

CIRO NOVAES ROSA LINO

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

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

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

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

São Paulo
2013

RESUMO

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

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

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

ABSTRACT

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

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

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

1 INTRODUÇÃO

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

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

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

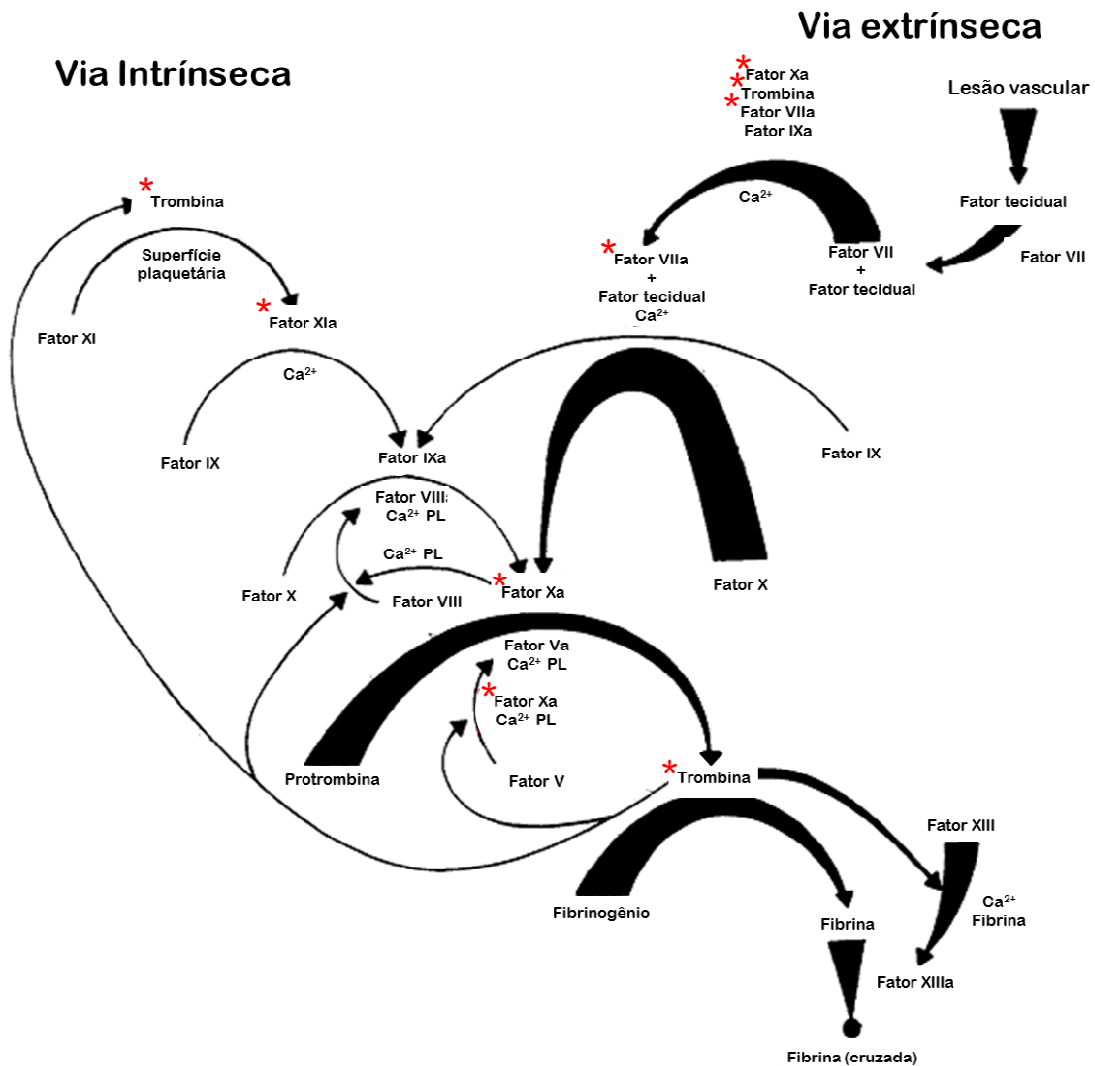
saliva, contendo o patógeno, no hospedeiro vertebrado, transmitindo doenças. Para se alimentar com sucesso, os mosquitos, assim como outros artrópodes hematófagos, enfrentam vários desafios. Dentre eles está um sistema complexo e redundante contra a perda de sangue do hospedeiro, chamado de hemostasia.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

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

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

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

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



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

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

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

inibir a atividade da trombina (ROSENBERG; DAMUS, 1973) e dos fatores IXa, Xa e XIa (DAVIE; FUJIKAWA; KISIEL, 1991; OLSON et al., 2010). A antitrombina circula no sangue num estado “reprimido” de atividade, em que sua capacidade de inibição não é grande o suficiente para impedir a formação do coágulo no local da lesão, porém, quando em contato com heparina ou sulfato de heparano, sua interação com seus alvos são favorecidos, bloqueando-os de forma virtualmente instantânea e evitando a formação de qualquer coágulo. Esse estado “reprimido” permite que antitrombina mantenha uma baixa atividade até que o contrário seja necessário, prevenindo que o coágulo se forme em outros locais além do ferimento e/ou se propague descontroladamente (OLSON et al., 2010). De fato, a deficiência de antitrombina esta ligada ao aumento da predisposição à trombose (MACKIE et al., 1978), enquanto que a ausência total da serpina mostrou ser letal em camundongos ainda na fase fetal (ISHIGURO et al., 2000). Além da antitrombina, várias outras serpinas estão envolvidas no controle da coagulação, como o cofator II da heparina, que inibe trombina (TOLLEFSEN; MAJERUS; BLANK, 1982), a α 2-macroglobulina, inibidor de trombina (CVIRN; GALLISTL; MUNTEAN, 2001), proteína Ca, inibidor dos fatores Va e VIIIa (MARLAR; KLEISS; GRIFFIN, 1982) e a α 1-antitripsina, inibidora da proteína Ca (HEEB; GRIFFIN, 1988).

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

presente na saliva de *Ae. aegypti*, pertencente à família das aegyptinas, impede a agregação plaquetária, interferindo na ligação do colágeno com três de seus principais ligantes: glicoproteína VI, integrina $\alpha 2\beta 1$ e fator de von Willebrand (CALVO et al., 2007). A saliva dessa espécie apresenta ainda as sialocininas I e II, peptídeos pertencentes à família das taquicininas, para lidar com a vasoconstrição decorrente da ruptura do vaso sanguíneo (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994).

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

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

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

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

As serinoproteases, principais alvos bioquímicos das serpinas, representam a maior família de proteases conhecidas, com aproximadamente 200 membros conhecidos em humanos. Elas estão envolvidas em diferentes processos fisiológicos, entre eles, vários relacionados à imunidade, como inflamação, remodelagem do tecido, eliminação de patógenos e apoptose. O excesso dessas enzimas podem ainda contribuir com doenças autoimunes, alergias e metástase de tumores. Dessa forma não é de se surpreender que essa atividade seja finamente regulada por diversos mecanismos, como, por exemplo, inibição pelas serpinas, impedindo uma proteólise descontrolada (BOTS; MEDEMA, 2008; HEUTINCK et al., 2010; MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008). Por exemplo, a serpina A1 (α 1-antitripsina) é um potente inibidor extracelular da elastase produzida por neutrófilos (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). Essa elastase está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos sendo liberada para o tecido quando a célula encontra um objeto a ser fagocitado ou após morrer por autofagia, e apesar dela ter um importante papel no combate a infecções, seu excesso pode levar a lesão tecidual e a diversas doenças (JANOFF, 1985). A serpina A1 é produzida no fígado e é encontrada em grandes concentrações principalmente nos pulmões durante uma infecção, onde previne que o tecido seja lesado pela elastase, evitando a doença pulmonar obstrutiva crônica, estando associada também a doenças no fígado e inflamações crônicas (MULGREW; TAGGART; MCELVANEY, 2007). A serpina A1 também inibe algumas quimases do sistema imune, incluindo a catepsina G e quimases presentes em mastócitos, embora esses não sejam seus alvos principais (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). A catepsina G tem um importante papel na eliminação de patógenos, degradação da matriz extracelular e regulação de

respostas inflamatórias como ativação do TNF- α , inibição de adesão e migração celular e clivagem de antígenos que serão apresentados via MHC II. As quimases de mastócitos também têm um papel na eliminação de patógenos e degradação da matriz extracelular, além de promover vasoconstrição e ativar citocinas pró-inflamatórias (HEUTINCK et al., 2010). O principal inibidor dessas proteínas é outra serpina, a serpina A3 (α 1-antiquimiotripsina) (BEATTY; BIETH; TRAVIS, 1980). Assim como a A1 ela é produzida no fígado e encontrada em maior quantidade nos pulmões, prevenindo a degradação da matriz extracelular durante processos inflamatórios, estando envolvida em enfermidades como doença pulmonar obstrutiva crônica e doenças neurodegenerativas (MANGAN; KAISERMAN; BIRD, 2008).

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

6 CONCLUSÕES

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

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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

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

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

*De acordo com:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ZEIDNER, N. S.; HIGGS, S.; HAPP, C. M.; BEATY, B. J. ; MILLER, B. R. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. **Parasite immunology**; v. 21, n. 1, p. 35-44, 1999.