

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

JOSIANE BETIM DE ASSIS

**Avaliação da morte de linfócitos induzida pela saliva
de *Aedes aegypti***

São Paulo
2023

JOSIANE BETIM DE ASSIS

**Avaliação da morte de linfócitos induzida pela saliva
de *Aedes aegypti***

Versão Corrigida

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 Doutora em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

São Paulo

2023

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Assis, Josiane Betim de
Avaliação da morte de linfócitos induzida pela
saliva de *Aedes aegypti* / Josiane Betim de Assis;
orientador Anderson de Sá Nunes. -- São Paulo, 2023.
105 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Aedes aegypti*. 2. saliva. 3. morte celular.
4. imunomodulação. 5. eferocitose. I. Sá Nunes,
Anderson de, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidata: Josiane Betim de Assis

Título da Tese: Avaliação da morte de linfócitos induzida pela saliva de *Aedes aegypti*

Orientador: Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou a candidata

Aprovada

Reprovada

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação do perfil imunológico de animais expostos à picada e extrato de glândula salivar do mosquito Aedes aegypti*", registrado sob o protocolo nº **131/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **07/11/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Anderson de Sá Nunes**

- Departamento: *Imunologia*

- Membros da Equipe: *Josiane Betim de Assis (Pós-graduando), Sandra Alexandre Alves (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico ww2.icb.usp.br/icb/ceua. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of the immunological profile of animals exposed to bites and salivary gland extract of Aedes aegypti mosquitoes*", protocol nº **131/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/7/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Anderson de Sá Nunes**

- Team members: *Josiane Betim de Assis (Pós-graduando), Sandra Alexandre Alves (Técnico de laboratório)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>Balb/c</i>	<i>Fêmea/female</i>	20 g	960
	<i>C57BL/6</i>	<i>Fêmea/female</i>	20 g	960

São Paulo, 08 de novembro de 2017.

Luciane Valéria Sita
Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora CEUA-ICB/USP

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da morte de linfócitos induzida pela saliva de *Aedes aegypti* e sua eferocitose por células dendríticas e macrófagos.", protocolada sob o CEUA nº 9647260721 (ID 002226), sob a responsabilidade de **Anderson de Sá Nunes e equipe; Josiane Betim de Assis** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 08/10/2021.

We certify that the proposal "Evaluation of lymphocyte death induced by *Aedes aegypti* saliva and its efferocytosis by dendritic cells and macrophages.", utilizing 312 Isogenics mice (312 females), protocol number CEUA 9647260721 (ID 002226), under the responsibility of **Anderson de Sá Nunes and team; Josiane Betim de Assis** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 10/08/2021.

Finalidade da Proposta: Pesquisa (Acadêmica)

Vigência da Proposta: de 10/2021 a 10/2025 (48 meses)

Área: Imunologia

Origem: Biotério Central FMUSP

Espécie: Camundongos isogênicos

sexo: Fêmeas

Peso ou idade: 6 a 12 semanas N: 312

Linhagem: C57BL/6

São Paulo, 04 de outubro de 2022



Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Prof. Dr. Francemilson Goulart da Silva
Vice-Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)



Aos meus queridos pais Adriane e Jose Edson, meu irmão Henrique e à minha avó Roseli, que tanto me incentivaram durante toda minha jornada.

Ao meu marido Fábio, com gratidão pela compreensão e apoio incondicionais.

AGRADECIMENTOS

Nenhum projeto científico se desenvolve sem cooperação. O trabalho aqui apresentado só pôde ser realizado devido à boa vontade, persistência e apoio de diversas pessoas muito importantes.

Aos meus pais **Adriane** e **Jose**, meu irmão **Henrique**, minha avó **Roseli** e meu marido **Fábio**, agradeço imensamente! Cada um, à sua maneira, me dedicou seu amor, cuidado, carinho, compreensão e incentivo nessa fase que se encerra e isso tudo foi muito importante para que eu pudesse concluí-la feliz. A vocês, minha sincera gratidão e meu amor eterno!

Ao meu orientador, Dr. **Anderson de Sá Nunes**, agradeço pelo seu conhecimento, pelo seu tempo, por toda paciência e generosidade. Sobretudo, agradeço pelas oportunidades que me proporcionou, por abrir as portas do seu laboratório onde eu pude trabalhar desde o mestrado, crescer cientificamente e aprender com pessoas tão maravilhosas durante todos estes anos. Foi uma honra ser sua aluna!

Agradeço à **Sandra Alexandre**, técnica do Laboratório de Imunologia Experimental (LIE), pela sua parceria, sua amizade e pela sua contribuição na coleta das glândulas salivares de *Aedes aegypti*, imprescindíveis para a realização desse trabalho. Valeu, Sandrinha!

Agradeço a todos os cientistas com quem eu tive a honra de trabalhar no LIE. Cada um, com seu conhecimento e sua generosidade, permitiu que eu pudesse tornar mais sólida minha bagagem de aprendizados. Meu agradecimento especial à Dra. **Bruna Bizzarro Colli**, que me precedeu na investigação dos efeitos da saliva de *Ae. aegypti* sobre linfócitos; ao Dr. **Rafi ur Rahman**, que dividiu conosco um pouco da sua cultura e do seu amor pelo Brasil; à Dra. **Eliane Esteves**, que carinhosamente me acolheu nos estudos sobre a atividade imunomoduladora da saliva de carrapatos (e com quem as “dancinhas da vitória” de cada experimento bem sucedido eram regra) – você é ímpar, Eli!

Aos atuais membros do LIE, **Gretta Bustamante**, **Júlia Bernardi** e **Wilson Molari**, a quem tenho a felicidade de chamar de amigos, agradeço pela cumplicidade e por todo apoio no laboratório e fora dele. Eu tenho muito orgulho de vocês!

Agradeço também aos demais amigos que a Pós-Graduação me permitiu conhecer, em especial **Mariane Sloniak** e **Luiz Adriano Damasceno**. Vocês são mais que colegas de bancada. Obrigada por estarem comigo nos bons momentos e naqueles não tão bons assim.

À Dra. **Margareth de Lara Capurro** e à técnica **Ediane Fernandes**, agradeço por nos proporcionarem os mosquitos *Ae. aegypti*, matéria-prima utilizada no desenvolvimento deste projeto.

À Dra. **Alexandra Ivo de Medeiros** e toda sua equipe, em especial, à **Ludmilla Silva**, agradeço por tão carinhosamente me receberam em seu laboratório e pela enorme atenção dedicada aos nossos ensaios de eferocitose, discutindo resultados e possibilidades. Vocês todos são maravilhosos!

Ao Dr. **Anderson Zanardi de Freitas**, agradeço por gentilmente ter analisado nossas amostras por espectroscopia e AFM, me ensinando e esclarecendo minhas dúvidas com tanta paciência e elegância.

À Dra. **Alessandra Pontillo**, Dra. **Ana Paula Lepique** e ao Dr. **Paulo Basso**, agradeço por aceitarem compor a minha banca de qualificação e pelas sugestões que tanto contribuíram para o resultado final desse trabalho.

Novamente, agradeço à Dra. **Alessandra Pontillo**, que, junto à sua aluna **Mariela Roa**, discutiu resultados e esclareceu, com generosidade, minhas dúvidas relacionadas aos inflamassomas e piroptose.

Agradeço ainda à Dra. **Ana Paula Lepique** por seu trabalho frente à CCP, por sua atuação nos encontros da Pós-Graduação, pelas conversas enriquecedoras, as falas diretas e o olhar carinhoso com que sempre me recebeu. Muito obrigada, Ana. Você é inspiradora!

À Dra. **Denise Moraes da Fonseca**, que sempre me acolheu como parte do seu laboratório, atendendo às minhas dúvidas e pedidos, agradeço também pela sua atenciosa supervisão durante o estágio do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE). Foi excelente poder trabalhar com você!

Agradeço à **Eliane Gomes**, técnica do Serviço de Citometria do ICB IV, pelo auxílio com o *sorting* de linfócitos, além das conversas e boas risadas. Ainda em relação às citometrias, agradeço à **DBR Biotech**, especialmente à **Margareth Fernandes** e à **Jaqueline Rodrigues** que nos proporcionaram o uso do citômetro de fluxo espectral Northern Lights e muito gentilmente nos forneceram todo suporte

para seu melhor aproveitamento. Agradeço ainda à **Joelcimar da Silva** pela boa vontade e pelo prestimoso suporte com o Fortessa e o Northern Lights.

À **Maria Eni**, secretária da Pós-Graduação, agradeço pela ajuda desde a inscrição na seleção do Programa até o auxílio com os trâmites da defesa. E ao **João Pinheiro**, secretário de Graduação do Departamento de Imunologia, agradeço pelo carinhoso auxílio durante o período do PAE.

À querida **Neide Gomes**, agradeço pela simpatia e atenção com que sempre adentrou nosso laboratório. Aos amigos da portaria do ICB IV, **Ailton de Oliveira**, **Antonio Jacinto**, **Aparecido Borges**, **Delman Reis**, **José Carlos da Matta**, **Jucelino Luciano**, **Milton dos Santos**, **Nilson de Oliveira**, **Otacílio Pedro dos Santos**, **Rafael Rosa Filho** e **Rony Borges dos Santos**, agradeço por todo carinho e acolhimento, por tanta simpatia e boa vontade. Foi um prazer poder estar com vocês em cada novo dia de trabalho!

Aos queridos **Moisés de Brito**, **Carlos Pedroso** e **Marcio Martins**, que para além da simpatia, sempre estiveram prontos para dar suporte às nossas apresentações de aulas e palestras.

Meus sinceros agradecimentos ainda a todas as demais pessoas que possam ter contribuído de alguma forma para a conclusão desse trabalho.

Agradeço à **CAPES**, ao **CNPq** e à **FAPESP**, que proporcionaram auxílio financeiro para o desenvolvimento desse projeto.

Por fim, serei eternamente grata a **Deus**, ao universo, ao destino ou ao que quer que tenha permitido que, dentre todas as possibilidades que a vida pode apresentar, eu tenha encontrado todas essas pessoas e vivido essa jornada de tanto aprendizado e conhecimento que hoje toma forma através das páginas desse trabalho. Obrigada a cada um de vocês!

“O importante não é ver o que ninguém nunca viu, mas sim, pensar o que ninguém nunca pensou sobre algo que todo mundo vê.”

- *Arthur Schopenhauer*

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

“O presente trabalho foi realizado com apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processos 311204/2018-0, 431291/2018-7 e 312674/2021-0”

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos 2009/09892-6 e 2018/18462-4”

RESUMO

ASSIS, J. B. **Avaliação da morte de linfócitos induzida pela saliva de *Aedes aegypti***. 2023. 103 f. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

O mosquito *Aedes aegypti* é um inseto hematófago conhecido por ser vetor de arbovírus de grande importância na saúde pública. Sua saliva é composta por ampla gama de moléculas com atividades anti-hemostáticas e imunomoduladoras, dentre as quais foi identificada uma citotoxicidade seletiva para linfócitos. Considerando a diversidade de mecanismos de morte celular regulada descritos na literatura, uma compreensão mais aprofundada do processo desencadeado pela saliva em linfócitos é necessária. As consequências dessa citotoxicidade também carecem de esclarecimentos, incluindo a investigação sobre a possível eferocitose das células em processo de morte. Assim, o objetivo deste trabalho foi caracterizar a morte de linfócitos induzida pela saliva de *Ae. aegypti* e avaliar a possível eferocitose decorrente desse processo. Para isso, baços murinos foram usados como fonte de linfócitos, os quais foram incubados com extrato da glândula salivar (EGS) de *Ae. aegypti* para as avaliações subsequentes. Identificamos, inicialmente, que o EGS inibiu a linfoproliferação de linfócitos induzida por concanavalina A e foi capaz de alterar a topografia da membrana das células afetadas. Essas alterações ocorreram como consequência da morte de linfócitos, um efeito causado por moléculas termolábeis com massa molecular superior a 100 kDa. Notamos ainda que a atividade de caspases, em especial caspase-3, é importante para o desenvolvimento desse fenômeno, que afetou células T e B de maneiras diferentes. Enquanto células B apresentam um perfil de morte mais próximo ao da apoptose clássica, mantendo a estrutura da membrana sem liberar lactato desidrogenase (LDH), as células T parecem ser mais sensíveis à ação citotóxica, visto que essas células liberam LDH e diminuem em número ao longo das primeiras 24 horas de cultura. Apesar dessas características, a morte celular induzida pelo EGS não parece ser dependente de caspase-1 ou gasdermina D, demonstrando não induzir a ativação das vias canônica ou não canônica da piroptose. Mesmo com os efeitos observados *in vitro*, ensaios *in vivo* não demonstraram diferenças significativas na morte de linfócitos da pele de camundongos expostos à picada do mosquito. Além disso, não fomos capazes de detectar influência da morte induzida pelo EGS no processo de eferocitose por células dendríticas derivadas da medula óssea, nem na maturação ou liberação de citocinas por essas células. Acreditamos, contudo, que o processo de morte seletiva induzida pelo EGS de *Ae. aegypti* pode ajudar a ampliar o conhecimento sobre o microambiente criado pela saliva na pele do hospedeiro e contribuir para o desenvolvimento de estratégias de combate ao mosquito e aos patógenos por ele transmitidos.

Palavras-chave: *Aedes aegypti*, saliva, morte celular, imunomodulação, eferocitose.

ABSTRACT

ASSIS, J. B. **Evaluation of lymphocyte death induced by *Aedes aegypti* saliva.** 2023. 103 f. Thesis (Immunology PhD) – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

Aedes aegypti mosquito is a hematophagous insect known as the vector of arboviruses of great importance in public health. Its saliva is composed of a wide range of molecules with anti-hemostatic and immunomodulatory activities, among which a selective cytotoxicity for lymphocytes has been identified. Considering the diversity on the regulated cell death mechanisms described in the literature, a deeper understanding of the process triggered by saliva on lymphocytes is needed. The consequences of this cytotoxicity also ask for clarification, including the investigation on the possible efferocytosis of the dying cells. Thus, the goal of this work was to characterize the *Ae. aegypti* saliva-induced lymphocyte death in more details, and to evaluate whether efferocytosis results from this process. For this, total spleen cells from mice were used as a source of lymphocytes and incubated with *Ae. aegypti* salivary gland extract (SGE) for further evaluations. We observed that EGS inhibited concanavalin A-induced lymphocyte proliferation and it was able to alter the membrane topography of the affected cells. These changes occurred as a consequence of lymphocyte death, an effect caused by thermolabile molecules with molecular mass higher than 100 kD. We also noted that caspases activity, especially caspase-3, is important for the development of this phenomenon, which affected T and B cells in different ways. While B cells present a death profile similar to classical apoptosis, maintaining the membrane structure without releasing lactate dehydrogenase (LDH), T cells appear to be more sensitive to the cytotoxic action, as these cells release LDH and decrease in number over the first 24 hours culture. Despite these features, EGS-induced cell death does not seem to be dependent on caspase-1 or gasdermin D, ruling out the activation of the canonical or non-canonical pyroptosis pathways. Even considering the *in vitro* observed effects, *in vivo* assays did not evidenced significant differences in lymphocytes death from the skin of mice exposed to mosquito bites. Furthermore, we were not able to detect the influence of EGS-induced death on the efferocytosis process by bone marrow-derived dendritic cells, nor on the maturation or release of cytokines by these cells. We believe, however, that the process of selective death induced by *Ae. aegypti* SGE can help understand the microenvironment created by saliva on the host's skin and contribute to the development of strategies to fight the mosquito and the pathogens it transmits.

Key words: *Aedes aegypti*, saliva, cell death, immunomodulation, efferocytosis.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O mosquito *Aedes aegypti*

Artrópodes pertencentes à classe Insecta, ordem Diptera e família Culicidae, os mosquitos são insetos que apresentam metamorfose completa em seu ciclo de vida, passando pelos estágios de ovo, larva, pupa e adulto (1,2). Dentre as espécies descritas de mosquitos, as pertencentes aos gêneros *Culex*, *Anopheles* e *Aedes* são as mais conhecidas devido à sua relevância clínica e epidemiológica como vetores de patógenos causadores de doenças (1,3).

A espécie *Aedes aegypti*, descrita por Linnaeus em 1762, compreende mosquitos de coloração escura que apresentam listras brancas nas patas e um característico padrão de escamas branco-prateadas em forma de lira em seu escudo dorsal (4,5). Acredita-se que a subespécie doméstica do mosquito (*Aedes aegypti aegypti*) tenha se desenvolvido a partir de uma forma silvestre (*Aedes aegypti formosus*) há mais de 4000 anos, devido à pressão imposta pelo período de seca que transformou a região norte da África nesse período. Essa mudança teria forçado um grupo isolado de *Ae. aegypti* a se adaptar ao ambiente utilizando locais ou estruturas de armazenamento de água como criadouro (6,7). Especula-se que o comércio de escravos africanos tenha contribuído para o início da dispersão global do *Ae. aegypti*, o qual, desde então, espalhou-se para as regiões tropicais e subtropicais, acompanhando a migração do homem pelo mundo (6–10). Os processos de urbanização e crescimento populacional, associados às alterações climáticas e à capacidade do mosquito de procriar em pequenos volumes de água parada e produzir ovos resistentes à dessecação, favoreceram não apenas a distribuição geográfica e expansão cosmopolita do *Ae. aegypti* (Figura 1), como também a disseminação de doenças transmitidas por esse vetor, tais como a febre amarela, dengue, Chikungunya e Zika (11–16).

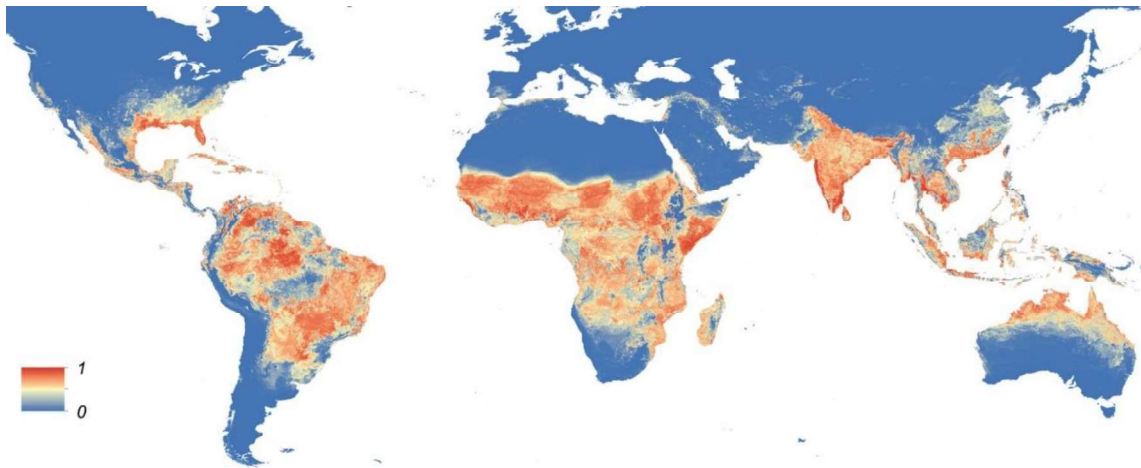


Figura 1 - Distribuição global do *Aedes aegypti*. O mapa mostra a probabilidade de ocorrência do mosquito *Ae. aegypti* no mundo - de 0 (azul) a 1 (vermelho). Fonte: Kraemer et al., 2015 .

Apesar da longa relação entre mosquitos e seres humanos, até o final do século XIX acreditava-se que os mosquitos em geral causavam incômodo unicamente devido às reações cutâneas locais decorrentes das picadas. Após a descoberta de que mosquitos poderiam atuar como vetores de doenças, iniciaram-se estudos mais detalhados sobre a história natural e a biologia desses vetores com o propósito de combatê-los (17,18). Foi a partir daí que a saliva de mosquitos e seus componentes passaram a ser investigados como fatores importantes no processo de alimentação sanguínea e na transmissão vetorial (19,20).

1.2 Propriedades da saliva de *Ae. aegypti*

Machos e fêmeas adultos de *Ae. aegypti* se alimentam de açúcares, especialmente néctar de flores, que servem como fonte de energia para seu metabolismo basal; no entanto, esse tipo de alimentação contribui pouco para a fertilidade (21,22). A fêmea, portanto, necessita realizar o repasto sanguíneo para garantir uma oviposição eficiente, uma vez que os nutrientes do sangue são essenciais para maturação completa dos folículos ovarianos e produção dos ovos (6,23). Curiosamente, mesmo quando dispõe de outras fontes de sangue, tais como roedores, suínos e bovinos, por exemplo, o *Ae. aegypti* realiza o repasto sanguíneo preferencialmente em humanos, o que revela um alto grau de antropofilia (18,24).

A hematofagia evoluiu em paralelo com a diversificação dos componentes salivares e, por consequência, a composição da saliva de *Ae. aegypti* fêmeas difere da saliva dos machos, os quais são essencialmente fitófagos (25,26). Apesar de

ambos apresentarem agentes antimicrobianos e componentes responsáveis pela digestão e metabolismo de açúcares, as fêmeas necessitam de aparatos que a permitam superar os mecanismos do sistema hemostático e do sistema imunológico do seu hospedeiro vertebrado, a fim de garantir que o processo hematofágico ocorra adequadamente (25,27,28).

1.2.1 Atividade anti-hemostática

A Figura 2 apresenta diferentes mecanismos pelos quais a saliva de *Ae. aegypti* atua na hemostasia. Já foram caracterizados componentes com atividade anticoagulante, como o fator Xa anticoagulante (AFXa, do inglês *Anticoagulant-factor Xa*), um inibidor de serinoproteases capaz de se ligar e inibir especificamente o fator Xa, elemento da via comum da cascata de coagulação (29,30) e o inibidor de tripsina de *Ae. aegypti* (AaTI, do inglês *Aedes aegypti trypsin inhibitor*), outro inibidor de serinoproteases, capaz de se ligar à trombina (31,32). Além disso, foram descritas moléculas que atuam como anti-agregante de plaquetas, como a apirase, que realiza a hidrólise de ATP e ADP, reduzindo o recrutamento e a agregação plaquetária (33,34), as proteínas da família D7, que inibem a agregação plaquetária e a vasoconstrição (35,36) e a aegyptina, que se liga ao colágeno do tipo IV, interferindo na adesão plaquetária ao colágeno e inibindo a interação do fator de von Willebrand ao colágeno tipo III (37–39). Foram identificadas, ainda, as sialocininas I e II, peptídeos que agem diretamente sobre o endotélio induzindo a vasodilatação (40,41).

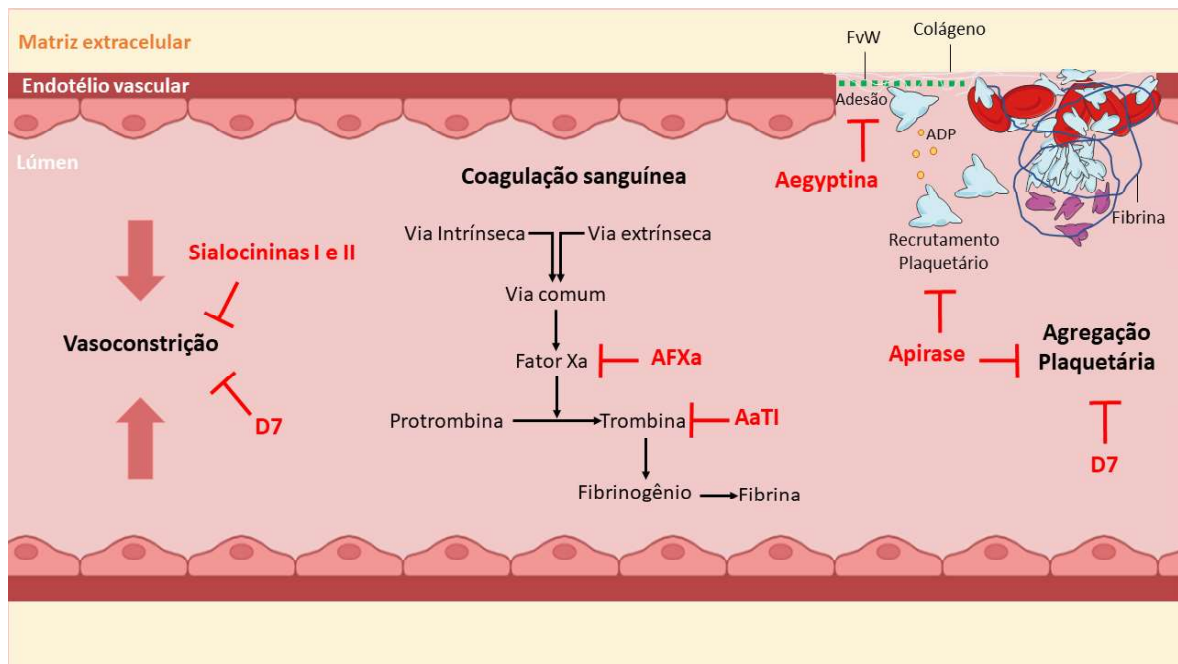


Figura 2 - Atividades anti-hemostáticas da saliva de *Aedes aegypti*. Moléculas presentes na saliva do mosquito (em vermelho), são capazes de inibir os processos de vasoconstrição (1), coagulação sanguínea (2) e agregação plaquetária (3), facilitando o repasto sanguíneo do mosquito. AaTI: *Aedes aegypti trypsin inhibitor*; ADP: adenosina difosfato; AFXa: *Anticoagulant-factor Xa*; FvW: fator de von Willebrand. Fonte: a autora.

1.2.2 Atividade imunomoduladora

Para além de atividades anti-hemostáticas, a saliva de *Ae. aegypti* apresenta ainda moléculas com propriedades imunomoduladoras (Figura 3). Uma das atividades descrita na literatura é a modulação da secreção de citocinas por diferentes tipos celulares *in vitro*. Por exemplo, foi observado que a secreção de TNF- α em monocultura de mastócitos de rato é inibida na presença do extrato da glândula salivar (EGS) de *Ae. aegypti*, sem que a liberação de histamina fosse afetada (42). Além disso, culturas de esplenócitos de camundongos estimuladas com concanavalina A (Con A) na presença do EGS do mosquito produzem menos citocinas IFN- γ e IL-10 (43). Quando células T com receptor transgênico para ovalbumina (OVA) foram estimuladas com essa proteína na presença do EGS, houve forte redução dos níveis de GM-CSF, TNF- α , IL-2 e IFN- γ produzidos, enquanto a diminuição de citocinas como IL-5, IL-4 e IL-10 foi menos acentuada (44). O EGS de *Ae. aegypti* ainda foi capaz de inibir a produção de citocinas como IL-6 e IL-12, além de aumentar a secreção de IL-10 por macrófagos murinos estimulados por LPS e IFN- γ (45). Boa parte das atividades produzidas em

macrófagos pelo EGS do mosquito foram reproduzidas pelo peptídeo chamado AeMOPE-1 (*Aedes-specific modulatory peptide*), que se mostrou capaz de modular a atividade de macrófagos peritoneais murinos estimulados com LPS, reduzindo a produção de IL-6, IL-12p40 e CCL2 sem afetar a produção de TNF- α ou IL-10 (46).

Em culturas de células de baço de camundongos previamente expostos a picadas de *Ae. aegypti*, foi observado aumento da secreção de IL-4 e redução de IFN- γ , sugerindo polarização para um perfil Th2 nessas condições (47). Mais tarde, demonstrou-se que não apenas as picadas, como também a inoculação de EGS em camundongos, podem programar células T CD4⁺ a aumentarem a expressão de IL-4 e, ao mesmo tempo, reduzirem a expressão de TNF- α e IFN- γ , por ação da proteína salivar SAAG-4 (48). De maneira semelhante, a inoculação de sialocinina I em camundongos também foi capaz de regular negativamente a produção de IFN- γ e IL-2 e promover o aumento da produção de citocinas IL-4 e IL-10 por esplenócitos estimulado com Con A. Já injeções de sialocinina II modularam de forma moderada a produção dessas citocinas, parcialmente reduzindo a secreção de IFN- γ e aumentando a de IL-4 (49).

Também foi identificada na saliva de *Ae. aegypti* a presença de adenosina desaminase (ADA). Devido à sua capacidade de degradar adenosina e produzir inosina, foi proposto que esta enzima seria capaz de inibir a desgranulação de mastócitos e a produção de citocinas pró-inflamatórias (50). Observou-se ainda que o EGS do mosquito foi capaz de inibir a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos estimulados por LPS e IFN- γ . Além disso, a capacidade respiratória máxima, bem como as atividades fagocítica e microbicida dos macrófagos também foram prejudicadas pelo EGS (45). Interessantemente, macrófagos estimulados com IL-4 não tiveram a produção de ureia, a expressão de arginase-1 ou do receptor de manose (MRC-1, do inglês *mannose receptor C-type 1*) afetadas pela incubação com EGS (45). As células dendríticas também não foram afetadas pelo EGS do mosquito, uma vez que a sua diferenciação, maturação e função se mantiveram inalteradas na presença do EGS (51).

O EGS de *Ae. aegypti* também demonstrou ser capaz de afetar a proliferação policlonal e antígeno-específica de linfócitos T murinos (43,44). Demonstrou-se ainda que a proliferação de linfócitos em resposta à IL-2 foi suprimida pela

exposição ao EGS, enquanto, a proliferação em resposta à IL-4 foi inibida em menor proporção (52). Os autores sugeriram que essa menor atividade proliferativa poderia estar relacionada à morte de linfócitos (43,44,51).

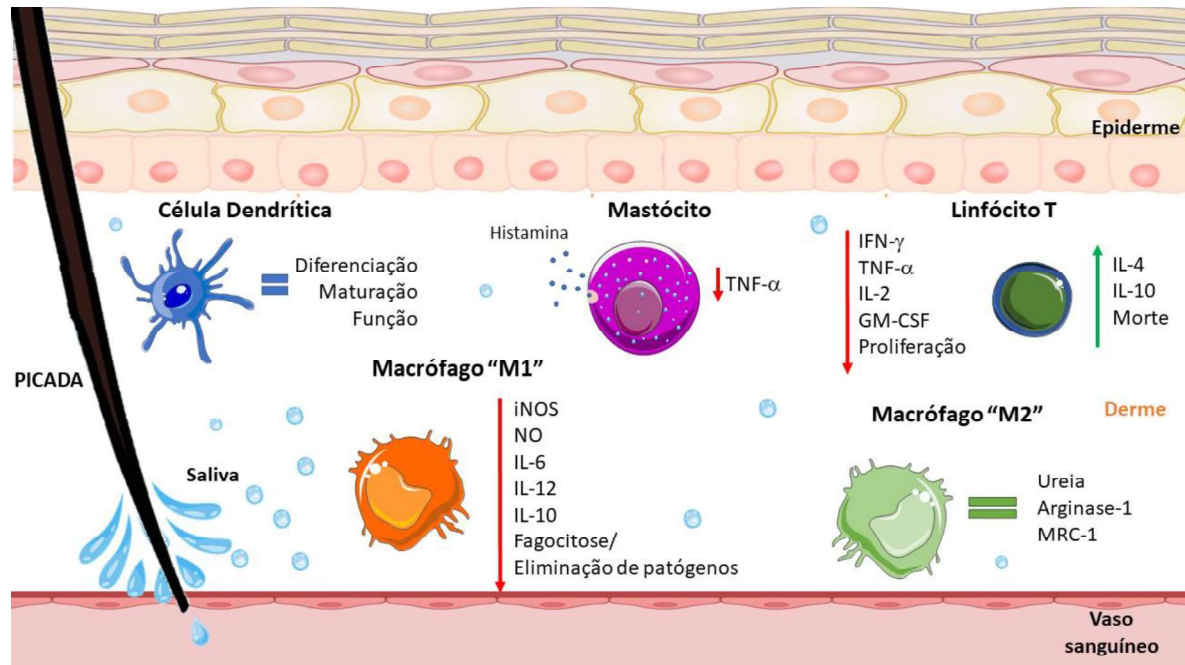


Figura 3 - Atividades imunomoduladoras dos componentes salivares de *Aedes aegypti* no hospedeiro vertebrado. Moléculas presentes na saliva do mosquito são capazes de alterar a atividade de linfócitos, mastócitos e macrófagos classicamente ativados (M1), enquanto parece não afetar células dendríticas ou macrófagos alternativamente ativados (M2). EGS: extrato de glândula salivar; IFN: Interferon; TNF: fator de necrose tumoral; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos; IL: interleucina; iNOS: óxido nítrico sintase induzível; NO: óxido nítrico. Fonte: a autora.

1.2.3 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica da saliva de *Ae. aegypti*, foi descrita inicialmente em 2004, a partir da análise da linfoproliferação de células totais do baço de camundongos *naïve* ou previamente imunizados com OVA. Nesses primeiros ensaios *in vitro*, observou-se que o EGS de *Ae. aegypti* inibiu a proliferação de células T, enquanto o EGS de *Culex quinquefasciatus* não afetou a expansão clonal dessas células. A busca por compreender como os componentes salivares de *Ae. aegypti* seriam capazes de afetar esse processo levou à análise da viabilidade celular, que se mostrou reduzida na presença do EGS desse mosquito (43,44). Mais tarde, foi demonstrado que a atividade citotóxica dos componentes salivares do mosquito parece ocorrer apenas em células de origem linfóide, uma vez que células como macrófagos e células dendríticas se mostraram resistentes ao efeito, mesmo

quando as preparações salivares foram usadas em concentrações até 4 vezes mais altas do que a concentração máxima utilizada nas culturas de linfócitos (45,51). Além disso, a morte celular parece ocorrer especialmente em células *naïve*, visto que, enquanto os linfócitos de animais não sensibilizados se mostraram suscetíveis, parte dos linfócitos provenientes de animais sensibilizados pelas picadas de mosquitos *Ae. aegypti*, *Anopheles aquasalis* ou mesmo por OVA, mostraram-se refratários à ação citotóxica (51).

Dadas as características observadas até então nas células sob ação do EGS, esse processo de morte de linfócitos foi originalmente classificado como apoptose. Apesar disso, apenas alguns parâmetros associados a esse tipo de morte celular foram avaliados (51), cabendo, portanto, uma reavaliação mais detalhada do processo.

1.3 Morte celular

Shen e colaboradores definiram que a morte ocorre quando as células não conseguem manter suas funções vitais fundamentais (53). Presentemente, as modalidades de morte celular são didaticamente divididas em morte celular acidental (ACD, do inglês *accidental cell death*) e morte celular regulada (RCD, do inglês *regulated cell death*). A ACD é compreendida como uma morte não passível de controle, por ocorrer de forma rápida e abrupta, por ação química (p. ex.: variações extremas de pH) ou física (p. ex.: modificações extremas de pressão/temperatura e força de cisalhamento) (54). Já a RCD envolve uma maquinaria complexa e precisa de sinalização, passível de ser controlada por moléculas reguladoras, fisiológica ou farmacologicamente, podendo ocorrer devido à programação de determinantes fisiológicos (morte celular programada) ou ser ativada quando as tentativas de adaptação não são capazes de superar as perturbações do ambiente interno ou externo (54–56). Até o momento, diversos processos de morte estão descritos (Figura 4) e, embora exista uma busca contínua por classificações que sejam mais precisas, os processos envolvidos muitas vezes se interconectam, o que torna difícil a definição exata de uma via de morte celular (57).

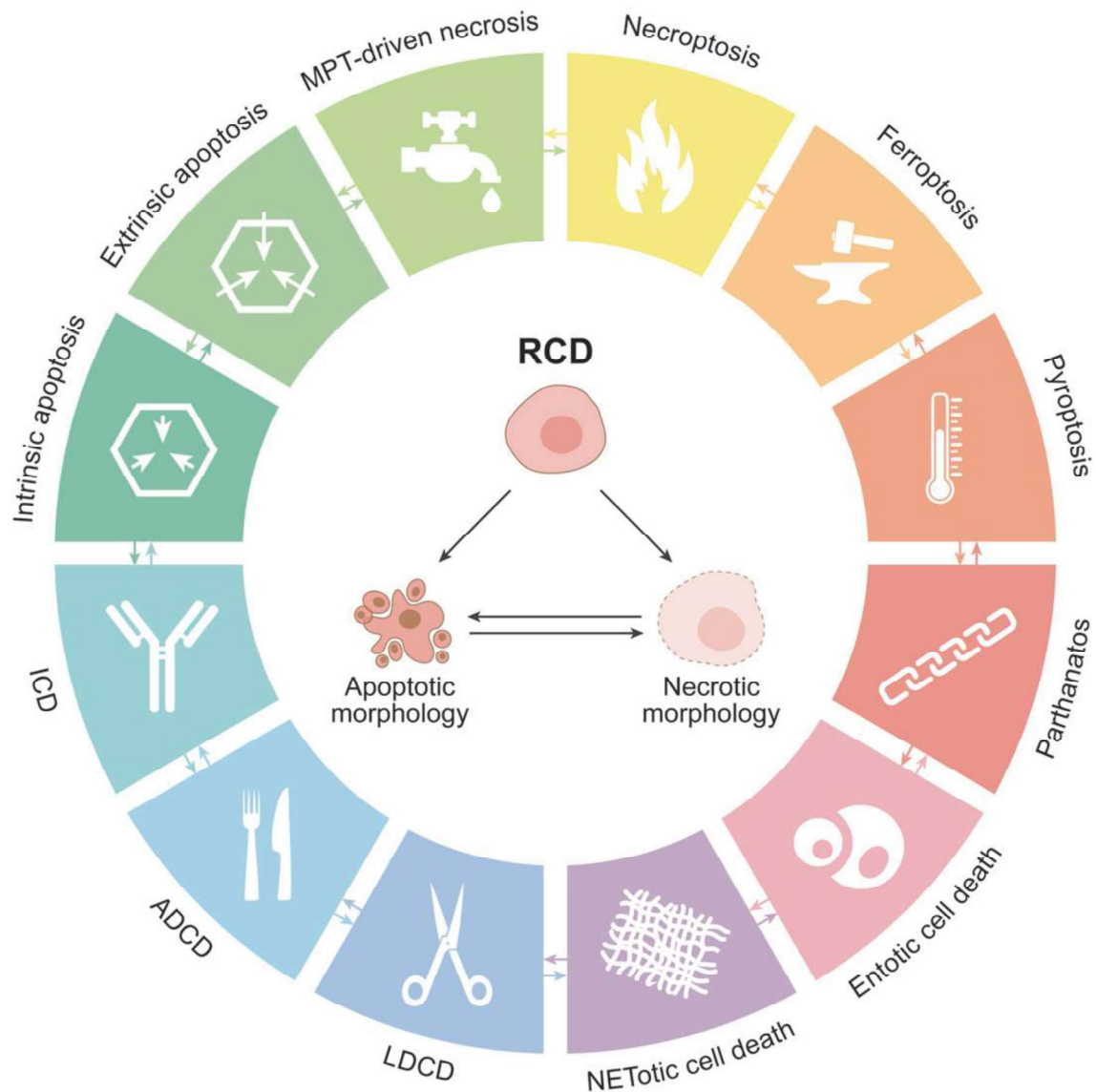


Figura 4 - As muitas maneiras de morrer. Múltiplas sub-rotinas de morte celular programada já foram descritas, as quais se enquadram entre as definições de apoptose e necrose, de acordo com suas características morfológicas, bioquímicas e de imunogenicidade. ADCD: *autophagy-dependent cell death*; ICD: *immunogenic cell death*; LDCD: *lysosome-dependent cell death*, MPT: *mitochondrial permeability transition*; RCD: *regulated cell death*. Fonte: Galluzi et al., 2018

Assim, para garantir a correta classificação e nomenclatura dos processos de morte celular, é necessário que a análise morfológica seja acompanhada de avaliação bioquímica, dos aspectos funcionais e das características imunológicas associadas ao fenômeno em questão (58). Esse refinamento possibilitou, por exemplo, que diversas modalidades de morte celular fossem caracterizadas, detalhando particularidades desses eventos em diferentes contextos (54,59). Aqui, destacamos os processos de apoptose e piroptose.

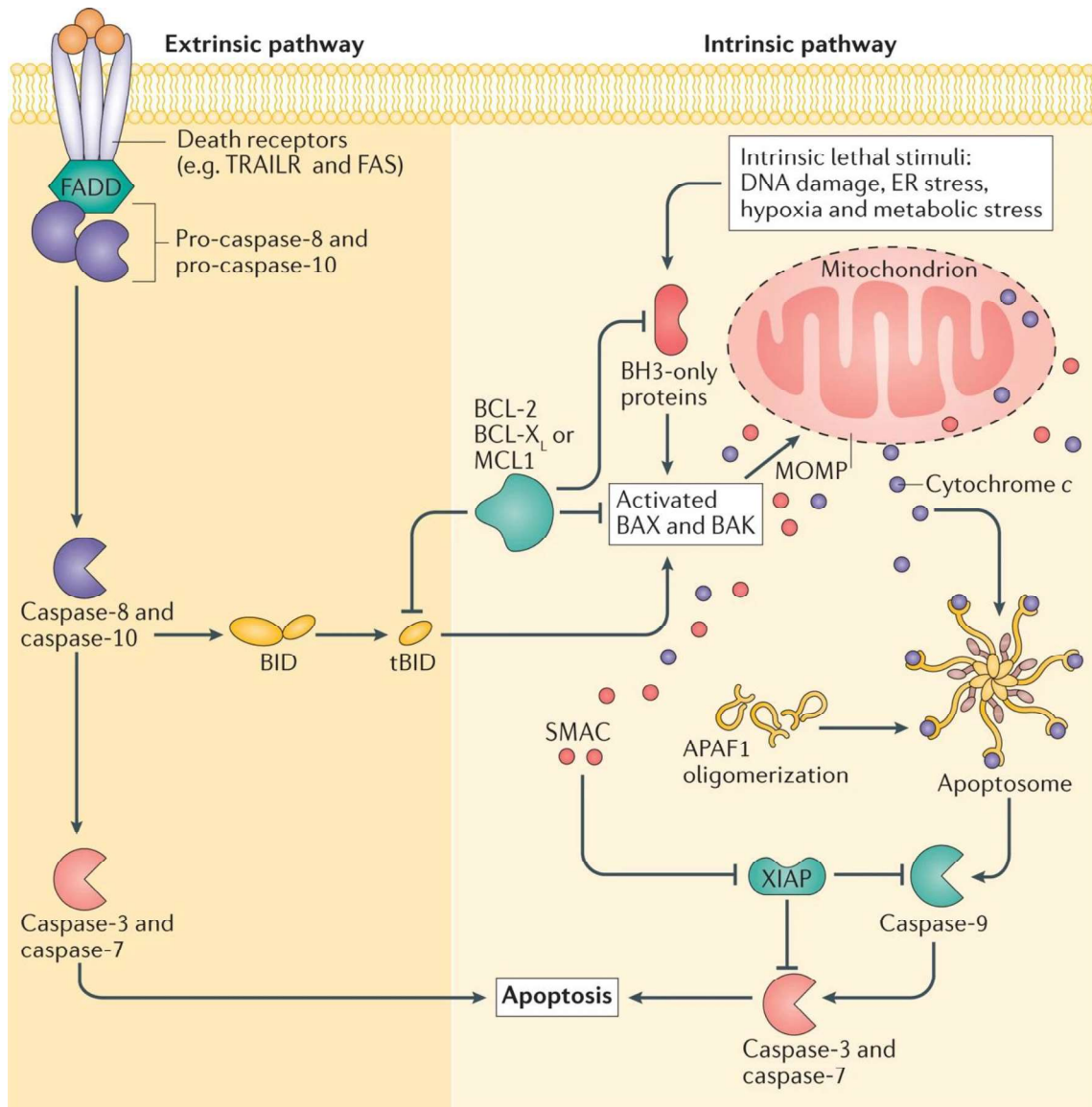
1.3.1 Apoptose

O termo apoptose, cunhado na década de 1970, provém do grego *απόπτωση*: *απο* (*apo*) – de; *πτώση* (*ptósi*) – queda, em alusão à queda sazonal das folhas de uma árvore (60,61). Classicamente conhecida como uma morte celular programada, a apoptose é uma RCD que apresenta características morfológicas que a distinguem, como a diminuição do tamanho da célula (encolhimento), a condensação da cromatina (picnose) e a compactação de organelas. Sem perder a integridade, a membrana plasmática forma bolhas (*blebs*) e expõe fosfatidilserina (PS), normalmente restrita ao folheto interno da bicamada lipídica, na superfície externa da célula. Após a fragmentação nuclear (cariorrexe) as células nesse processo de morte formam ainda corpos apoptóticos, que consistem em porções de membrana celular englobando citoplasma com ou sem fragmentos nucleares (62). Essa via de morte celular, observada durante o desenvolvimento, morfogênese e homeostase tecidual, é acompanhada de uma rápida e eficiente eliminação das células apoptóticas, evitando assim reações inflamatórias significativas e levando a apoptose a ser compreendida como uma morte “silenciosa” (63).

O processo de apoptose é regulado por diferentes mecanismos de acordo com os gatilhos relacionados à sua ativação, que ocorre por duas vias (Figura 5). A via extrínseca pode ser induzida por sinais externos à célula, envolvendo o engajamento de receptores de morte, sendo Fas (CD95), receptor do TNF- α 1 (TNFR1) e receptor de TRAIL-1 (TRAILR1) e 2 (TRAILR2) os mais comuns (64). Esses receptores apresentam domínios citoplasmáticos denominados “domínios de morte”, essenciais na transdução de sinal que desencadeia a morte apoptótica. A interação desses receptores com seus ligantes resulta na adesão de proteínas adaptadoras, como a proteína denominada domínio de morte associada ao Fas (FADD, do inglês *Fas-associated death domain*), que, por sua vez, se associam à pró-caspase 8 (e pró-caspase 10), gerando o complexo de sinalização indutora de morte (DISC, do inglês *death-inducing signaling complex*) (62). Esse complexo é responsável pela clivagem e ativação das pró-caspases em suas formas ativas (caspase-8 e caspase-10), também conhecidas como caspases iniciadoras. Uma vez ativada, caspase-8 pode clivar e ativar Bid, assim como ambas as caspases iniciadoras são capazes de ativar as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7). As caspases efetoras, por sua vez, passam a clivar umas às outras numa cascata

proteolítica amplificadora de ativação. Esse processo acaba por desestruturar de forma irreversível proteínas com atividade quinase, enzimas de reparo de DNA, incluindo proteínas de replicação ou tradução, além das proteínas estruturais (65). A regulação dessa via, inclui FLIPs (do inglês *FLICE-inhibitory proteins*), proteínas inibitórias de FLICE (enzima conversora de IL-1 β do tipo FADD, do inglês *FADD-like IL-1 β converting enzyme*) capazes de interagir com DISC e evitar a ativação da caspase-8 (66).

A via intrínseca da apoptose, ou via mitocondrial, pode ocorrer como consequência do estresse celular ou de danos intrínsecos, ausência de fatores de crescimento ou sobrevivência que suprimem o processo de morte, ou ainda por sinais exógenos como radiação ou toxinas, por exemplo (67). Esse processo constitui um canal de sinalização baseado na permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP, do inglês *mitochondrial outer membrane permeabilization*) e como consequência das alterações de expressão/ativação de membros pró- ou anti-apoptóticos da família Bcl-2. Resumidamente, os estímulos iniciais induzem a ativação de proteínas BH3-*only*, tais como Bid, Bad e Bim, que interagem e ativam as proteínas efetoras Bax e Bak, as quais medeiam a MOMP, promovendo a liberação de proteínas pró-apoptóticas como o citocromo c e Smac (segundo ativador de caspase derivado de mitocôndrias, do inglês *second mitochondria-derived activator of caspase*)/DIABLO (proteína de ligação direta à IAP com baixo ponto isoelétrico do inglês *direct IAP-binding protein with low PI*) (68). O citocromo c interage com o Apaf-1, gerando o apoptossomo, um complexo molecular que recruta a pró-caspase-9, clivando-a em caspase-9 ativa. Esta, por sua vez, é capaz de ativar as caspases efetoras, resultando na fragmentação do DNA, a característica tardia da apoptose (62,69). Proteínas inibidoras de apoptose (IAP, do inglês *inhibitor of apoptosis proteins*), como a XIAP, são capazes de regular negativamente a ação dessas caspases, impedindo a morte celular, enquanto Smac/DIABLO é capaz de bloquear a ação das IAP, promovendo a apoptose intrínseca (70). As vias extrínseca e intrínseca também se comunicam, visto que caspase-8 é capaz de clivar Bid, gerando uma forma truncada (t-Bid) que medeia o dano mitocondrial (71).



Nature Reviews | Cancer

Figura 5 - Vias extrínseca e intrínseca de ativação da apoptose. Na via extrínseca da apoptose, assim que ocorre a ligação aos receptores de morte, proteínas adaptadoras (como a FADD) são capazes de clivar as caspases iniciadoras (caspase-8 e caspase-10). Essas caspases clivam as caspases efetoras (caspase-3 e caspase-7), ativando-as para que finalizem o processo de apoptose. A via intrínseca da apoptose estímulos intrínseco favorecem a ativação da proteína *only* do domínio de homologia BCL-2 (BH3), levando à atividade de BAX e BAK (que pode ser inibido por membros anti-apoptóticos da família BCL-2) que desencadeiam o MOMP. Com a permeabilidade, proteínas pró-apoptóticas (como o citocromo c) são liberadas, as quais, interagindo com APAF1, montam o apoptossomo, que cliva caspase-9. A caspase-9 ativa, por sua vez, ativa a caspase-3 e a caspase-7, levando à apoptose. ER: Retículo endoplasmático; FADD: *Fas associated death domain*; MOMP: *mitochondrial outer membrane permeabilization*; SMAC: *second mitochondria-derived activator of caspase*; XIAP: *X-linked inhibitor of apoptosis protein*. Fonte: Ichim & Tait, 2016.

1.3.2 Piroptose

Relativamente novo no cenário científico, o termo piroptose [do grego *πυρόπτιση*: *pyro* (*πυρο*) – fogo; *πτύση* (*ptósi*) - queda] foi cunhado por Cookson e Brennan em 2001, para descrever um processo de morte celular regulado e pró-inflamatório observado em macrófagos infectados por *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* (72,73). Apesar disso, a piroptose já havia sido observada em macrófagos infectados com *Shigella flexneri*, que morriam por um mecanismo dependente da ação de caspase-1 (74,75).

Assim como na apoptose, na piroptose também se observa picnose e fragmentação do DNA. Uma característica única da piroptose, porém, é a formação de poros na membrana plasmática, que altera a permeabilidade celular, permitindo entrada de água e promovendo edema celular e lise osmótica (76). A piroptose pode ser desencadeada por diferentes estímulos, especialmente relacionados à infecção ou estresse; o padrão reconhecido e, conseqüentemente, o receptor que o reconhece, determinam a via piroptótica a se desenvolver (Figura 6) (77). Na via canônica há o envolvimento dos chamados inflamassomas, complexos multiproteicos compostos, normalmente, por um receptor de reconhecimento de padrão citosólico (p.ex.: NLRs, do inglês *NOD-like receptors*), a proteína adaptadora ASC [proteína *speck-like* associada à apoptose com domínio de recrutamento e ativação de caspase - do inglês, *apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (caspase activation and recruitment domains)*] e a pró-caspase-1 (78). Após a montagem, os inflamassomas promovem a clivagem e ativação da pró-caspase-1 em caspase-1, que cliva a proteína executora gasdermina D (GSDMD) em componentes C- e N-terminais; os domínios N-terminais se ancoram à membrana plasmática para formar poros celulares não seletivos, que culminam na morte celular lítica. A caspase-1 também é responsável pela clivagem das proformas de IL-1 β e IL-18 em citocinas maduras que são liberadas pelos poros de GSDMD (76,79).

Alternativamente, a piroptose pode ser induzida pela via não canônica através da detecção intracelular de LPS no citosol. Esse reconhecimento induz a ativação das caspases 4 e 5 (caspase-11 em camundongos) que clivam GSDMD de forma semelhante à caspase-1. As caspases 4, 5 e 11 ativas não possuem, no entanto, capacidade de ativar a forma madura de IL-1 e IL-18, mas podem interagir com a via canônica (80,81).

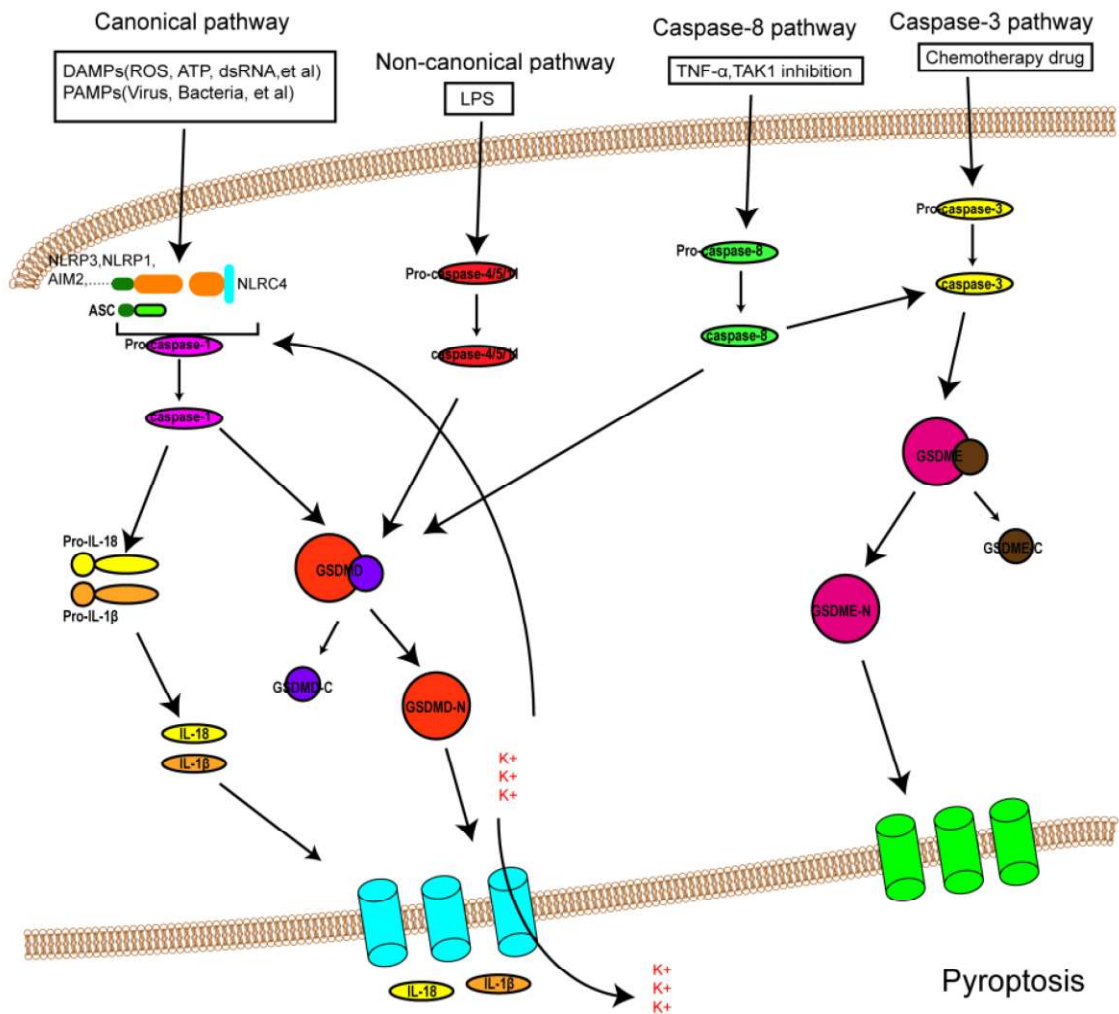


Figura 6 - Vias de ativação da piroptose. Na via canônica, PRRs reconhecem PAMPs e DAMPs e se unem com pró-caspase-1 e ASC para formar inflamassomas, que resultam em caspase-1 ativa. Uma vez ativada, caspase-1 é capaz de clivar GSDMD promovendo a formação de poros não seletivos na membrana plasmática, pelo qual são liberadas as IL-1 e IL-18, previamente clivadas pela caspase-1 ativa. Os poros de GSDMD causando ainda influxo de água, gerando inchaço e ruptura celular. Na via não canônica, o LPS ativa as caspase-4 e 5 (e caspase-11), desencadeando a piroptose pela clivagem do GSDMD. Além disso, a clivagem do GSDMD resulta no efluxo de K^+ , dando origem à montagem de um inflamassoma NLRP3. Na via mediada pela caspase-3, a caspase-3 ativa cliva o GSDME, induzindo formação de poros e o desencadeamento da piroptose. Na via mediada pela caspase-8, a inibição da TAK1 induz a ativação da caspase-8, que cliva GSDMD ou GSDME, os quais formam poros na membrana. Caspase-8 pode ainda clivar caspase-3, levando à ativação da via mediada por essa caspase, que também resulta em piroptose. DAMPs: Damage-associated molecular pattern; GSDMD: *gasdemin D*; GSDME: *gasdermin E*; PAMPs: *Pathogen-associated molecular pattern*. Fonte: Zheng et al., 2022.

Mais recentemente, demonstrou-se que caspase-3, classicamente associada à apoptose, é também capaz de clivar gasdermina E (GSDME) por ação de drogas quimioterápicas ou $TNF-\alpha$ (82). Essa clivagem dá origem a um domínio N-terminal capaz de se ligar à membrana plasmática e formar poros de GSDME, os quais

induzem piroptose de forma semelhantes aos poros de GSDMD (83). Descobriu-se ainda que a inibição de TAK1 (quinase-1 ativada por TGF- β , do inglês *TGF- β -activated kinase 1*) mediada por YopJ, um fator de virulência de bactérias do gênero *Yersinia*, induz a clivagem de GSDMD por ativação de caspase-8 (84). Essa atividade, descrita em macrófagos infectados com *Yersinia pestis*, leva à formação de poros de GSDMD, que induzem a morte por piroptose, induzindo uma resposta inflamatória (85).

1.4 Eferocitose

Os fagócitos especializados, como macrófagos e células dendríticas, são responsáveis pelo englobamento de células mortas ou em processo de morte, mecanismo definido como eferocitose. O termo, derivado do latim *effere*, significa “levar para o túmulo” e foi originalmente definido para o englobamento de células apoptóticas (86). Contudo, esse conceito foi expandido para abranger a remoção de células mortas por outras vias. Durante a eferocitose, células em processo de morte apresentam sinais conhecidos como “*find me*” (algo como “encontre-me”) através da secreção de quimiocinas, que atraem os fagócitos para o local e exibem sinais “*catch me*” e “*eat me*” (“pegue-me” e “coma-me”, respectivamente) para seu reconhecimento, como por exemplo a PS, integrinas e outras moléculas que são reconhecidas por receptores das células fagocíticas (87–89).

A eferocitose pode desencadear papéis antagônicos dependendo da fonte de células mortas gerada no microambiente. A fagocitose de células estéreis (não infectadas), por exemplo, pode levar a ativação de mecanismos intracelulares que resultam em uma mudança no fenótipo de macrófagos levando a uma alteração do perfil pró-inflamatório M1 para um fenótipo anti-inflamatório/regulador M2, resultando na produção de citocinas como TGF- β e IL-10 e inibição da produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β (90). Além disso, células dendríticas que fagocitam células apoptóticas podem induzir a geração de células T reguladoras e produção de IL-10 (91).

Por outro lado, a fagocitose de células em processo de morte infectadas por determinados patógenos pode resultar na destruição desses microrganismos junto com as células mortas fagocitadas (atividade antimicrobiana), como no caso do englobamento de células infectadas pelo vírus Influenza, onde a fagocitose promove

a destruição desses patógenos juntamente com as células apoptóticas (92,93). Há, no entanto, alguns patógenos que são resistentes a esse processo e podem usar a eferocitose para se dispersar em novas células hospedeiras ou tecidos (processo conhecido como “cavalo de Tróia”). Por exemplo, o protozoário *Leishmania major*, transmitido pela picada de flebótomos, provoca o recrutamento de neutrófilos que são rapidamente infectados e acabam sofrendo apoptose; macrófagos recrutados fagocitam essas células em processo de morte, porém, não são capazes de promover a morte do parasita, que se utiliza do macrófago como célula hospedeira final para sua multiplicação (94). Além do efeito “cavalo de Tróia” já ter sido descrito para diversos vírus como o Zika vírus, vírus do Nilo ocidental e HIV, por exemplo (95–97), outros microrganismos, como *Coxiella burnetii* e *Trypanosoma cruzi* também são capazes de utilizar o ambiente anti-inflamatório causado pela eferocitose para facilitar sua transmissão e estabelecer uma infecção no hospedeiro (98,99).

7 CONCLUSÕES

- O EGS de *Ae. aegypti* induz morte de linfócitos pela ação de moléculas maiores de 100 kDa, suscetíveis à perda de função por desnaturação;
- A exposição de PS induzida pelo EGS ocorre independentemente da ativação de caspases;
- A citotoxicidade de EGS é dependente de caspase-3;
- A sensibilidade de células T e B aos componentes celulares é diferente: células T perdem a estrutura celular, liberando LDH, enquanto células B não perdem estrutura celular nem liberam LDH;
- A morte induzida por EGS não induz liberação de IL-1 β , nem é dependente de caspase-1 ou GSDMD;
- A fagocitose de células mortas por EGS não estimula a maturação de células dendríticas nem induz fenótipo pró-inflamatório nessas células.

REFERÊNCIAS

1. Harbach RE. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. **Zootaxa** [Internet]. 2007;1668(1):591–638. Available from: <https://www.biotaxa.org/Zootaxa/article/view/zootaxa.1668.1.28>
2. Carvajal-Lago L, Ruiz-López MJ, Figuerola J, Martínez-de la Puente J. Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. **Environ Res**. 2021;195(1–10).
3. Strickman D, Linton Y-M, Wilkerson RC. Mosquito Diversity, Systematics, and Medical Importance. In: **Mosquitoes of the World** [Internet]. Johns Hopkins University Press; 2021. p. 352. Available from: <https://muse.jhu.edu/book/79680>
4. Carpenter SJ, LaCasse WJ. **Mosquitoes of North America** (North of Mexico) [Reprinted in: University of California Press, 1974]. 1955. 495 p.
5. Strickman D, Linton Y-M, Wilkerson RC. Biology of Mosquitos. In: **Mosquitoes of the World**. 2021. p. 352.
6. Christophers SR. **Aedes Aegypti: The Yellow Fever Mosquito**. Cambridge University Press. 1960. 750 p.
7. Tabachnick WJ. Evolutionary Genetics and Arthropod-borne Disease: The Yellow Fever Mosquito. **Am Entomol** [Internet]. 1991;37(1):14–26. Available from: <https://academic.oup.com/ae/article-lookup/doi/10.1093/ae/37.1.14>
8. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*-a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 2013;108(10):11–7.
9. Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQN, Shearer FM, Barker CM, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus*. **eLife**. 2015;4(6):1–18.
10. Kuno G. The absence of yellow fever in Asia: History, hypotheses, vector dispersal, possibility of YF in Asia, and other enigmas. **Viruses**. 2020;12(12):1–39.
11. Weaver SC, Charlier C, Vasilakis N, Lecuit M. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. **Annu Rev Med**. 2018;69:395–408.
12. Wilder-Smith A, Ooi EE, Vasudevan SG, Gubler DJ. Update on dengue: Epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine development. **Curr Infect Dis Rep**. 2010;12(3):157–64.

13. Burt FJ, Rolph MS, Rulli NE, Mahalingam S, Heise MT. Chikungunya: A re-emerging virus. **Lancet** [Internet]. 2012;379(9816):662–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60281-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60281-X)
14. Musso D, Gubler DJ. Zika Virus. **Clin Microbiol Rev** [Internet]. 2016 Jul;29(3):487–524. Available from: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/CMR.00072-15>
15. Wint W, Jones P, Kraemer M, Alexander N, Schaffner F. Past, present and future distribution of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*: The European paradox. **Sci Total Environ** [Internet]. 2022;847(April):157566. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.157566>
16. Yu X, Cheng G. Contribution of phylogenetics to understanding the evolution and epidemiology of dengue virus. **Anim Model Exp Med**. 2022;5(5):410–7.
17. Ross R. On some peculiar pigmented cells found in two mosquitos fed on malarial blood. **Br Med J**. 1897;2(1929):1786–8.
18. Consoli RAGB, Oliveira RL de. **Mosquitos de importância sanitária do Brasil**. Editora FIOCRUZ; 1994. 228 p.
19. Griffiths RB, Gordon RM. An apparatus which enables the process of feeding by mosquitoes to be observed in the tissues of a live rodent; together with an account of the ejection of saliva and its significance in malaria. **Ann Trop Med Parasitol**. 1952;46(4):311–9.
20. Hudson A, Bowman L, Orr CW. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. **Science**. 1960;131:1730–1.
21. Foster WA. Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics. **Annu Rev Entomol** [Internet]. 1995 Jan;40(1):443–74. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.en.40.010195.002303>
22. Barredo E, DeGennaro M. Not Just from Blood: Mosquito Nutrient Acquisition from Nectar Sources. **Trends Parasitol** [Internet]. 2020;36(5):473–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.02.003>
23. Briegel H, Hefti M, DiMarco E. Lipid metabolism during sequential gonotrophic cycles in large and small female *Aedes aegypti*. **J Insect Physiol**. 2002;48(5):547–54.
24. Harrington LC, Edman JD, Scott TW. Why do female *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) feed preferentially and frequently on human blood? **J Med Entomol**. 2001;38(3):411–22.

25. Ribeiro JMC, Martin-Martin I, Arcá B, Calvo E. A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes. **PLoS One**. 2016;11(3):1–20.
26. Demarta-Gatsi C, Mécheri S. Vector saliva controlled inflammatory response of the host may represent the Achilles heel during pathogen transmission. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. 2021;27(5):1–17.
27. Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu Rev Entomol**. 1987;32(92):463–78.
28. Ribeiro JMC, Francischetti IMB. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annu Rev Entomol**. 2003;48:73–88.
29. Stark KR, James AA. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp Parasitol**. 1995;81(3):321–31.
30. Stark KR, James AA. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J Biol Chem**. 1998;273(33):20802–9.
31. Watanabe RMO, Soares TS, Morais-Zani K, Tanaka-Azevedo AM, Maciel C, Capurro ML, et al. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity. **Biochimie** [Internet]. 2010;92(8):933–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.03.024>
32. Watanabe RMO, Tanaka-Azevedo AM, Araujo MS, Juliano MA, Tanaka AS. Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity. **Biochimie** [Internet]. 2011;93(3):618–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.12.006>
33. Ribeiro JMC, Sarkis JJF, Rossignol PA, Spielman A. Salivary apyrase of *Aedes Aegypti*: Characterization and secretory fate. **Comp Biochem Physiol**. 1984;79(1):81–6.
34. Champagne DE, Smartt CT, Ribeiro JMC, James AA. 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**. 1995;92(3):694–8.
35. James AA, Blackmer K, Marinotti O, Ghosn CR, Racioppi J V. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol Biochem Parasitol**. 1991;44(2):245–53.
36. Calvo E, Mans BJ, Andersen JF, Ribeiro JMC. Function and evolution of a

- mosquito salivary protein family. **J Biol Chem**. 2006;281(4):1935–42.
37. Calvo E, Tokumasu F, Marinotti O, Villeval J, Ribeiro JMC, Francischetti IMB. 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** [Internet]. 2007 Sep 14;282(37):26928–38. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M705669200>
 38. Calvo E, Tokumasu F, Mizurini DM, McPhie P, Narum DL, Ribeiro JMC, et al. Aegyptin displays high-affinity for the von Willebrand factor binding site (RGQOGVMGF) in collagen and inhibits carotid thrombus formation in vivo. **FEBS J**. 2010;277(2):413–27.
 39. Chagas AC, Ramirez JL, Jasinskiene N, James AA, Ribeiro JMC, Marinotti O, 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**. 2014;111(19):6946–51.
 40. Ribeiro JM. Characterization of a vasodilator from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **J Exp Biol** [Internet]. 1992 Apr;165(9):61–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1375258>
 41. Champagne DE, Ribeiro JMC. Sialokinin I and II: Vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1994;91(1):138–42.
 42. Bissonnette EY, Rossignol PA, Befus DA. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumor necrosis factor alpha. **Parasite Immunol**. 1993;15(July):27–33.
 43. Wanasen N, Nussenzveig RH, Champagne DE, Soong L, Higgs S. Differential modulation of murine host immune response by salivary gland extracts from the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Med Vet Entomol**. 2004;18(2):191–9.
 44. Wasserman HA, Singh S, Champagne DE. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. **Parasite Immunol**. 2004;26(6–7):295–306.
 45. Barros MS, Lara PG, Fonseca MT, Moretti EH, Filgueiras LR, Martins JO, et al. *Aedes aegypti* saliva impairs M1-associated proinflammatory phenotype without promoting or affecting M2 polarization of murine macrophages. **Parasites and Vectors**. 2019;12(1):1–15.
 46. Lara PG, Esteves E, Sales-Campos H, Assis JB, Henrique MO, Barros MS, et

- al. AeMOPE-1, a Novel Salivary Peptide From *Aedes aegypti*, Selectively Modulates Activation of Murine Macrophages and Ameliorates Experimental Colitis. **Front Immunol.** 2021;12(7):1–15.
47. Chen YL, Simons FER, Peng Z. A mouse model of mosquito allergy for study of antigen-specific IgE and IgG subclass responses, lymphocyte proliferation, and IL-4 and IFN- γ production. **Int Arch Allergy Immunol.** 1998;116(4):269–77.
 48. Boppana VD, Thangamani S, Adler AJ, Wikel SK. SAAG-4 is a novel mosquito salivary protein that programmes host CD4+ T cells to express IL-4. **Parasite Immunol.** 2009;31(6):287–95.
 49. Zeidner NS, Higgs S, Happ CM, Beaty BJ, Miller BR. 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.** 1999;21(1):35–44.
 50. Ribeiro JMC, Charlab R, Valenzuela JG. The salivary adenosine deaminase activity of the mosquitoes *Culex quinquefasciatus* and *Aedes Aegypti*. **J Exp Biol.** 2001;204(11):2001–10.
 51. Bizzarro B, Barros MS, Maclel C, Gueroni DI, Lino CN, Campopiano J, et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on dendritic cell and lymphocyte biology. **Parasites and Vectors.** 2013;6(1):1–13.
 52. Cross ML, Cupp EW, Enriquez FJ. Differential Modulation of Murine Cellular Immune Responses by Salivary Gland Extract of *Aedes aegypti*. **Am J Trop Med Hyg.** 1994;51(5):690–6.
 53. Shen S, Shao Y, Li C. Different types of cell death and their shift in shaping disease. **Cell Death Discov.** 2023;9(1):1–12.
 54. Galluzzi L, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, Agostinis P, et al. Molecular mechanisms of cell death: Recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. **Cell Death Differ.** 2018;25(3):486–541.
 55. Tang D, Kang R, Berghe T Vanden, Vandenabeele P. The molecular machinery of regulated cell death. **Cell Res** [Internet]. 2019;29(1):347–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>
 56. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Vitale I, Aaronson SA, Abrams JM, Adam D, et al. Essential versus accessory aspects of cell death: Recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death Differ.** 2015;22(1):58–73.

57. Green DR, Llambi F. Cell death signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol.** 2015;7(12):1–24.
58. Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, et al. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. **Cell Death Differ.** 2007;14:1237–43.
59. Liu X, Yang W, Guan Z, Yu W, Fan B, Xu N, et al. There are only four basic modes of cell death, although there are many ad-hoc variants adapted to different situations. **Cell Biosci** [Internet]. 2018;8(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s13578-018-0206-6>
60. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer.** 1972;26:239–57.
61. Duque-Parra JE. Note on the Origin and History of the Term “ Apoptosis .” **Anat Rec.** 2005;2–4.
62. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathol.** 2007;35(4):495–516.
63. Pérez-Garijo A, Steller H. Spreading the word: non-autonomous effects of apoptosis during development, regeneration and disease. **Development.** 2015;142:3253–62.
64. Fulda S, Debatin K. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. **Oncogene.** 2006;25:4798–811.
65. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: Tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer.** 2002;2(4):277–88.
66. Krueger A, Baumann S, Krammer PH, Kirchhoff S. FLICE-Inhibitory Proteins: Regulators of Death Receptor-Mediated Apoptosis. **Mol Cell Biol.** 2001;21(24):8247–54.
67. Wang Z, Figueiredo-Pereira C, Oudot C, Vieira HL., Brenner C. Mitochondrion: A Common Organelle for Distinct Cell Deaths ? In: **International Review of Cell and Molecular Biology** [Internet]. 1st ed. Elsevier Inc.; 2017. p. 245–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.ircmb.2016.09.010>
68. Peña-Blanco A, García-Sáez AJ. Bax , Bak and beyond—mitochondrial performance in apoptosis. **FEBS J.** 2018;285:416–31.
69. Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. **Trends Cell Biol.** 2000;10(9):369–77.

70. Yang YL, Li XM. The IAP family: endogenous caspase inhibitors with multiple biological activities. **Cell Res**. 2000;169–77.
71. Ichim G, Tait SWG. A fate worse than death: Apoptosis as an oncogenic process. **Nat Rev Cancer** [Internet]. 2016;16(8):539–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrc.2016.58>
72. Brennan MA, Cookson BT. Salmonella induces macrophage death by caspase-1-dependent necrosis. **Mol Microbiol**. 2000;38:31–40.
73. Cookson BT, Brennan MA. Pro-inflammatory programmed cell death. **TRENDS Microbiol**. 2001;9(3):113–4.
74. Chen Y, Smith MR, Thirumalai K, Zychlinsky A. A bacterial invasin induces macrophage apoptosis by binding directly to ICE. **EMBO J**. 1996;15(15):3853–60.
75. Hersh D, Monack DM, Smith MR, Ghorri N, Falkow S, Zychlinsky A. The Salmonella invasin SipB induces macrophage apoptosis by binding to caspase-1. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1999;96(5):2396–401.
76. Yu P, Zhang X, Liu N, Tang L, Peng C, Chen X. Pyroptosis: mechanisms and diseases. **Signal Transduct Target Ther** [Internet]. 2021;6(128):1–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00507-5>
77. Kepp O, Galluzzi L, Zitvogel L. Pyroptosis—a cell death modality of its kind? **Eur J Immunol**. 2010;40:627–30.
78. Zoete MR De, Palm NW, Zhu S, Flavell RA. Inflammasomes. **Cold Spring Harb Perspect Bio**. 2014;6:1–22.
79. Huang Y, Xu W, Zhou R. NLRP3 inflammasome activation and cell death. **Cell Mol Immunol** [Internet]. 2021;1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41423-021-00740-6>
80. Man SM, Karki R, Kanneganti T. Molecular mechanisms and functions of pyroptosis, inflammatory caspases and inflammasomes in infectious diseases. **Immunol Rev**. 2018;277(1):61–75.
81. Guo R, Wang H, Cui N. Autophagy Regulation on Pyroptosis : Mechanism and Medical Implication in Sepsis. **Mediators Inflamm**. 2021;21:1–11.
82. Wang Y, Gao W, Shi X, Ding J, Liu W, He H, et al. Chemotherapy drugs induce pyroptosis through caspase-3 cleavage of a gasdermin. **Nature** [Internet]. 2017;547(7661):99–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature22393>

83. Li J, Chen L, Zhou C, Bai Y, Zhao R, Zhang J, et al. Insight to Pyroptosis in Viral Infectious Diseases. **Health** (Irvine Calif). 2021;13(05):574–90.
84. Orning P, Weng D, Starheim K, Ratner D, Best Z, Lee B, et al. Pathogen blockade of TAK1 triggers caspase-8–dependent cleavage of gasdermin D and cell death. **Science**. 2018;362(6418):1064–9.
85. Zheng Y, Xu X, Chi F, Cong N. Pyroptosis: A Newly Discovered Therapeutic Target for Ischemia-Reperfusion Injury. **Biomolecules**. 2022;12(11):1–14.
86. Hayat SMG, Bianconi V, Pirro M, Sahebkar A. Efferocytosis: molecular mechanisms and pathophysiological perspectives. **Immunol Cell Biol**. 2019;124–33.
87. Martin CJ, Peters KN, Behar SM. Macrophages Clean Up: Efferocytosis and Microbial Control The Many Jobs of the Macrophage. **Curr Opin Microbiol** [Internet]. 2014;0:17–23. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3942671/pdf/nihms540889.pdf>
88. Segawa K, Nagata S. An Apoptotic “Eat Me” Signal: Phosphatidylserine Exposure. **Trends Cell Biol** [Internet]. 2015;25(11):639–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tcb.2015.08.003>
89. Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: Table for two. **Cell Death Differ** [Internet]. 2016;23(6):915–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2015.172>
90. Headland SE, Norling L V. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol** [Internet]. 2015;27(3):149–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2015.03.014>
91. Chung EY, Sun JK, Xiao JM. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells. **Cell Res**. 2006;16(2):154–61.
92. Fujimoto I, Pan J, Takizawa T, Nakanishi Y. Virus Clearance through Apoptosis-Dependent Phagocytosis of Influenza A Virus-Infected Cells by Macrophages. **J Virol**. 2000;74(7):3399–403.
93. Shiratsuchi A, Kaido M, Takizawa T, Nakanishi Y. Phosphatidylserine-Mediated Phagocytosis of Influenza A Virus-Infected Cells by Mouse Peritoneal Macrophages. **J Virol**. 2000;74(19):9240–4.
94. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for Leishmania Entry into Macrophages . **J Immunol**. 2004;173(11):6521–5.

95. Anderson DJ, Politch JA, Nadolski AM, Blaskewicz CD, Pudney J, Mayer KH. Targeting trojan horse leukocytes for HIV prevention. **Aids**. 2010;24(2):163–87.
96. Suen WW, Prow NA, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. Mechanism of west nile virus neuroinvasion: A critical appraisal. **Viruses**. 2014;6(7):2796–825.
97. Aggio JB, Porto BN, Duarte dos Santos CN, Mosimann ALP, Wowk PF. Human Neutrophils Present Mild Activation by Zika Virus But Reduce the Infection of Susceptible Cells. **Front Immunol**. 2022;13:1–18.
98. Freire-De-Lima CG, Nascimento DO, Soares MBP, Bozza PT, Castro-Faria-Neto HC, De Mello FG, et al. Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. **Nature**. 2000;403(6766):199–203.
99. Zamboni DS, Rabinovitch M. Phagocytosis of Apoptotic Cells Increases the Susceptibility of Macrophages to Infection with *Coxiella burnetii* Phase II Through Down-Modulation of Nitric Oxide Production. **Infect Immun**. 2004;72(4):2075–80.
100. Mellink JJ, Zeben MS V. Age related differences of saliva composition in *Aedes aegypti*. **Mosq News**. 1976;36(3):247–50.
101. Wasinpiyamongkol L, Patramool S, Luplertlop N, Surasombatpattana P, Doucoure S, Mouchet F, et al. Blood-feeding and immunogenic *Aedes aegypti* saliva proteins. **Proteomics**. 2010;10(10):1906–16.
102. Chowdhury A, Modahl CM, Missé D, Kini RM, Pompon J. High resolution proteomics of *Aedes aegypti* salivary glands infected with either dengue, Zika or chikungunya viruses identify new virus specific and broad antiviral factors. **Sci Rep** [Internet]. 2021;11(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03211-0>
103. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. **J Immunol Methods**. 1995;184:39–51.
104. Van Engeland M, Nieland LJW, Ramaekers FCS, Schutte B, Reutelingsperger CPM. Annexin V-affinity assay: A review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. **Cytometry**. 1998;31(1):1–9.
105. Sims PJ, Wiedmer T. Unraveling the mysteries of phospholipid scrambling. **Thromb Haemost**. 2001;86(1):266–75.

106. Nagata S, Suzuki J, Segawa K, Fujii T. Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. **Cell Death Differ**. 2016;23(6):952–61.
107. Argañaraz GA, Palmeira J da F, Argañaraz ER. Phosphatidylserine inside out: a possible underlying mechanism in the inflammation and coagulation abnormalities of COVID-19. **Cell Commun Signal** [Internet]. 2020;18(1):1–10. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-020-00687-7>
108. Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, et al. Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. **Cytometry**. 1992;13(8):795–808.
109. Koopman G, Reutelingsperger CPM, Kuijten GAM, Keehnen RMJ, Pals ST, Van Oers MHJ. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. **Blood** [Internet]. 1994;84(5):1415–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood.V84.5.1415.1415>
110. Perfetto SP, Chattopadhyay PK, Lamoreaux L, Nguyen R, Ambrozak D, Koup RA, et al. Amine-reactive dyes for dead cell discrimination in fixed samples. **Curr Protoc Cytom**. 2010;(SUPPL. 53):1–14.
111. Zembruski NCL, Stache V, Haefeli WE, Weiss J. 7-Aminoactinomycin D for apoptosis staining in flow cytometry. **Anal Biochem** [Internet]. 2012;429(1):79–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2012.07.005>
112. Sauvat A, Wang Y, Segura F, Spaggiari S, Müller K, Zhou H, et al. Quantification of cellular viability by automated microscopy and flow cytometry. **Oncotarget**. 2015;6(11):9467–75.
113. Dillon SR, Mancini M, Rosen A, Schlissel MS. Annexin V Binds to Viable B Cells and Colocalizes with a Marker of Lipid Rafts upon B Cell Receptor Activation. **J Immunol**. 2000;164(3):1322–32.
114. Kato N, Nakanishi M, Hirashima N. Transbilayer asymmetry of phospholipids in the plasma membrane regulates exocytotic release in mast cells. **Biochemistry**. 2002;41(25):8068–74.
115. Fischer K, Voelkl S, Berger J, Andreesen R, Pomorski T, Mackensen A. Antigen recognition induces phosphatidylserine exposure on the cell surface of human CD8+ T cells. **Blood** [Internet]. 2006;108(13):4094–101. Available from: <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2006-03-011742>
116. Hammill AK, Uhr JW, Scheuermann RH. Annexin V staining due to loss of membrane asymmetry can be reversible and precede commitment to apoptotic death. **Exp Cell Res**. 1999;251(1):16–21.

117. Calianese D, Kreiss T, Kasikara C, Davra V, Lahey KC, Gadiyar V, et al. Phosphatidylserine-Targeting Monoclonal Antibodies Exhibit Distinct Biochemical and Cellular Effects on Anti-CD3/CD28–Stimulated T Cell IFN- γ and TNF- α Production. **J Immunol** [Internet]. 2021;207(2):436–48. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.2000763>
118. Fietta P. Many ways to die: passive and active cell death styles. **Riv Biol.** 2006;99(1):69–83.
119. Chen X, He WT, Hu L, Li J, Fang Y, Wang X, et al. Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis. **Cell Res** [Internet]. 2016;26(9):1007–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2016.100>
120. Meggio F, Deana AD, Ruzzene M, Brunati AM, Cesaro L, Guerra B, et al. Different Susceptibility of Protein Kinases to Staurosporine Inhibition: Kinetic Studies and Molecular Bases for the Resistance of Protein Kinase CK2. **Eur J Biochem.** 1995;234(1):317–22.
121. Chae HJ, Kang JS, Byun JO, Han KS, Kim DU, Oh SM, et al. Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts. **Pharmacol Res.** 2000;42(4):373–81.
122. Stepczynska A, Lauber K, Engels IH, Janssen O, Kabelitz D, Wesselborg S, et al. Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. **Oncogene.** 2001;20(10):1193–202.
123. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Staurosporine-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: A distinction between caspase-3-dependent steps of apoptosis and the critical lethal lesions. **Exp Cell Res.** 2003;283(2):135–45.
124. He M-X, He Y-W. c-FLIP Protects T Lymphocytes from Apoptosis in the Intrinsic Pathway. **J Immunol** [Internet]. 2015;194(7):3444–51. Available from: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1400469>
125. McKeague AL, Wilson DJ, Nelson J. Staurosporine-induced apoptosis and hydrogen peroxide-induced necrosis in two human breast cell lines. **Br J Cancer.** 2003;88(1):125–31.
126. Dunai ZA, Imre G, Barna G, Korcsmaros T, Petak I, Bauer PI, et al. Staurosporine induces necroptotic cell death under caspase-compromised conditions in U937 cells. **PLoS One.** 2012;7(7):1–14.
127. Blume KE, Soeroes S, Keppeler H, Stevanovic S, Kretschmer D, Rautenberg M, et al. Cleavage of Annexin A1 by ADAM10 during Secondary Necrosis

- Generates a Monocytic “Find-Me” Signal. **J Immunol.** 2012;188(1):135–45.
128. de Vasconcelos NM, Van Opdenbosch N, Van Gorp H, Parthoens E, Lamkanfi M. Single-cell analysis of pyroptosis dynamics reveals conserved GSDMD-mediated subcellular events that precede plasma membrane rupture. **Cell Death Differ.** 2019;26(1):146–61.
 129. Nicholson DW, Thornberry NA. Caspases: Killer proteases. **Trends Biochem Sci.** 1997;22(8):299–306.
 130. Caserta TM, Smith AN, Gultice AD, Reedy MA, Brown TL. Q-VD-OPh, a broad spectrum caspase inhibitor with potent antiapoptotic properties. **Apoptosis.** 2003;8(4):345–52.
 131. Chauvier D, Ankri S, Charriaud-Marlangue C, Casimir R, Jacotot E. Broad-spectrum caspase inhibitors: From myth to reality? **Cell Death Differ.** 2007;14(2):387–91.
 132. Kuželová K, Grebeňová D, Brodská B. Dose-dependent effects of the caspase inhibitor Q-VD-OPh on different apoptosis-related processes. **J Cell Biochem.** 2011;112(11):3334–42.
 133. Ferraro-Peyret C, Quemeneur L, Flacher M, Revillard J-P, Genestier L. Caspase-Independent Phosphatidylserine Exposure During Apoptosis of Primary T Lymphocytes. **J Immunol.** 2002;169(9):4805–10.
 134. Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, Horvitz HR, Nagata S. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. **Science.** 2013;341(6144):403–6.
 135. Sakuragi T, Kosako H, Nagata S. Phosphorylation-mediated activation of mouse Xkr8 scramblase for phosphatidylserine exposure. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2019;116(8):2907–12.
 136. Kuida K, Zheng TS, Na S, Kuan C, Yang D, Karasuyama H, et al. Decreased apoptosis in the brain and premature lethality in CPP32-deficient mice. **Nature** [Internet]. 1996;384(6607):368–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/384368a0>
 137. Reed JC, Doctor K, Rojas A, Zapata JM, Stehlik C, Fiorentino L, et al. Comparative analysis of apoptosis and inflammation genes of mice and humans. **Genome Res.** 2003;13(6 B):1376–88.
 138. Liu Y, Fang Y, Chen X, Wang Z, Liang X. Gasdermin E-mediated target cell pyroptosis by CAR T cells triggers cytokine release syndrome. **Sci Immunol.**

2020;5(43):1–14.

139. Sarhan J, Liu BC, Muendlein HI, Li P, Nilson R, Tang AY, et al. Caspase-8 induces cleavage of gasdermin D to elicit pyroptosis during *Yersinia* infection. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2018;115(46):E10888–97.
140. Walsh JG, Cullen SP, Sheridan C, Lüthi AU, Gerner C, Martin SJ. Executioner caspase-3 and caspase-7 are functionally distinct proteases. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008;105(35):12815–9.
141. Bohm I, Schild H. Apoptosis : The Complex Scenario for a Silent Cell Death. **Mol Imaging Biol**. 2003;5(1):2–14.
142. Chan FK-M, Moriwaki K, De Rosa MJ. Detection of Necrosis by Release of Lactate Dehydrogenase (LDH) Activity. **Methods Mol Biol**. 2013;979:65–70.
143. D’Souza CA, Heitman J. Dismantling the *Cryptococcus* coat. **TRENDS Microbiol**. 2001;9(3):112–3.
144. Manira R, Yue Z, Edward M. Detection of pyroptosis by measuring released lactate dehydrogenase activity. **Methods Mol Biol**. 2013;1(7):85–90.
145. Wickman GR, Julian L, Mardilovich K, Schumacher S, Munro J, Rath N, et al. Blebs produced by actin–myosin contraction during apoptosis release damage-associated molecular pattern proteins before secondary necrosis occurs. **Cell Death Differ**. 2013;1293–305.
146. Linder A, Bauernfried S, Cheng Y, Albanese M, Jung C, Keppler OT, et al. CARD 8 inflammasome activation triggers pyroptosis in human T cells. **EMBO J**. 2020;49:1–16.
147. Johnson DC, Okondo MC, Orth EL, Rao SD, Huang H, Ball DP, et al. DPP8 / 9 inhibitors activate the CARD8 inflammasome in resting lymphocytes. **Cell Death Dis** [Internet]. 2020;11(628):1–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-020-02865-4>
148. Ding J, Wang K, Liu W, She Y, Sun Q, Shi J, et al. Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family. **Nature**. 2016;535(7610):111–6.
149. Liu X, Zhang Z, Ruan J, Pan Y, Magupalli VG, Wu H, et al. Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores. **Nature** [Internet]. 2016;535(7610):153–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature18629>

150. Perregaux D, Barberia J, Lanzetti AJ, Geoghega KF, Carty TJ, Gabel CA. IL-1 beta maturation: evidence that mature cytokine formation can be induced specifically by nigericin. **J Immunol**. 1992;149(4):1294–303.
151. Kaplanski G. Interleukin-18: Biological properties and role in disease pathogenesis. **Immunol Rev**. 2018;138–53.
152. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, et al. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. **Nature**. 2015;526:660–76.
153. Wang X, Blanco LP, Carmona-Rivera C, Nakabo S, Pedersen HL, Yu Z-X, et al. Gasdermin D modulates murine lupus and its associated organ damage. **Arthritis Rheumatol**. 2020;72(12):2118–29.
154. Rogers C, Erkes DA, Nardone A, Aplin AE, Fernandes-Alnemri T, Alnemri ES. Gasdermin pores permeabilize mitochondria to augment caspase-3 activation during apoptosis and inflammasome activation. **Nat Commun** [Internet]. 2019;10(1):1–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-09397-2>
155. Rogers C, Fernandes-Alnemri T, Mayes L, Alnemri D, Cingolani G, Alnemri ES. Cleavage of DFNA5 by caspase-3 during apoptosis mediates progression to secondary necrotic/pyroptotic cell death. **Nat Commun**. 2017;8:1–14.
156. Henrique MO, Leila S, Assis JB, Michele S, Capurro ML, Lepique AP, et al. Evaluation of inflammatory skin infiltrate following *Aedes aegypti* bites in sensitized and non-sensitized mice reveals saliva-dependent and immune-dependent phenotypes. **Immunology**. 2019;158:47–59.
157. Lee H, Coligan JE, Krzewski K, Lee H, Tian L, Bouladoux N, et al. Dendritic cells expressing immunoreceptor CD300f are critical for controlling chronic gut inflammation Dendritic cells expressing immunoreceptor CD300f are critical for controlling chronic gut inflammation. **J Clin Invest**. 2017;127(5):1905–17.
158. Gerlach BD, Ampomah PB, Yurdagul A, Shi J, Gerlach BD, Ampomah PB, et al. Efferocytosis induces macrophage proliferation to help resolve tissue injury. **Cell Metab** [Internet]. 2021;33(12):2445-2463.e8. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2021.10.015>
159. Segawa K, Kurata S, Yanagihashi Y, Brummelkamp TR, Matsuda F, Nagata S. Caspase-mediated cleavage of phospholipid flippase for apoptotic phosphatidylserine exposure. **Science**. 2014;344(6188):1164–8.
160. Karaji N, Sattentau QJ. Efferocytosis of Pathogen-Infected Cells. **Front Immunol**. 2017;8:1–10.

161. Doran AC, Yurdagul Jr A, Tabas I. Efferocytosis in health and disease. **Nat Rev Immunol** [Internet]. 2019;20(4):254–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41577-019-0240-6>
162. Canton J, Brees H, Henry CM, Buck MD, Schulz O, Rogers NC, et al. The receptor DNGR-1 signals for phagosomal rupture to promote cross-presentation of dead-cell-associated antigens. **Nat Immunol** [Internet]. 2021;22:140–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41590-020-00824-x>
163. Penteado L, Icia de A, Dejana NN, Verdán FF, Orlando AB, Niño VE, Dias FDN, et al. Distinctive role of efferocytosis in dendritic cell maturation and migration in sterile or infectious conditions. **Immunology**. 2017;151:304–13.
164. Henson PM, Hume DA. Apoptotic cell removal in development and tissue homeostasis. **TRENDS Immunol**. 2006;27(5):244–50.
165. Li MO, Flavell RA. Review Contextual Regulation of Inflammation : A Duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. **Immunity**. 2008;468–76.
166. Torchinsky MB, Garaude J, Martin AP, Blander JM. Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs TH17 cell differentiation. **Nature** [Internet]. 2009;457(7234):78–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature07781>
167. Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res**. 2011;1813(5):878–88.
168. Xu YD, Cheng M, Shang PP, Yang YQ. Role of IL-6 in dendritic cell functions. **J Leukoc Biol**. 2021;15(1):1–15.
169. Brouckaert G, Kalai M, Krysko D V, Saelens X, Vercammen D, Ndlovu M, et al. Phagocytosis of Necrotic Cells by Macrophages Is Phosphatidylserine Dependent and Does Not Induce Inflammatory Cytokine Production. **Mol Biol Cell**. 2004;15:1089–100.
170. Kolb JP, Iij THO, Oberst A, Martinez J. Programmed Cell Death and Inflammation : Winter Is Coming. **Trends Immunol** [Internet]. 2017;xx:1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2017.06.009>
171. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. **Cell Res** [Internet]. 2018;28(1):9–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2017.133>
172. Fritsch M, Günther SD, Schwarzer R, Albert MC, Schorn F, Werthenbach JP, et al. Caspase-8 is the molecular switch for apoptosis, necroptosis and

- pyroptosis. **Nature**. 2019;575(7784):683–7.
173. Mendes MT, Carvalho-Costa TM, Da Silva MV, Anê ACBM, Guimarães RM, Da Costa TA, et al. Effect of the saliva from different triatomine species on the biology and immunity of TLR-4 ligand and *Trypanosoma cruzi*-stimulated dendritic cells. **Parasites and Vectors** [Internet]. 2016;9(1):1–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13071-016-1890-x>
 174. Rocha FF, Gazzinelli-Guimarães PH, Soares AC, Lourdes RA, Estevão LRM, Rachid MA, et al. Effect of *Triatoma infestans* saliva on mouse immune system cells: The role of the pore-forming salivary protein trialysin. **Insect Biochem Mol Biol**. 2022;143:1–11.
 175. Prates DB, Araújo-Santos T, Luz NF, Andrade BB, França-Costa J, Afonso L, et al. *Lutzomyia longipalpis* saliva drives apoptosis and enhances parasite burden in neutrophils. **J Leukoc Biol**. 2011;90(3):575–82.
 176. Liu S, Kelvin DJ, Leon AJ, Jin L, Farooqui A. Induction of fas mediated caspase-8 independent apoptosis in immune cells by *Armigeres subalbatus* saliva. **PLoS One**. 2012;7(7):1–10.
 177. Sousa ACP, Oliveira CJF, Szabó MPJ, Silva MJB. Anti-neoplastic activity of *Amblyomma sculptum*, *Amblyomma parvum* and *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva on breast tumor cell lines. **Toxicon**. 2018;148:165–71.
 178. Chudzinski-Tavassi AM, De-Sá-Júnior PL, Simons SM, Maria DA, de Souza Ventura J, de Fátima Correia Batista I, 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**. 2010;56(7):1145–54.
 179. Chudzinski-Tavassi AM, Morais KLP, Pacheco MTF, Pasqualoto KFM, de Souza JG. Tick salivary gland as potential natural source for the discovery of promising antitumor drug candidates. **Biomed Pharmacother** [Internet]. 2016;77:14–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2015.11.003>
 180. Clinicaltrials.gov. **Study of Amblyomin-X in Advanced Solid Tumor** [Internet]. 2019. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT03120130>