphorylation. **Mol Biol Cell.** v. 15, n. 8, p. 3751-3757, Aug 2004.

TSUJIMOTO, H.; GRAY, E. W.; CHAMPAGNE, D. E. Black fly salivary gland extract inhibits proliferation and induces apoptosis in murine splenocytes. **Parasite Immunol.** v. 32, n. 4, p. 275-284, Apr 2010.

VALENZUELA, J. G. et al. Toward a defined anti-*Leishmania* vaccine targeting vector antigens: characterization of a protective salivary protein. **J Exp Med.** v. 194, n. 3, p. 331-342, Aug 6 2001.

VAN SEVENTER, G. A. et al. The LFA-1 ligand ICAM-1 provides an important costimulatory signal for T cell receptor-mediated activation of resting T cells. **J Immunol.** v. 144, n. 12, p. 4579-4586, Jun 15 1990.

VANDIVIER, R. W.; HENSON, P. M.; DOUGLAS, I. S. Burying the dead: the impact of failed apoptotic cell removal (efferocytosis) on chronic inflammatory lung disease. **Chest**. v. 129, n. 6, p. 1673-1682, Jun 2006.

VON BOEHMER, H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. **Nat Immunol**. v. 6, n. 4, p. 338-344, Apr 2005.

WALLACH, D.; KANG, T. B.; KOVALENKO, A. Concepts of tissue injury and cell death in inflammation: a historical perspective. **Nat Rev Immunol**. v. 14, n. 1, p. 51-59, Jan 2014.

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, n. 2, p. 191-199, Jun 2004.

WANG, Q. et al. Pyroptotic cells externalize eat-me and release find-me signals and are efficiently engulfed by macrophages. **Int Immunol**. v. 25, n. 6, p. 363-372, Jun 2013.

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

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

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

WILDER-SMITH, A.; GUBLER, D. J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. **Med Clin North Am**. v. 92, n. 6, p. 1377-1390, x, Nov 2008.

WILLIAMS, M. A.; TYZNIK, A. J.; BEVAN, M. J. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8+ memory T cells. **Nature**. v. 441, n. 7095, p. 890-893, Jun 15 2006.

YU, Y. et al. Ss-Rhs1, a secretory Rhs repeat-containing protein, is required for the virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Mol Plant Pathol**. Jul 9 2016.

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

ZHOU, L.; CHONG, M. M.; LITTMAN, D. R. Plasticity of CD4+ T cell lineage differentiation. **Immunity.** v. 30, n. 5, p. 646-655, May 2009.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood.** v. 112, n. 5, p. 1557-1569, Sep 1 2008.

ZHU, J.; YAMANE, H.; PAUL, W. E. Differentiation of effector CD4 T cell populations. **Annu Rev Immunol.** v. 28, p. 445-489, 2010.

ZINKERNAGEL, R. M. et al. On the thymus in the differentiation of "H-2 self-recognition" by T cells: evidence for dual recognition? **J Exp Med.** v. 147, n. 3, p. 882-896, Mar 1 1978.