

Michele Silva de Barros

**PADRONIZAÇÃO DE MODELO DE INFLAMAÇÃO
ALÉRGICA PELA EXPOSIÇÃO A PICADAS DE MOSQUITOS
*Aedes aegypti***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a 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
2012

RESUMO

BARROS, M. S. **Padronização de modelo de inflamação alérgica pela exposição a picadas de mosquitos *Aedes aegypti***. 2012. 95 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

Durante o repasto sanguíneo, fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* inoculam saliva na pele de seu hospedeiro vertebrado, modulando suas funções imunológicas e facilitando a transmissão de doenças. Alguns componentes com ação anticoagulante, antiagregante de plaquetas e vasodilatadora já foram descritos na saliva de *Ae. aegypti* e agem neutralizando os efeitos da hemostasia, permitindo que a alimentação ocorra com sucesso. Além disso, trabalhos clássicos demonstraram que a secreção salivar é responsável pela sensibilização a picadas de mosquitos e que muitos dos componentes presentes na saliva são imunogênicos e capazes de provocar intensa resposta imune. A resposta imunológica a estes alérgenos compreende reações sistêmicas e locais severas com envolvimento de anticorpos IgE e subclasses de IgG e hipersensibilidade mediada por linfócitos T. Após uma picada de mosquito é possível observar uma resposta inflamatória e imune mensurável no local da picada e algumas dessas reações podem ser observadas através da coceira e inchaço que aparecem em seguida. Assim, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um modelo para avaliar o perfil da resposta imunológica sistêmica desenvolvido por camundongos expostos naturalmente às picadas de mosquitos *Ae. aegypti*. Para isso, camundongos foram sensibilizados pela exposição ao *Ae. aegypti* e desafiados com PBS ou extrato da glândula salivar (EGS) do mosquito pela via intranasal. Paralelamente, este modelo foi comparado a um modelo clássico de inflamação alérgica pulmonar induzida pela sensibilização e posterior desafio com ovalbumina (OVA). Após os procedimentos de sensibilização e desafio, parâmetros de padrão respiratório e reatividade da traqueia e o infiltrado celular presente no lavado broncoalveolar (LBA) foi avaliado quantitativamente e qualitativamente nos animais. Além disso, citocinas presentes no LBA, perfil de anticorpos totais e específicos presentes no soro, secreção de muco e deposição de colágeno no tecido pulmonar foram determinados. Nossos resultados mostraram que camundongos sensibilizados pelas picadas dos mosquitos e desafiados com EGS apresentaram infiltrado celular no LBA dependente do número de exposições (“1x” ou “4x”) e composto majoritariamente de células mononucleares e eosinófilos. Dentre a população linfocitária, foi detectada a presença de células CD4⁺ e CD19⁺. Esse perfil qualitativo de células presentes no LBA foi bastante semelhante ao grupo OVA. Em ambos os grupos, “4x” e OVA, observamos aumento na população de células T CD4⁺ produtoras de IL-4 e IL-5 no pulmão e presença destas citocinas no LBA. Além disso, foi observada uma intensa produção de muco pelas células do epitélio brônquico e pouca deposição de colágeno ao redor dos bronquíolos. Ambos os grupos apresentaram níveis aumentados de IgE total e IgG1 específico, porém, somente o grupo sensibilizado pelas picadas produziu quantidades significativas de IgG2a específicas. Ao contrário do grupo OVA, o grupo exposto aos mosquitos não apresentou alteração no padrão respiratório em resposta a metacolina. Além disso, também não foram observadas alterações na reatividade da traqueia em resposta à metacolina. Em conclusão, nossos resultados mostram que a resposta induzida pela sensibilização com a saliva do mosquito *Ae. aegypti* e desafio com EGS promove uma resposta mista, com produção de anticorpos tanto do perfil Th1 quanto Th2, migração de eosinófilos e células mononucleares para o espaço broncoalveolar, produção de muco no pulmão e ausência de alterações no padrão respiratório e reatividade da traqueia que são comuns em modelos de alergia pulmonar.

Palavras-chave: Alergia. *Aedes aegypti*. Inflamação pulmonar. Eosinófilos. Citocinas.

ABSTRACT

BARROS, M. S. **Standardization of a model of allergic inflammation by exposure to *Aedes aegypti* mosquito bites.** 2012. 95 f. Dissertation (Masters Thesis in Immunology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2012.

During blood feeding, *Aedes aegypti* female mosquitoes inoculate saliva into the skin of their vertebrate hosts, modulating their immune functions and facilitating disease transmission. Some components with anticoagulant, antiplatelet and vasodilatory activities have been described in the saliva of *Ae. aegypti* that act by neutralizing the effects of hemostasis, allowing the meal to occur successfully. In addition, classical studies have shown that salivary secretion is responsible for the sensitization to mosquito bites and many of the components present in saliva are immunogenic and able to induce intense immune response. The immunological response to these allergens includes severe local and systemic reactions with involvement of IgE antibodies and IgG subclasses, and T cell-mediated hypersensitivity. Following a mosquito bite, it is possible to observe a measurable immune and inflammatory response at the bite site and some of these reactions can be observed through the itching and swelling. Thus, the aim of this project was to develop a model to evaluate the profile of the systemic immune response developed in mice naturally exposed to *Ae. aegypti* mosquito bite. To do that, mice were sensitized by exposure to *Ae. aegypti* bites and intranasally challenged with PBS or salivary gland extract (SGE) of the mosquito. Additionally, this model was compared to a classical model of allergic lung inflammation induced by sensitization and subsequent challenge with ovalbumin (OVA). After the sensitization and challenge procedures, breathing pattern, tracheal reactivity and the amount and type of cells present in bronchoalveolar lavage (BAL) were evaluated. Also, cytokines in BAL, total and specific antibodies present in serum, mucus secretion and collagen deposition in lung tissue were determined. Our results showed that mice sensitized by mosquito bites and challenged with SGE presented cellular infiltration in BAL that was dependent to the number of exposures ("1x" or "4x"), and mainly of mononuclear cells and eosinophils. The lymphocytic population was mainly of CD4⁺ and CD19⁺ cells. This qualitative cell profile was similar to the OVA group. In both groups, "4x" and OVA, we observed an increase in the population of T CD4⁺ cells that produce IL-4 and IL-5 in lung and in the levels of these cytokines in BAL. Furthermore, we observed an intense mucus production by bronchial epithelial cells and little deposition of collagen around the bronchioles. Both groups showed increased levels of total IgE, specific IgG1, but only the group sensitized by bites produced significant amounts of specific IgG2a. Unlike the OVA group, mice exposed to mosquitoes showed no alterations in breathing pattern in response to methacholine. In addition, no changes were observed in the reactivity of the trachea in response to methacholine. In conclusion, our results show that the response induced by sensitization with *Ae. aegypti* saliva and challenge with EGS promotes a mixed response, with production antibodies of both Th1 and Th2 patterns, migration of eosinophils and mononuclear cells into the bronchoalveolar space, production of mucus in the lungs and no changes in breathing pattern and reactivity of the trachea that are common in models of pulmonary allergy.

Keywords: Allergy. *Aedes aegypti*. Lung inflammation. Eosinophils. Cytokines.

1 INTRODUÇÃO

Mosquitos são artrópodes pertencentes à ordem Diptera que possui cerca de 150 mil espécies e representa a quarta maior ordem dentro da Classe Insecta (ALVERS et al., 2010). De todas as famílias de mosquitos conhecidas, a família Culicidae é a mais importante em termos de saúde pública por conter mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Culex* e *Anopheles*, que são os principais artrópodes vetores de parasitas causadores de diversas doenças humanas. Nesse contexto, *Aedes aegypti* é a espécie mais bem caracterizada e, em áreas de clima tropical, é conhecida por ser vetor primário de doenças emergentes e re-emergentes como a febre amarela, febre Chikungunya e dengue (CHEN et al., 2008; CURTIS; GRAVES, 1988; REUNALA et al., 1990).

Os mosquitos *Ae. aegypti* fêmeas precisam de sangue para garantir o desenvolvimento de seus ovos e para se alimentar com sucesso, necessitam localizar vasos sanguíneos de seus hospedeiros vertebrados. Nesse processo, o primeiro desafio encontrado após a ruptura física da pele é a barreira da hemostasia (SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). A hemostasia é um processo fisiológico complexo e redundante do qual fazem parte a coagulação sanguínea, agregação plaquetária e vasoconstrição, capazes de estancar a hemorragia no local de um ferimento, mas mantendo o fluxo sanguíneo normal no restante da circulação (GALE, 2011). Durante a evolução junto aos seus hospedeiros, os artrópodes hematófagos desenvolveram um coquetel salivar com componentes anticoagulantes, antiagregante de plaquetas e vasodilatadores que neutralizam os efeitos da hemostasia e permitem que uma alimentação sanguínea bem sucedida ocorra (RIBEIRO, 1987; RIBEIRO, 2000; REUNALA et al., 1990).

A agregação de plaquetas é a primeira linha de defesa para evitar a perda de sangue após lesão do tecido. As plaquetas ativadas por diversos agonistas, incluindo a trombina, o colagênio e ADP (adenosina difosfato), agregam-se no local da injúria, promovendo a coagulação e liberação de substâncias vasoconstritoras para formar o tampão de plaquetas. Insetos hematófagos bloqueiam a agregação plaquetária por diferentes mecanismos, mas a hidrólise do ADP parece ser a estratégia mais utilizada (VALENZUELA, 2002). Atividade apirase foi demonstrada na saliva de alguns mosquitos, resultando em inibição da agregação plaquetária pela hidrólise de ATP (adenosina trifosfato) e ADP liberados por células lesadas ou plaquetas ativadas. Através desse processo ocorre a liberação de AMP (adenosina monofosfato) e fosfato inorgânico que são incapazes de agregar plaquetas (RIBEIRO et al., 1984). Posteriormente essa enzima foi caracterizada como um membro da família de genes da 5'-nucleotidase (CHAMPAGNE et al., 1995). A *aegyptina*, um membro da família de alérgenos de 30 kDa, liga-se especificamente ao colágeno e bloqueia a agregação de plaquetas induzida por essa proteína (CALVO et al., 2007). Além disso, a *aegyptina* também inibe a

interação do fator de von Willebrand ao colágeno do tipo III sob condições estáticas assim como a adesão de plaquetas ao colágeno sob condições de fluxo de alta velocidade (CALVO et al., 2007).

O aumento do fluxo sanguíneo foi observado nos locais dos braços de voluntários humanos onde o mosquito *Ae. aegypti* havia se alimentado, sugerindo assim a presença de um componente vasodilatador na saliva deste inseto (PAPPAS et al., 1986 apud RIBEIRO, 1992). Os vasodilatadores são moléculas que aumentam o fluxo sanguíneo, antagonizando vasoconstritores produzidos pelo sistema hemostático após lesão do tecido pelo aparelho bucal dos insetos. Em 1992 foi descoberto que a atividade vasodilatadora de *Ae. aegypti* deve-se as sialocininas I e II, peptídeos da família das taquicininas. As sialocininas agem diretamente sobre o endotélio ativando a produção de óxido nítrico, resultando na vasodilatação (CHAMPAGNE; RIBEIRO, 1994; RIBEIRO, 1992).

A cascata de coagulação consiste em uma série de serino-proteases que ativam umas às outras de forma sequencial. Este processo culmina na produção de trombina ativa, que cliva o fibrinogênio em fibrina, que por sua vez se polimeriza e, juntamente com as plaquetas, forma o coágulo de sangue. Os componentes anticoagulantes presentes na saliva de artrópodes hematófagos agem especificamente em proteases ou complexos envolvidos na coagulação sanguínea, como a trombina e o fator Xa (VALENZUELA, 2002). Substâncias com propriedades anticoagulantes isoladas da saliva de insetos já foram descritas e no caso específico do mosquito *Ae. aegypti* foi encontrado um inibidor de serino-proteases (serpina) que atua sobre o fator Xa (AFXa – Anticoagulant-Factor Xa) com atividade anti-coagulante (STARK; JAMES, 1995, 1998). O possível papel anticoagulante e anti-inflamatório de uma outra serpina de *Ae. aegypti* encontrada no salivoma da espécie, provisoriamente chamada de AET-7393, está sendo investigada por nosso grupo no momento.

No entanto, o papel da saliva na hematofagia não se limita apenas ao sistema vascular. Uma resposta inflamatória mensurável é observada nos hospedeiros após a picada de mosquitos e trabalhos clássicos demonstraram que a secreção salivar é a responsável pela sensibilização a essas picadas. Já foi demonstrado que antígenos salivares estão envolvidos na elicitação de reações imediatas e tardias na pele dos hospedeiros (HECHT, 1928; MCKIEL, 1959). Por outro lado, quando o duto salivar de fêmeas de *Ae. aegypti* foi cortado, esses mosquitos ainda foram capazes de se alimentar e realizar postura de ovos, mas as reações cutâneas associadas às picadas em hospedeiros sensibilizados não ocorreram (HUDSON et al., 1960). De fato, muitos dos componentes salivares são imunogênicos e induzem respostas imunes evidentes, como o inchaço e coceira que acompanham uma picada de mosquito

(PENG; SIMONS, 2007). Porém, após exposições repetidas aos antígenos salivares, o sistema imune do hospedeiro pode elaborar reações celulares ou humorais que alteram o microambiente e, caso essas reações sejam suficientemente fortes, elas podem afetar a capacidade dos mosquitos de se alimentar e/ou de se reproduzir. Este fato foi comprovado pela imunização de coelhos com um extrato total de *Ae. aegypti*, que causou uma redução de 24 a 31% na fecundidade dos mosquitos fêmeas que se alimentaram nesses animais (SUTHERLAND; EWEN, 1974).

A evolução dos componentes salivares de artrópodes hematófagos pode ter ocorrido no sentido de tentar contornar este problema. Tal fato pode ser observado pela presença de fatores salivares que evitam a sensibilização dos hospedeiros pelos fatores vasoconstritores que facilitam a alimentação ou retardam respostas deletérias por parte do hospedeiro (ANDRADE et al., 2005; GILLESPIE et al., 2000). Tais fatores induzem um desvio da resposta para Th2, o que parece favorecer a sobrevivência de ectoparasitas. Muitas atividades imunomoduladoras já foram demonstradas na saliva de diferentes espécies de artrópodes hematófagos, atuando direta ou indiretamente em células imunes efetoras como células dendríticas, macrófagos e células T, mas apenas em alguns casos as moléculas responsáveis por tais atividades foram descritas (ANDRADE et al., 2005; SÁ-NUNES; OLIVEIRA, 2010). No caso específico do *Ae. aegypti*, foi demonstrado que o extrato da glândula salivar (EGS) do mosquito inibe a liberação de TNF- α em monocultura de mastócitos de rato, mas não afeta a desgranulação dessas células (BISSONNETTE et al., 1993). O EGS de *Ae. aegypti* também inibe a proliferação *in vitro* de linfócitos de camundongo induzida por concanavalina A (WASSERMAN et al., 2004) e antígeno-específica (CROSS et al., 1994; WASSERMAN et al., 2004). Essa inibição foi acompanhada por uma redução de citocinas pró-inflamatórias (GM-CSF e TNF- α) e citocinas do perfil Th1 (IL-2 e IFN- γ), mas pouco efeito foi observado nos níveis das citocinas Th2, IL-4 e IL-5 (WASSERMAN et al., 2004). Nosso grupo recentemente demonstrou que o EGS de *Ae. aegypti* não afeta a diferenciação, maturação ou função das células dendríticas e que seu efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos T se dá pela indução de apoptose nessas células (BIZZARRO, 2012). Até mesmo durante infecções virais, a saliva dos insetos hematófagos pode agir na regulação do sistema imune. A presença da saliva de *Ae. aegypti* em inóculos com o vírus Sindbis resultou em uma redução local da citocina IFN- γ e aumento das citocinas IL-4 e IL-10, em comparação com a injeção do vírus somente (SCHNEIDER et al., 2004). O mesmo foi observado quando a produção sistêmica de citocinas foi avaliada a partir de linfócitos esplênicos coletados de camundongos susceptíveis aos flavivírus expostos as picadas de *Culex quinquefasciatus* e *Ae. aegypti*

(ZEIDNER et al., 1999). Nestes experimentos também foi observada a redução de IFN- γ e aumento de IL-4 e IL-10, resposta que propicia a infecção viral.

Como visto até aqui, a saliva de mosquitos possui uma série de efeitos biológicos em seus hospedeiros, embora o conhecimento das moléculas responsáveis por essas atividades ainda esteja em uma fase bastante inicial. Para se ter uma ideia, até o ano de 2002 estavam depositadas no GenBank sequências de apenas 6 proteínas conhecidamente expressas nas glândulas salivares de *Ae. aegypti*: amilase (GROSSMAN; JAMES, 1993), alfa-1,4 glicosidase (JAMES et al., 1989), apirase (CHAMPAGNE et al., 1995), proteína D7 (JAMES et al., 1991), alérgeno de 30 kDa (SIMONS; PENG, 2001) e sialocinina (BEERNTSEN et al., 1999). Com a publicação do primeiro salivoma da espécie nesse mesmo ano, 32 novos transcritos completos (full-length) foram sequenciados, 31 deles possuindo um provável peptídeo sinal indicativo de secreção. Desse total, dez proteínas foram encontradas por degradação de Edman em bandas visíveis em gel de eletroforese (SDS-PAGE) de um homogeneizado de 80 pares de glândulas de fêmeas adultas de *Ae. aegypti* (VALENZUELA et al., 2002). Após a publicação do genoma dessa espécie (NENE et al., 2007) e com o uso de programas de bioinformática, a busca por novas proteínas foi facilitada e no segundo salivoma publicado 5 anos mais tarde foram sequenciados 573 novos transcritos, 136 desses codificando proteínas provavelmente secretadas (RIBEIRO et al., 2007). Mais de 20 dessas proteínas foram confirmadas em um gel de eletroforese bidimensional de EGS de fêmeas de *Ae. aegypti*, utilizando digestão trípica e espectrometria de massa (RIBEIRO et al., 2007). Essas proteínas foram agrupadas em aproximadamente 40 famílias e possuem, em sua maioria, função desconhecida. Algumas dessas proteínas foram estudadas por Peng e Simons (2004) e uma das tabelas desse trabalho apresentando as características de diversos componentes salivares de *Ae. aegypti* é reproduzida a seguir (Tabela 1). As proteínas caracterizadas como alérgenos estão indicadas por setas vermelhas na tabela.

Tabela 1 - Proteínas salivares de *Aedes aegypti*.

Protein name	Allergen name	Molecular weight (KD)	cDNA sequenced	Biological functions
α -Amylase 1	?	81.5	yes	unknown
Apyrase	→ Aed a 1	68	yes	antiplatelet
α -Glucosidase (maltase-like 1)	→ Aed a 4	67	yes	sugar digestion
Esterase	?	65	?	unknown
Anticoagulant-factor Xa	?	54	yes	anticoagulant
Aed a X ₁	Aed a X ₁ ?	44	?	unknown
Aed a X ₂	Aed a X ₂ ?	37	?	unknown
Female-specific protein, D7	→ Aed a 2	37	yes	unknown
-	→ Aed a 3	30	yes	unknown
Sialokinins	?	1.4	yes	vasodilator
Anti-tumour necrosis factor	?	unknown	?	anti-tumour necrosis factor
Lysozyme	?	unknown	?	bacteriolysis

Fonte: Adaptada de PENG e SIMONS (2004).

Durante seu repasto sanguíneo, os mosquitos injetam saliva na pele do hospedeiro, o que parece sensibilizar tanto o homem quanto outros animais (MCKIEL, 1959). Para estudar as consequências dessa exposição, Mellanby (1946) expôs ao *Ae. aegypti*, 25 voluntários que nunca tinham entrado em contato com esse mosquito e observou que as primeiras picadas não causaram nenhuma reação inicial visível, mas picadas subsequentes induziram uma lesão cutânea tardia. Depois de repetidas picadas que ocorreram ao longo de um mês, foi observado o desenvolvimento tardio de uma pápula e, após exposições subsequentes por vários meses, essas reações desapareceram. De forma geral, esse trabalho mostrou que as picadas de mosquitos causam reações cutâneas locais imediatas e tardias, que ocasionalmente ocorrem reações sistêmicas e que a dessensibilização ocorre após exposições repetidas. Entretanto, não é possível afirmar que essa sequência de eventos ocorra nas pessoas expostas naturalmente ao mosquito (PENG; SIMONS, 2004). Isso porque na vida real, a sensibilização natural pode levar anos para ocorrer ou pode nunca ocorrer, pois as pessoas geralmente evitam a exposição aos mosquitos quando isso é possível.

Segundo Simons et al. (2003), apenas reações que causam alterações grandes ou atípicas podem ser descritas como “alergia a mosquito”. Em alguns casos, foram relatadas reações sistêmicas incluindo urticária generalizada e anafilaxia e também alterações locais graves como a “Síndrome de Skeeter” (SIMONS; PENG, 1999; PENG et al., 2004). A “Síndrome de Skeeter” é definida como uma intensa reação inflamatória local induzida pela picada de mosquito e, por vezes, acompanhada de febre (PENG et al., 2004). Os mecanismos

envolvidos em reações alérgicas são bem descritos, embora as causas que levam ao desenvolvimento de alergia, processo chamado de sensibilização, ainda não estejam totalmente elucidadas. Pelo que se sabe até o momento, após a sensibilização alérgica, as células T de pacientes atópicos tendem a produzir níveis elevados de citocinas do perfil Th2 que regulam a síntese de IgE, como a interleucina 4 (IL-4), a proliferação e infiltração de eosinófilos nas vias aéreas (IL-5), proliferação de mastócitos (IL-9) e produção de muco e hiperresponsividade das vias aéreas (IL-13). Um padrão Th2 de expressão de citocinas é observado em inflamações alérgicas e em infecções parasitárias, condições que estão associadas com a produção de IgE e eosinofilia (HAMELMANN; GELFAND, 2001; HOLGATE; POLOSA, 2008). Embora quase metade da população urbana mundial seja atópica (geneticamente predispostas a produzir anticorpos IgE no soro) e a maioria dos doentes alérgicos sejam atópicos, é possível que haja o desenvolvimento de alergia na ausência de atopia, como pode ser observado nos casos de alergias a vespas e abelhas, por exemplo (HOLGATE; POLOSA, 2008).

Diversos modelos experimentais capazes de reproduzir algumas das características da resposta alérgica estão descritos na literatura, incluindo infestação por helmintos e inoculação de diversas moléculas e extratos (ROGERIO et al., 2010). Assim, os modelos murinos forneceram grande parte do que já se sabe sobre o desenvolvimento de alergias, em especial a asma (EPSTEIN, 2004). Modelos animais que mimetizam as características imunológicas e da inflamação pulmonar observadas na asma humana são ferramentas importantes para estudar de maneira aprofundada os mecanismos celulares e moleculares que envolvem o início e controle da alergia (BAQUEIRO et al., 2010). Nesse sentido, o modelo experimental de asma alérgica induzida por ovalbumina (OVA) é um dos mais bem caracterizados. Embora existam algumas diferenças com relação à doença humana, camundongos sensibilizados e desafiados com OVA desenvolvem inflamação eosinofílica pulmonar, hiperreatividade das vias aéreas, aumento dos níveis de IgE, hipersecreção de muco e, ocasionalmente, o remodelamento das vias aéreas (EPSTEIN, 2004).

Na resposta às picadas de mosquitos, algumas das características observadas em humanos também podem ser reproduzidas em modelos murinos após sensibilização natural pela picada de mosquitos ou após sensibilização realizada com alérgenos recombinantes. Como resultado, foi observada a produção de anticorpos específicos contra componentes da saliva, desenvolvimento de reações cutâneas e dessensibilização, assim como observado em seres humanos (CHEN et al., 1998). Uma vantagem da sensibilização natural é a ausência do uso de adjuvantes, mimetizando a alergia que uma parcela crescente da população desenvolve durante a

vida. Neste sentido, o modelo de sensibilização natural à picada de mosquito pode ser uma ótima ferramenta de estudo, pois permite que sejam avaliados vários parâmetros da resposta imune induzida pela saliva, ao mesmo tempo em que também pode ser utilizado para estudos mais aprofundados de doenças alérgicas, assim como dos mecanismos envolvidos nos processos de sensibilização e dessensibilização aos alérgenos.

6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados no presente trabalho confirmam que o modelo desenvolvido por nós de sensibilização pela exposição aos mosquitos *Ae. aegypti* seguido por desafio com componentes salivares, induz resposta sistêmica em camundongos, caracterizada por inflamação pulmonar alérgica. Porém, este modelo nos parece diferente do modelo clássico nessa área, utilizando OVA adsorvida em Alum. Observamos uma clara presença de eosinófilos e células CD4⁺ e CD19⁺ no LBA, com produção de IL-4, IL-5 e IL-13, presença de muco e anticorpos IgE e IgG1 no soro, sugerindo um padrão Th2 de resposta. Entretanto, também observamos a presença de níveis aumentados de IgG2a no soro dos animais expostos aos mosquitos, sugerindo um perfil misto de resposta. Apesar de diversos elementos responsáveis pela hiperreatividade das vias aéreas estarem presentes, não foram observadas alterações do padrão respiratório ou responsividade da traqueia. Além disso, vimos que nas nossas condições experimentais, a sensibilização dos camundongos não afetou o repasto sanguíneo dos mosquitos utilizados neste estudo.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

- ALVERS, W. C. L., GORAYEB, I. S., LOUREIRO, E. C. B.. Bactérias isoladas de culicídeos (Diptera: Nematocera) hematófagos em Belém, Pará, Brasil. **Rev. Pan-Amaz. Saúde**, v. 1, p. 131-141, 2010.
- ALLEN, J. R. Passive transfer between experimental animals of hypersensitivity to *Aedes aegypti* bites. **Exp. Parasitol.**, v. 19, n. 1, p. 132-7, Aug 1966.
- ANDERSON, S. D. et al. Comparison of mannitol and methacholine to predict exercise-induced bronchoconstriction and a clinical diagnosis of asthma. **Respir. Res.**, v. 10, p. 4, 2009.
- ANDRADE, B. B. et al. Haematophagous arthropod saliva and host defense system: a tale of tear and blood. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 77, n. 4, p. 665-93, Dec 2005.
- BAQUEIRO, T. et al. Respiratory allergy to *Blomia tropicalis*: immune response in four syngeneic mouse strains and assessment of a low allergen-dose, short-term experimental model. **Respir. Res.**, v. 11, p. 51, 2010.
- BARROS, M. S. **Padronização de modelo de inflamação alérgica pela exposição a picadas de mosquitos *Aedes aegypti***. 92 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BECKER, E. L. Nature and classification of immediate-type allergic reactions. **Adv. Immunol.**, v. 13, p. 267-313, 1971.
- BEERNTSEN, B. T. et al. Characterization of the Sialokinin I gene encoding the salivary vasodilator of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **Insect. Mol. Biol.**, v. 8, n. 4, p. 459-67, Nov 1999.
- BIZZARRO, B. **Efeito da saliva de *Aedes aegypti* sobre a diferenciação, maturação e função de células dendríticas e na proliferação de linfócitos T**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- BISSONNETTE, E. Y.; ROSSIGNOL, P. A.; BEFUS, A. D. Extracts of mosquito salivary gland inhibit tumour necrosis factor alpha release from mast cells. **Parasite Immunol.**, v. 15, n. 1, p. 27-33, Jan 1993.
- BORTOLATTO, J. et al. Toll-like receptor 4 agonists adsorbed to aluminium hydroxide adjuvant attenuate ovalbumin-specific allergic airway disease: role of MyD88 adaptor molecule and interleukin-12/interferon-gamma axis. **Clin. Exp. Allergy**, v. 38, n. 10, p. 1668-79, Oct 2008.

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

BREWER, J. M. et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4- or IL-13-mediated signaling. **J. Immunol.**, v. 163, n. 12, p. 6448-54, Dec 1999.

BUSSE, W. et al. Airway remodeling and repair. **Am. J. Respir. Crit. Care. Med.**, v. 160, n. 3, p. 1035-42, Sep 1999.

CALVO, E. et al. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin alpha2beta1, and von Willebrand factor. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n. 37, p. 26928-38, Sep 2007.

CHAMPAGNE, D. E.; RIBEIRO, J. M. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 91, n. 1, p. 138-42, Jan 1994.

CHAMPAGNE, D. E. et al. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 92, n. 3, p. 694-8, Jan 1995.

CHEN, X. G.; MATHUR, G.; JAMES, A. A. Gene expression studies in mosquitoes. **Adv. Genet.**, v. 64, p. 19-50, 2008.

CHEN, Y. L.; SIMONS, F. E.; 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-gamma production. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 116, n. 4, p. 269-77, Aug 1998.

CLUTTERBUCK, E. J.; SANDERSON, C. J. Human eosinophil hematopoiesis studied in vitro by means of murine eosinophil differentiation factor (IL5): production of functionally active eosinophils from normal human bone marrow. **Blood**, v. 71, n. 3, p. 646-51, Mar 1988.

COËFFIER, E.; JOSEPH, D.; VARGAFTIG, B. B. Activation of guinea pig eosinophils by human recombinant IL-5. Selective priming to platelet-activating factor-acether and interference of its antagonists. **J. Immunol.**, v. 147, n. 8, p. 2595-602, Oct 1991.

CONRAD, M. L. et al. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. **Clin. Exp. Allergy.**, v. 39, n. 8, p. 1246-54, Aug 2009.

CORRY, D. B. et al. Interleukin 4, but not interleukin 5 or eosinophils, is required in a murine model of acute airway hyperreactivity. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 109-17, Jan 1996.

CROSS, M. L.; CUPP, E. W.; ENRIQUEZ, F. J. Differential modulation of murine cellular immune responses by salivary gland extract of *Aedes aegypti*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 51, n. 5, p. 690-6, Nov 1994.

CURTIS, C. F.; GRAVES, P. M. Methods for replacement of malaria vector populations. **J. Trop. Med. Hyg.**, v. 91, n. 2, p. 43-8, Apr 1988.

DE VRIES, J. E. The role of IL-13 and its receptor in allergy and inflammatory responses. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 102, n. 2, p. 165-9, Aug 1998.

- DOMBROWICZ, D. et al. Abolition of anaphylaxis by targeted disruption of the high affinity immunoglobulin E receptor alpha chain gene. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 969-76, Dec 1993.
- DRAZEN, J. M.; ARM, J. P.; AUSTEN, K. F. Sorting out the cytokines of asthma. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 1-5, Jan 1996.
- DUBIN, I. N.; REESE, J. D.; SEAMANS, L. A. Attempt to produce protection against mosquitoes by active immunization. **Fed. Proc.**, v. 7, n. 1 Pt 1, p. 303, Mar 1948.
- EAST, R. Allergies. **Nature**, v. 479, 7374th ed., p. 479, 2011. Suplemento 1.
- EPSTEIN, M. M. Do mouse models of allergic asthma mimic clinical disease? **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, n. 1, p. 84-100, Jan 2004.
- FACCIOLI, L. H. *et al.* IL-5 drives eosinophils from bone marrow to blood and tissues in a guinea-pig model of visceral larva migrans syndrome. **Mediators Inflamm.**, v. 5, n. 1, p. 24-31, 1996.
- FAQUIM-MAURO, E. L. et al. Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12. **J. Immunol.**, v. 163, n. 7, p. 3572-6, Oct 1999.
- FAUSTINO, L. et al. Regulatory T cells accumulate in the lung allergic inflammation and efficiently suppress T-cell proliferation but not Th2 cytokine production. **Clin. Dev. Immunol.**, v. 2012, p. 721817, 2012.
- FOSTER, P. S. et al. Interleukin 5 deficiency abolishes eosinophilia, airways hyperreactivity, and lung damage in a mouse asthma model. **J. Exp. Med.**, v. 183, n. 1, p. 195-201, Jan 1996.
- _____. Interleukins-4, -5, and -13: emerging therapeutic targets in allergic disease. **Pharmacol. Ther.**, v. 94, n. 3, p. 253-64, Jun 2002.
- _____. Elemental signals regulating eosinophil accumulation in the lung. **Immunol. Rev.**, v. 179, p. 173-81, Feb 2001.
- GALE, A. J. Continuing education course #2: current understanding of hemostasis. **Toxicol. Pathol.**, v. 39, n. 1, p. 273-80, Jan 2011.
- GALLI, S. J.; TSAI, M.; PILIPONSKY, A. M. The development of allergic inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 445-54, Jul 2008.
- GILLESPIE, R. D.; MBOW, M. L.; TITUS, R. G. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 7, p. 319-31, Jul 2000.
- GOUON-EVANS, V.; POLLARD, J. W. Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the pubertal and cycling uterus. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4515-21, Oct 2001.
- GROSSMAN, G. L.; JAMES, A. A. The salivary glands of the vector mosquito, *Aedes aegypti*, express a novel member of the amylase gene family. **Insect. Mol. Biol.**, v. 1, n. 4, p.

223-32, 1993.

GRÜNIG, G. et al. Requirement for IL-13 independently of IL-4 in experimental asthma. **Science**, v. 282, n. 5397, p. 2261-3, Dec 1998.

HAMELMANN, E.; GELFAND, E. W. IL-5-induced airway eosinophilia--the key to asthma? **Immunol Rev**, v. 179, p. 182-91, Feb 2001.

HAMMAD, H. et al. Inflammatory dendritic cells--not basophils--are necessary and sufficient for induction of Th2 immunity to inhaled house dust mite allergen. **J. Exp. Med.**, v. 207, n. 10, p. 2097-111, Sep 2010.

HATFIELD, P. R. Anti-mosquito antibodies and their effects on feeding, fecundity and mortality of *Aedes aegypti*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 2, n. 4, p. 331-8, Oct 1988.

HAZENBOS, W. L. et al. Impaired IgG-dependent anaphylaxis and Arthus reaction in Fc gamma RIII (CD16) deficient mice. **Immunity**, v. 5, n. 2, p. 181-8, Aug 1996.

HECHT, O. Über die Sprosspilze der Oesophagusastolpungen und über die Giftigverkung der Speicheldrüsen von Stechmücken. **Arch. Schiffs Trop. Hyg.**, v. 32, p. 561-75, 1928.

HERSHEY, G. K. IL-13 receptors and signaling pathways: an evolving web. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 4, p. 677-90; quiz 691, Apr 2003.

HOLGATE, S. T.; POLOSA, R. Treatment strategies for allergy and asthma. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 3, p. 218-30, Mar 2008.

HUDSON, A.; BOWMAN, L.; ORR, C. W. Effects of absence of saliva on blood feeding by mosquitoes. **Science**, v. 131, n. 3415, p. 1730-1, Jun 1960.

HUMBLES, A. A. et al. The murine CCR3 receptor regulates both the role of eosinophils and mast cells in allergen-induced airway inflammation and hyperresponsiveness. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 99, n. 3, p. 1479-84, Feb 2002.

IWAKURA, Y. et al. The roles of IL-17A in inflammatory immune responses and host defense against pathogens. **Immunol. Rev.**, v. 226, p. 57-79, Dec 2008.

JACOBSEN, E. A. et al. Allergic pulmonary inflammation in mice is dependent on eosinophil-induced recruitment of effector T cells. **J. Exp. Med.**, v. 205, n. 3, p. 699-710, Mar 2008.

JAMES, A. A. et al. Isolation and characterization of the gene expressing the major salivary gland protein of the female mosquito, *Aedes aegypti*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 44, n. 2, p. 245-53, Feb 1991.

JAMES, A. A.; BLACKMER, K.; RACIOPPI, J. V. A salivary gland-specific, maltase-like gene of the vector mosquito, *Aedes aegypti*. **Gene**, v. 75, n. 1, p. 73-83, Jan 1989.

JANEWAY, C. A.; MEDZHITOV, R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v.

20, p. 197-216, 2002.

KAY, A. B. et al. Leucocyte activation initiated by IgE-dependent mechanisms in relation to helminthic parasitic disease and clinical models of asthma. **Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.**, v. 77, n. 1-2, p. 69-72, 1985.

KORN, T. et al. IL-17 and Th17 Cells. **Annu Rev. Immunol.**, v. 27, p. 485-517, 2009.

LEE, F. E.; GEORAS, S. N.; BECK, L. A. IL-17: important for host defense, autoimmunity, and allergy? **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 11, p. 2540-2, Nov 2010.

LINO DOS SANTOS FRANCO, A. *et al.* Pulmonary neutrophil recruitment and bronchial reactivity in formaldehyde-exposed rats are modulated by mast cells and differentially by neuropeptides and nitric oxide. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 214, n. 1, p. 35-42, Jul 2006.

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

MELLANBY, K. Man's reaction to mosquito bites. **Nature**, v. 158, n. 4016, p. 554, Oct 1946.

METZGER, W. J. et al. Local allergen challenge and bronchoalveolar lavage of allergic asthmatic lungs. Description of the model and local airway inflammation. **Am. Rev. Respir. Dis.**, v. 135, n. 2, p. 433-40, Feb 1987.

MILOVANOVIC, M. et al. Interleukin-17A promotes IgE production in human B cells. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 11, p. 2621-8, Nov 2010.

MISHRA, A. et al. Fundamental signals that regulate eosinophil homing to the gastrointestinal tract. **J. Clin. Invest.**, v. 103, n. 12, p. 1719-27, Jun 1999.

MIYAJIMA, I. et al. Systemic anaphylaxis in the mouse can be mediated largely through IgG1 and Fc gammaRIII. Assessment of the cardiopulmonary changes, mast cell degranulation, and death associated with active or IgE- or IgG1-dependent passive anaphylaxis. **J. Clin. Invest.**, v. 99, n. 5, p. 901-14, Mar 1997.

MOLET, S. et al. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human bronchial fibroblasts to produce cytokines. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 108, n. 3, p. 430-8, Sep 2001.

MOTA, I.; WONG, D.; SADUN, E. H. Mouse homocytotropic antibodies. I. Specific differentiation between mouse 7S gamma 1 and mouse reagin-like antibodies. **Life Sci.**, v. 7, n. 24, p. 1289-93, Dec 1968.

MOTA, I. Properties of rat and mouse homocytotropic antibodies. In: K. F. Austen and E. L. Becker, eds. **Biochemistry of the Acute Allergic Reactions**. Blackwell Scientific Publications: Oxford and Edinburgh, 1968. 189 p.

MURPHY, C. A. et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. **J. Exp. Med.**, v. 198, n. 12, p. 1951-7, Dec 2003.

NENE, V. et al. Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. **Science**, v. 316, n. 5832, p. 1718-23, Jun 2007.

NOVAK, N.; BIEBER, T. Allergic and nonallergic forms of atopic diseases. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 112, n. 2, p. 252-62, Aug 2003.

OHNMACHT, C.; VOEHRINGER, D. Basophils protect against reinfection with hookworms independently of mast cells and memory Th2 cells. **J. Immunol.**, v. 184, n. 1, p. 344-50, Jan 2010.

PENG, Z.; SIMONS, F. E. Mosquito allergy: immune mechanisms and recombinant salivary allergens. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 133, n. 2, p. 198-209, Feb 2004.

_____. Advances in mosquito allergy. **Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 350-4, Aug 2007.

PENG, Z.; YANG, M.; SIMONS, F. E. Immunologic mechanisms in mosquito allergy: correlation of skin reactions with specific IgE and IgG antibodies and lymphocyte proliferation response to mosquito antigens. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 77, n. 3, p. 238-44, Sep 1996.

POPE, S. M. et al. Identification of a cooperative mechanism involving interleukin-13 and eotaxin-2 in experimental allergic lung inflammation. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 14, p. 13952-61, Apr 2005.

RAMASAMY, M. S. et al. Anti-mosquito antibodies decrease the reproductive capacity of *Aedes aegypti*. **Med. Vet. Entomol.**, v. 2, n. 1, p. 87-93, Jan 1988.

REUNALA, T. et al. Immunology and treatment of mosquito bites. **Clin. Exp. Allergy**, v. 20 Suppl 4, p. 19-24, Nov 1990.

_____. Passive transfer of cutaneous mosquito-bite hypersensitivity by IgE anti-saliva antibodies. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 94, n. 5, p. 902-6, Nov 1994.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 463-78, 1987.

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

_____. Blood-feeding in mosquitoes: probing time and salivary gland anti-haemostatic activities in representatives of three genera (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*). **Med. Vet. Entomol.**, v. 14, n. 2, p. 142-8, Jun 2000.

RIBEIRO, J. M. et al. Salivary apyrase of *Aedes aegypti*: characterization and secretory fate. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 79, n. 1, p. 81-6, 1984.

_____. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti*. **BMC Genomics**, v. 8, p. 6, 2007.

RODRÍGUEZ, D. et al. Bacterial lipopolysaccharide signaling through Toll-like receptor 4 suppresses asthma-like responses via nitric oxide synthase 2 activity. **J. Immunol.**, v. 171, n.

2, p. 1001-8, Jul 2003.

ROGERIO, A. P. et al. Lajoense extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. **Parasite Immunol.**, v. 25, n. 7, p. 393-400, Jul 2003.

ROGERIO, A. P.; SÁ-NUNES, A.; FACCIOLI, L. H. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. **Pharmacol. Res.**, v. 62, n. 4, p. 298-307, Oct 2010.

ROTHENBERG, M. E. Eosinophilia. **N. Engl. J. Med.**, v. 338, n. 22, p. 1592-600, May 1998.

RUBIN, A. S. et al. Hiperresponsividade brônquica: diretrizes para testes de função pulmonar. **J. Pneumol.**, v. 28, p. 101-21, 2002. Suplemento 3.

RUSSO, M. et al. Suppression of asthma-like responses in different mouse strains by oral tolerance. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.**, v. 24, n. 5, p. 518-26, May 2001.

SÁ-NUNES, A., OLIVEIRA, C. J. F. Sialogenins and other immunomodulators derived from blood feeding parasites. In: KINI, R. M., MCLANE, M. A., CLEMETSON, K. J., MARKLAND, F. S. JR., MORITA, T., eds. **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside**. Springer, 2010. 22 p.

SAMPSON, H. A. et al. Symposium on the definition and management of anaphylaxis: summary report. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 115, n. 3, p. 584-91, Mar 2005.

SANDERSON, C. J. et al. The production of lymphokines by primary alloreactive T-cell clones: a co-ordinate analysis of 233 clones in seven lymphokine assays. **Immunology**, v. 56, n. 4, p. 575-84, Dec 1985.

SANDERSON, C. J. Interleukin-5, eosinophils, and disease. **Blood**, v. 79, n. 12, p. 3101-9, Jun 1992.

SCHNEIDER, B. S. et al. *Aedes aegypti* salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. **Viral Immunol.**, v. 17, n. 4, p. 565-73, 2004.

SIMONS, F. E.; PENG, Z. Skeeter syndrome. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, n. 3 Pt 1, p. 705-7, Sep 1999a.

_____. Mosquito allergy: recombinant mosquito salivary antigens for new diagnostic tests. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 124, n. 1-3, p. 403-5, 2001 Jan-Mar 2001a.

SIMONS, F.; PENG, Z. Mosquito allergy. In: Levine M, Lockey R, editors. American Academy of Allergy, Asthma and Immunology monograph on insect allergy. 4th ed. Milwaukee, Wisconsin: American Academy of Allergy, Asthma and Immunology, 2003. p. 175-203.

STARK, K. R.; JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. **Exp. Parasitol.**, v. 81, n. 3, p. 321-31, Nov 1995.

_____. Isolation and characterization of the gene encoding a novel factor Xa-directed anticoagulant from the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. **J. Biol. Chem.**, v. 273, n. 33, p. 20802-9, Aug 1998.

STONE, K. D.; PRUSSIN, C.; METCALFE, D. D. IgE, mast cells, basophils, and eosinophils. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 125, n. 2 Suppl 2, p. S73-80, Feb 2010.

STUMM, C. L. et al. Airway remodeling in murine asthma correlates with a defect in PGE2 synthesis by lung fibroblasts. **Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.**, v. 301, n. 5, p. L636-44, Nov 2011.

SUTHERLAND, G. B.; EWEN, A. B. Fecundity decrease in mosquitoes ingesting blood from specifically sensitized mammals. **J. Insect. Physiol.**, v. 20, n. 4, p. 655-60, Apr 1974.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **J. Immunol.**, v. 175, n. 12, p. 8346-53, Dec 2005.

VALENZUELA, J. G. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 10, p. 1199-209, Oct 2002.

VALENZUELA, J. G. et al. Toward a description of the sialome of the adult female mosquito *Aedes aegypti*. **Insect Biochem. Mol. Biol.**, v. 32, n. 9, p. 1101-22, Sep 2002.

WANG, H. et al. Induction of IgE responses using a recombinant mosquito salivary allergen rAed a 2 without adjuvant in mice. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 120, n. 2, p. 135-40, Oct 1999.

WANG, Y. H.; WILLS-KARP, M. The potential role of interleukin-17 in severe asthma. **Curr. Allergy Asthma Rep.**, v. 11, n. 5, p. 388-94, Oct 2011.

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

WHO (World Health Organization). Asthma. vol. 307, mai. 2007. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs307/en/index.html>>. Acesso em: 12 Jan.2012.

WILLIAMS, C. M. et al. Cytokine pathways in allergic disease. **Toxicol. Pathol.**, v. 40, n. 2, p. 205-15, 2012.

YAMAGUCHI, Y. et al. Purified interleukin 5 supports the terminal differentiation and proliferation of murine eosinophilic precursors. **J. Exp. Med.**, v. 167, n. 1, p. 43-56, Jan 1988.

YAZDANBAKHSH, M.; KREMSNER, P. G.; VAN REE, R. Allergy, parasites, and the hygiene hypothesis. **Science**, v. 296, n. 5567, p. 490-4, Apr 2002.

ZEIDNER, N. S. et al. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus

susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. **Parasite Immunol.**, v. 21, n. 1, p. 35-44, Jan 1999.

ZIMMERMANN, N. et al. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 111, n. 2, p. 227-42; quiz 243, Feb 2003.

_____. Murine eotaxin-2: a constitutive eosinophil chemokine induced by allergen challenge and IL-4 overexpression. **J. Immunol.**, v. 165, n. 10, p. 5839-46, Nov 2000.