

EFEK IMUNOMODULATOR SALIVA NYAMUK *Aedes aegypti* (L.) TERHADAP SISTEM IMUN MANUSIA

Immunomodulatory Effect on Aedes aegypti (L.) Saliva against Human Immune System

Alya Arimbi Simangunsong^{1*} dan Mutiara Widawati²

¹Sekolah Tinggi Ilmu Hayati Institut Teknologi Bandung, Jl. Ganesa No.10, Jawa Barat, Indonesia

²Loka Litbang P2B2 Ciamis, Badan Litbang Kesehatan, Kemenkes RI
Jl. Raya Pangandaran Km.03 Ds. Babakan Pangandaran, Jawa Barat, Indonesia

Abstract. Mosquito's saliva is the main fundamental elements in the acquisition of human blood by mosquito, mosquito's saliva inhibit blood hemostatic response, the influx of saliva also may stimulate the mechanism for effector formation of the host, also in this process we may find some microorganism transmission. By knowing on how the components of mosquito's saliva process in stimulating our immune system, we could ensure the mechanism for pathogens and emerging diseases in our body. Flow Cytometry method used for detecting whether increased concentration of the saliva gland extract (SGE) affecting the proliferation and development of dendritic cells from bone marrow or not, while for the effect of SGE on lymphocytes is using colorimetric test. The concentration response curve was made to see the effect of SGE on *Ae. aegypti* cells (DC) and lymphocytes. The proliferation of DC from bone marrow precursor, its development and its function were not directly influenced by SGE of *Ae. aegypti* (concentration of 2.5 to 40µg/mL). While the results of SGE effects on lymphocytes showed that lymphocytes are extremely sensitive to saliva components. Based on the data, it was concluded that lymphocytes are potential to be a target for the main components of *Ae. aegypti* saliva compared to its dendritic cells.

Keywords: dendritic cells, T cells, *Ae. aegypti*, saliva

Abstrak. Air liur nyamuk merupakan unsur penentu utama pada proses pengambilan darah manusia oleh nyamuk, liur nyamuk menunda respon hemostatis darah, masuknya liur juga dapat merangsang mekanisme pembentukan efektor inang, pada proses ini pula terjadi penularan beberapa jenis mikroorganisme. Dengan mengetahui bagaimana komponen liur dari nyamuk merangsang imun inang dapat membantu kita untuk memastikan mekanisme patogen dan berkembangnya penyakit di dalam tubuh. Sitometri alir digunakan untuk mendeteksi apakah peningkatan konsentrasi ekstrak kelenjar saliva (SGE) mempengaruhi pembelahan dan perkembangan sel dendritik dari tulang sumsum atau tidak, sedangkan untuk pengaruh SGE pada limfosit menggunakan uji kolorimetrik. Kurva respon terhadap konsentrasi dialurkan untuk melihat efek SGE *Ae. aegypti* pada sel dendritik (DC) dan limfosit. Pembelahan sel DC dari prekursor tulang sumsum, perkembangannya dan fungsinya tidak langsung dipengaruhi oleh SGE *Ae. aegypti* (dari konsentrasi 2,5 hingga 40µg/mL). Sedangkan hasil pemeriksaan efek SGE pada limfosit menunjukkan bahwa limfosit sangat sensitif terhadap komponen saliva. Berdasarkan data yang didapatkan, disimpulkan bahwa limfosit potensial untuk menjadi target utama komponen liur *Ae. aegypti* dibandingkan dengan sel dendritiknya.

Kata Kunci: sel dendritik, sel T, *Ae. aegypti*, air liur

Naskah masuk: 03 Desember 2013 | Review 1: 09 November 2013 | Review 2: 20 Desember 2013 | Layak Terbit: 27 Desember 2013

* Alamat korespondensi: e-mail: boocatndut@gmail.com; Telp. (+62)8776802039; Faks: (0265) 639375

PENDAHULUAN

Nyamuk *Aedes aegypti* merupakan vektor utama dari demam dengue dan demam Chikungunya.¹ Pada proses pengambilan darah oleh nyamuk *Ae. aegypti* tidak terlepas dari saliva nyamuk yang bersifat antikoagulan, agregat antiplatelet, dan aktivitas vasodilatasi.² Berdasarkan beberapa penelitian, komponen saliva *Ae. aegypti* meningkatkan infeksi virus baik secara *in-vitro* dan *in-vivo*.³ Machain *et al.* menyatakan terdapatnya korelasi antara paparan nyamuk dengan risiko infeksi.⁴ Sel-sel dendritik merupakan sel yang diperkirakan berperan aktif dalam hal ini, dikarenakan letaknya yang dekat dengan kulit, sel dendritik (DC) berinteraksi langsung dengan komponen saliva nyamuk. Sel-sel ini juga merupakan sel yang pertama bertemu dengan patogen yang ditularkan oleh vektor-vektor ini, maka DC merupakan sel-sel pertama yang menginisiasi respon imun terhadap patogen-patogen tersebut. Setelah kontak DC dengan patogen, DC akan tumbuh dan pindah ke jaringan limfa dan menjadi stimulan sel T respon.⁵ Pada penelitian terdahulu, didapatkan bahwa ekstrak kelenjar liur *Ae. aegypti* (SGE) tidak berpengaruh pada viabilitasnya ataupun produksi IL-12 oleh FSDC (*Fetal Skin Derived DC*).⁶

Komponen imunomodulator dapat membantu meningkatkan terjadinya transmisi agen-agen patogen seperti virus dengue.⁷ Walaupun peran DC penting dalam menghubungkan respon imun adaptif, perlu diketahui efek tersendiri dari liur *Ae. aegypti* pada sel-sel ini, selain itu, penelitian mengenai aktivitas imunomodulator liur *Ae. aegypti* pada antigen dari limfosit masih kurang, oleh sebab itu, Sebagai pendahuluan, penelitian ini bertujuan untuk melihat efek imunomodulator SGE terhadap sel dendritik dan limfosit mencit.

BAHAN DAN METODE

Mencit

Mencit betina BALB/c, dan DO11.10 (ekspresi transgenik TCR untuk urutan OVA 323-339) dikembangkan di Laboratorium Zoology Universitas HUFSS, Korea Selatan.

Nyamuk

Nyamuk jantan dan betina dari *Ae.aegypti* di *rearing* di laboratorium penelitian kesehatan National Institute of Seoul, Korea Selatan. Suhu dijaga pada 26°C, dengan kelembaban 80% dan perbandingan terang gelap 12:12 jam. Larva diberi makan *dogfood* dan nyamuk dewasa diberi pakan gula (sukrosa 10%).

Ekstrak Kelenjar Liur

Nyamuk betina berumur 4-6 hari di imersikan dalam 70% ethanol, kelenjar liur diambil dan dilarutkan dalam PBS, lalu dipindahkan kedalam mikrotube yang mengandung 50 µL PBS dingin. mikrotube lalu dihomogenisasi dan disentrifus dengan kecepatan 14000 g selama 10 menit untuk menghilangkan partikulat dan diambil supernatannya. Supernatan disterilisasi melalui membran nitroselulosa dengan pori-pori 0,2 µm. Alikuot disimpan pada suhu -80°C hingga penggunaan.

Pembelahan dan Perkembangan Sel Dendritik dari Jaringan Tulang Sumsum (BMDC)

BMDC sering digunakan untuk mempelajari sel dendritik. sel tulang sumsum diambil dari tulang sumsum mencit yang dikultur dalam medium (RPMI 1640 dengan FBS, 2mM L-glutamin, 100 U/mL penisilin, 100 µg/mL streptomycin, 25mM Hepes, 2,5 x 10⁻⁵ M 2-mercaptoethanol) dan 20 ng/mL GM-CSF untuk menginduksi pembelahan sel DC⁸).

Untuk mengetahui apakah komponen liur berpengaruh pada proses differensiasi, sel diinkubasi pada suhu 37°C dan 5% CO₂, diambil alikuot 1 mL dan disterilkan pada 24 sumur plat dicampur hanya

dengan medium atau SGE *Ae. aegypti* konsentrasi 2,5 hingga 40 µg/mL (6 ulangan per kelompok). Setelah 4 hari diinkubasi, sel dari tiga ulangan yang tidak bersatu diambil dan dicuci dengan medium. Pada tiga ulangan sisa, setengah volumenya dibuang dan digantikan dengan medium yang mengandung 40 ng/mL GM-CSF dengan dicampurkan konsentrasi SGE atau tidak dicampurkan pada volume yang sama. Pada 7 hari inkubasi, sel dari tiga ulangan yang tersisa diambil dengan cara yang sama.

Sel dan pembelahan sel sumsum menjadi DC dihitung dari masing-masing waktu kultur (4 hari dan 7 hari), perhitungan menggunakan sitometri alir untuk melihat ekspresi marker CD11b dan CD11c.

Untuk uji perkembangan, BMDC diambil dan dikembangkan selama 6 hari dengan GM-CSF seperti sebelumnya. Sel diambil pada konsentrasi 10^6 sel/mL dan didistribusikan kedalam 24 sumur plat steril dengan alikuot 1 mL per sumur. Sel-sel ini diinkubasi semalam dengan medium saja atau medium yang mengandung SGE. Kemudian sel dirangsang dengan lipopolisakarida (LPS) murni (konsentrasi 100 ng/mL) selama 24 jam untuk melihat perkembangannya.

Gambaran Antigen dari Sel Dendritik

Untuk mengetahui gambaran antigen dari BMDC, sel sumsum yang memisah diambil setelah diinkubasi selama 7 hari, dan sel CD11c+ dimurnikan menggunakan kolom magnetik MACS. Larutan BMDC diinkubasi dengan mikrokapsul anti CD11c selama 5 menit pada 4°C, lalu dicuci dengan PBS, dan disortasi menggunakan kolom MACS (MS). Sel CD11c+ di inkubasikan sebelumnya selama semalam pada suhu 37°C dan pada tingkat CO₂ 5% dengan medium atau SGE pada berbagai konsentrasi (2,5; 5; 10; 20; dan 40 µg/mL). Setelah itu, sel diinkubasi selama 4 jam dengan dicampurkan LipoPoliSakarida (LPS 100 ng/mL) ditambahkan OVA (100 µg/mL). Setelah

tiga kali dicuci, sel sebanyak $2,5 \times 10^5$ /mL dipindahkan dalam alikuot 100 µL ke dalam 96 plat sumur. Limfosit CD4+ T dari mencit DO11.1 (yang mengekspresikan transgenik TCR spesifik untuk peptida OVA 323-339) dimurnikan menggunakan kolom MACS. Larutan yang mengandung 10^6 sel/mL disiapkan dan 100 µL ditambahkan ke dalam sumur plat kultur dengan perbandingan DC: limfosit yaitu 1:4, suhu dijaga pada 37°C dan CO₂ 5% selama 72 jam.

Metode yang sama dilakukan, tetapi perbedaannya pada uji ini setelah pencucian, SGE *Ae. aegypti* ditambahkan lagi dari kultur, diteruskan dengan penambahan sel CD4+ dari mencit DO11.1 (yang mengekspresikan transgenik spesifik TCR untuk peptida OVA 323-339). Sel distimulasi oleh OVA (100 µg/mL) ditambah LPS (100 ng/mL) atau con A (0,5 µg/mL). Pada 24 jam terakhir proses pengkulturan, 25 µL 0,01% resazurin ditambahkan ke semua sumur. Proliferasi sel diamati dengan membaca absorbansi pada panjang gelombang 570 dan 600 nm, dan hasilnya disimpulkan dari perbedaan antara hasil pembacaan.

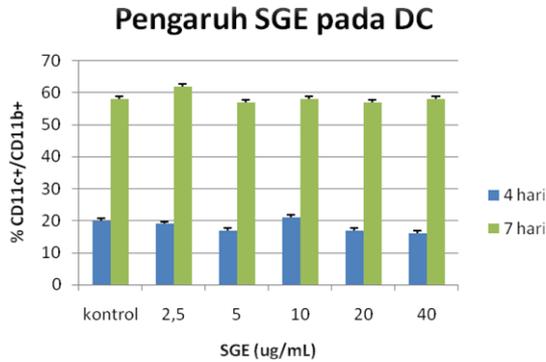
Analisis Data

Analisis perbedaan antara rata-rata nilai tiap kelompok melakukan T-test untuk dua kelompok perbandingan, atau analisis varian (ANOVA) diikuti oleh analisis post-hoc Tukey (untuk tiga atau lebih kelompok). Nilai $p \leq 0.05$ menjadi patokan signifikansi.

HASIL

BMDC (*Bone Marrow Derived DC*) dari BALBc dikultur pada GM-CSF (proinflammatory) dengan berbagai konsentrasi saliva *Ae. aegypti*, uji pembelahan sel diamati dengan menggunakan metoda *flow cytometry* melalui persentase sel CD11c+/CD11b+ pada hari ke-empat dan hari ke-tujuh

kultur (Grafik 1). Berdasarkan Grafik 1, didapatkan data bahwa SGE *Ae. aegypti* tidak berpengaruh pada pertumbuhan sel BMDC pada kultur 4 hari atau 7 hari.



Grafik 1. Persentase relatif sel CD11b+/CD11c+ yang ada pada kultur pada hari ke-4 dan hari ke-7.

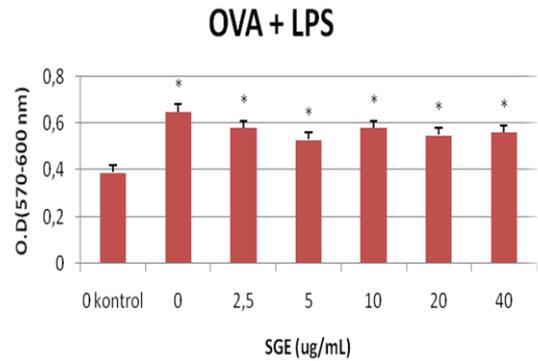
SGE *Ae. aegypti* tidak berpengaruh pada pembelahan sel dendritik. BMDC dari mencit BALBc dikultur dengan GM-CSF dengan ada atau tidaknya SGE *Ae. aegypti* (konsentrasi 2,5).

Untuk mengetahui efek SGE *Ae. aegypti* pada antigen oleh DC, sel CD11c+ murni diinkubasi dengan SGE, beserta OVA (ovalbumin antigen) dan LPS (lipopolisakarida). Setelah dicuci berulang kali untuk menghilangkan residu SGE, OVA dan LPS, sel-sel ini di ko-inkubasi dengan limfosit CD4⁺ T dari tikus D011.1 dan proses proliferasi diamati.⁸

Proliferasi sel CD4⁺ T dengan DC-OVA dibandingkan dengan kontrol (DC yang diinkubasi hanya dengan medium). Saat DC diinkubasi sebelumnya dengan SGE *Ae. aegypti*, proliferasi sel CD4⁺ T tidak berpengaruh (Grafik 2).

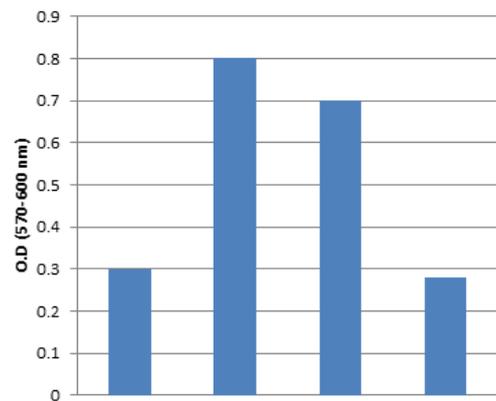
Pada uji selanjutnya, SGE ditambahkan pada kultur setelah pencucian DC, diikuti oleh ko-inkubasi sel T dari mencit D011.1. Dengan kondisi ini, proliferasi sel spesifik antigen CD4⁺ T benar-benar terhenti (Grafik 3). Dengan menggunakan pendekatan yang sama, kultur distimulasi dengan Con A, aktivator poliklonal pada sel T.

Grafik 4 menunjukkan hasil bahwa jika SGE tetap pada kultur, aktivasi poliklonal dari sel T juga terhambat. Semua data tersebut menunjukkan bahwa komponen saliva *Ae. aegypti* mempengaruhi limfosit T setelah pencucian DC.



Grafik 2. Inkubasi dengan sel CD4⁺ dari mencit DO11.1 selama 72 jam.

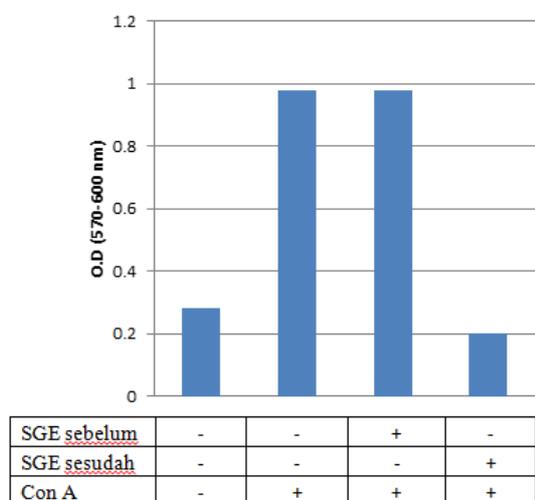
SGE *Ae. aegypti* menghambat proliferasi sel T tanpa campur tangan dari sel dendritik. DC diinkubasikan semalam dengan keadaan ada atau tidaknya SGE *Ae. aegypti* dan distimulasi selama 4 jam dengan OVA (100 µg/mL) dan LPS (100 ng/mL). Setelah tiga kali dicuci, DC diinkubasi dengan sel CD4⁺ dari mencit DO11.1 selama 72 jam.



SGE sebelum	-	-	+	-
SGE sesudah	-	-	-	+
OVA+LPS	-	+	+	+

Grafik 3. Inkubasi dengan sel CD4⁺ dari mencit DO11.1 selama 72 jam

SGE *Ae. aegypti* menghambat proliferasi sel T tanpa campur tangan dari sel dendritik. DC diinkubasikan semalam dengan keadaan ada atau tidaknya SGE *Ae. aegypti* dan distimulasi selama 4 jam dengan dengan OVA (100 µg/mL) dan LPS (100 ng/mL). Setelah tiga kali dicuci, DC diinkubasi dengan sel CD4+ dari mencit DO11.1 selama 72 jam.



Grafik 4. Kultur DC/CD4+ yang serupa juga distimulasi dengan Con A selama 72 jam

PEMBAHASAN

Perilaku mencari pakan darah ada pada beberapa serangga yang secara genetik dan morfologi memiliki bentuk untuk menghisap, mencerna dan menggunakan darah dari vertebrata.⁹ Setelah bertahun-tahun mengalami evolusi, nyamuk telah mengembangkan kelenjar liur yang kompleks dan dapat berpengaruh pada sistem imun inang. Penelitian dibidang ini belum begitu banyak, oleh karena itu, penelitian ini bertujuan untuk mengetahui efek immunomodulator dari komponen saliva vektor nyamuk *Ae. aegypti* pada pembelahan, perkembangan dan fungsi sel dendritik dan pada proses proliferasi limfosit T.

Penelitian-penelitian terdahulu telah menunjukkan bahwa saliva dari *Rhipicephalus sanguineus*, atau yang disebut sebagai caplak anjing, dapat menghambat pembelahan dan perkembangan sel dendritik.¹⁰ Selain itu, Sa-nunes dkk. telah mengisolasi dan mengkarakterisasi prostaglandin E2 (PGE2) sebagai modulator sel dendritik utama pada saliva dari caplak *Ixode scapularis*, vektor dari penyakit lyme.¹¹ Baru-baru ini, PGE2 yang ditemukan pada saliva caplak *Dermacentor variabilis* telah menunjukkan kemampuan untuk mengatur migrasi makrofag dan produksi sitokin oleh sel-sel ini.¹² Selain itu, telah terbukti bahwa PGE2 ada pada saliva *R. sanguineus*, walaupun jumlahnya lebih kecil dari *I. scapularis*.¹³ Kemampuan saliva *R. Sanguineus* untuk mengatur sel dendritik membutuhkan adanya adenosin¹³ dalam prosesnya. Terdapat penelitian juga yang menunjukkan bahwa terdapat aktivitas immunoregulator dan anti inflamasi dari saliva caplak¹⁴ dan komponen-komponen protein lain terbukti dapat menginisiasi fungsi sel dendritik, seperti Salp15¹⁵ dan sialostatin L.⁸ Dua komponen ini dapat ditemukan pada liur *I. scapularis*. Walaupun penelitian-penelitian ini merupakan bukti adanya efek liur caplak pada sel dendritik, sangat sedikit literatur yang diketahui tentang efek yang sama pada serangga pemakan darah. Costa dkk.¹⁶ menunjukkan bahwa lalat *Lutzomyia longipalpis*, yang merupakan salah satu vektor baru leishmaniasis, menghasilkan saliva yang dapat mempengaruhi produksi sitokin dan dapat ikut membantu stimulasi sel dendritik manusia.¹⁶ Beberapa tahun setelah itu, ditemukan bahwa SGE dari lalat spesies *P. duboscqi* dan *P. papatasi* menginisiasi produksi PGE2 dan IL10 dari sel dendritik.¹⁷

Sel dendritik terdiri dari bagian-bagian yang bertanggung jawab dalam perkembangan dan fungsi kelenjar limfoid dan non-limfoid. Sel ini juga ikut dalam proses aktivasi respon imun adaptif.¹⁸

Tetapi, jumlahnya yang sedikit di jaringan menjadi penghambat sel ini untuk digunakan dalam pengujian. Contohnya saja sel Langerhan (populasi sel dendritik dari lapisan epidermis kulit) yang berjumlah 3-5% dari sel epidermis. Sel dendritik seperti sel-sel yang ditemukan pada kulit tersebut, menggambarkan 1-5% jumlah sel total dari jaringan terluar tubuh.¹⁹ Selain itu, meningkatnya jumlah fenotip sel dendritik yang digambarkan dan protokol isolasi yang pada proses pengolahan enzimnya menghancurkan marker merupakan faktor-faktor lain yang harus diperhitungkan.¹⁸ Walaupun sampel BMDC pada penelitian ini tidak secara pasti menggambarkan populasi sel dendritik dari kulit dan epidermis yang mungkin berinteraksi dengan saliva nyamuk, dikarenakan sel yang digunakan berasal dari mencit, tetapi penggunaan sel-sel BMDC mencit untuk mengetahui efek sampel saliva telah dilakukan dan diterima pada penelitian di bidang imunomodulator.^{10,17} Berdasarkan hasil yang didapatkan, ditunjukkan bahwa SGE *Ae. aegypti* ternyata tidak memiliki efek pada proses pembelahan sel dendritik (Grafik 1 dan 2), dan presentasi limfosit T (Grafik 3, 4, dan 5). Untuk mendukung data ini, telah diteliti bahwa SGE *Ae. aegypti* tidak mempengaruhi viabilitas dari sel dendritik hewan coba mencit.⁶ Hasil ini sangat kontras jika dibandingkan dengan data yang digambarkan pada spesies vektor arthropod yang lain yaitu caplak, dikarenakan pada penelitian lain terbukti bahwa saliva caplak secara langsung menghambat pertumbuhan sel dendritik mencit. Tetapi walaupun dengan metoda yang berbeda, data penelitian ini sejalan dengan penelitian yang dilakukan oleh Bizzaro dkk.²⁰ yang menunjukkan bahwa inhibisi sel dendritik oleh komponen saliva dengan metoda uji radioaktif tampaknya tidak berlaku untuk saliva nyamuk *Ae. aegypti*.

Penambahan SGE *Ae. aegypti* pada kultur sel CD11c+ setelah pencucian mengakibatkan penghambatan yang

signifikan pada proses proliferasi spesifik antigen limfosit CD4+ (Grafik 3) dan poliklonal (Grafik 4). Data ini sesuai dengan pernyataan bahwa SGE langsung bereaksi pada limfosit T dan bukan pada sel yang membawa antigennya. Data ini juga sejalan dengan penelitian pada literatur yang menunjukkan bahwa proliferasi limfosit tidak terlihat pada keadaan setelah ditambahkan komponen saliva *Ae. aegypti*.⁶

Perilaku dan strategi pakan darah antara serangga pengonsumsi darah sangatlah berbeda. Caplak lebih memilih untuk kontak dengan kulit inang lebih lama dan berkelanjutan, sementara lalat dan nyamuk merupakan serangga pengonsumsi darah yang berpindah-pindah dan meninggalkan inangnya dalam hitungan menit bahkan detik. Maka tidaklah aneh jika evolusi mereka dalam memodulasi jaringan inang dan sistem imunnya pun berbeda-beda. Sel dendritik yang lebih dekat dengan kulit diperkirakan dapat memberikan respon imun yang lebih cepat dibandingkan dengan sel limfosit. Perlu diadakan penelitian lanjut yang fokus pada lama kontak saliva pada sistem imun inang.

KESIMPULAN

Berdasarkan hasil yang didapatkan, penelitian ini membuktikan adanya potensi interaksi antara komponen saliva *Ae. aegypti* dan sistem imun inangnya. Uji pendahuluan ini menunjukkan bahwa perbandingan hasil inkubasi saliva dari arthropod pengonsumsi darah antara sel dendritik dan limfosit tanpa dendritik berbeda secara signifikan. Maka disimpulkan bahwa saliva bersifat spesifik pada sel limfosit.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut tentang pengaruh lama kontak saliva pada sistem imun inang. Selain itu diperlukan pula penelitian lanjutan untuk mencari apakah selektivitas yang dihasilkan pada

penelitian ini berpengaruh pada perilaku pakan darah dan reproduksi nyamuk.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Program *Winter Short Course of Asian Core Program (SCACP): frontiers of molecular science-life*. Hasil kerjasama Kementerian Pendidikan, Institut Teknologi Bandung, dan Universitas Hufs Korea Selatan, atas biaya dan bimbingannya sehingga uji pendahuluan ini dapat dilaksanakan.

DAFTAR PUSTAKA

1. Scott T, Takken W. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol.* 2012;28(3):114–121.
2. Francischetti I, Sa-Nunes A, Mans B, Santos I, Ribeiro J. The role of saliva in tick feeding. *Front Biosci.* 2009; 14:2051–2088.
3. Surasombatpattana P, Patramool S, Luplertlop N, Yssel H, Misse D. *Aedes aegypti* Saliva Enhances Dengue Virus Infection of Human Keratinocytes by Suppressing Innate Immune Responses. *J Invest Dermatol.* 2012; 132(8):2103–2105.
4. Machain-Williams C, Mammen MJ, Zeidner N, et al. Association of human immune response to *Aedes aegypti* salivary proteins with dengue disease severity. *Parasite Immunol.* 2012; 34(1):15–22.
5. Banchereau J, Steinman R. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998; 392:245–252.
6. Wasserman H a, Singh S, Champagne DE. Saliva of the Yellow Fever mosquito, *Aedes aegypti*, modulates murine lymphocyte function. *Parasite Immunol.* 2004; 26(6-7):295–306. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15541033>.
7. Edward Z, Lestari S, Tenggara A. Faktor Immunomodulator Kelenjar Saliva *Anopheles Sundaicus* Sebagai Target Potensial Dalam Pembuatan Transmission Blocking Vaccine (TBV) Melawan Malaria. 2013;21–30.
8. Sa-Nunes A, Bafica A, Antonelli L, et al. The immunomodulatory action of sialostatin L on dendritic cells reveals its potential to interfere with autoimmunity. *J Immunol.* 2009; 182(12):7422–7429.
9. Lehane M. *The Biology of Blood-Sucking in Insects.* 2nd editio. Cambridge: Cambridge University Press; 2005.
10. Cavassani K, Aliberti J, Dias A, Silva J, Ferreira B. Tick saliva inhibits differentiation, maturation and function of murine bone-marrow-derived dendritic cells. *Immunology.* 2005; 114(2):235–245.
11. Sa-Nunes A, Bafica A, Lucas D, et al. Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in *Ixodes scapularis* saliva. *J Immunol.* 2007;179(3):1497–1505.
12. Poole N, Mamidanna G, Smith R, Coons L, Cole J. Prostaglandin E2 in tick saliva regulates macrophage cell migration and cytokine profile. *Parasit Vectors.* 2013;6(1):261.
13. Oliveira C, Sa-Nunes A, Francischetti I, et al. Deconstructing tick saliva: non-protein molecules with potent immunomodulatory properties. *J Biol Chem.* 2011;286(13):10960–10969.
14. Brake D, Perez de Leon A. Immunoregulation of bovine macrophages by factors in the salivary glands of *Rhipicephalus microplus*. *Parasit Vectors.* 2012;5:38.
15. Hovius J, de Jong M, den Dunnen J, et al. Salp15 binding to DC-SIGN inhibits cytokine expression by impairing both nucleosome remodeling and mRNA stabilization. *PLoS Pathog.* 2008;4(2):e31.
16. Costa D, Favali C, Clarencio J, et al. *Lutzomyia longipalpis* salivary gland homogenate impairs cytokine production and costimulatory molecule expression on human monocytes and dendritic cells. *Infect Immun.* 2004;72(3):1298–1305.
17. Carregaro V, Valenzuela J, Cunha T, et al. Phlebotomine salivas inhibit immune inflammation-induced neutrophil migration via an autocrine DC-derived PGE2/IL-10 sequential pathway. *J Leukoc Biol.* 2008;84(1):104–114.
18. Merad M, Sathe P, Helft J, Miller J, Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells

- and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev Immunol.* 2013;31:563–604.
19. Merad M, Ginhoux F, Collin M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells. *Nat Rev Immunol.* 2008;8(12):935–947.
 20. Bizarro B, Baros MS, Maciel C, et al. Effects of *Aedes aegypti* salivary components on lymphocyte biology. *Parasit. Vectors.* 2013;6(1):329. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24230038>.