

Revisão / Review

## Saliva de animais hematófagos: fonte de novos anticoagulantes *Saliva of hematophagous animals: source of new anticoagulants*

Alessandra Ciprandi<sup>1</sup>

Fabiana Horn<sup>1,2</sup>

Carlos Termignoni<sup>1,3</sup>

*Esta revisão tem como objetivo apresentar os anticoagulantes e inibidores da agregação plaquetária que foram encontrados em animais hematófagos. Esses animais precisam inibir as reações hemostáticas no local onde se alimentam no hospedeiro para realizar a refeição sangüínea e também para manter o sangue fluido nos seus próprios tratos digestivos. Devido a essa necessidade, eles desenvolveram ao longo da evolução uma grande diversidade de substâncias que são injetadas no hospedeiro através da saliva e que permitiram o sucesso de seu parasitismo. Tais recursos farmacológicos podem ser utilizados como ferramentas em pesquisa da fisiologia vascular e hemostática, e têm potencial uso terapêutico em doenças cardiovascular. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25(4):250-262.*

**Palavras-chave:** Hematófagos; saliva; anticoagulantes; antiplaquetários.

### Introdução

Os animais vertebrados desenvolveram mecanismos eficientes para evitar a perda de sangue provocada por lesão vascular: vasoconstricção, agregação plaquetária e coagulação sangüínea. A ativação plaquetária é um processo redundante que pode ser iniciado por vários agonistas: ADP liberado de células lesadas e das próprias plaquetas, colágeno exposto dos vasos lesados, trombina produzida após a ativação da cascata da coagulação e PAF (fator de agregação plaquetária) liberado por leucócitos. Esses agonistas agem causando um aumento de cálcio citoplasmático, o que promove a ativação das plaquetas, com alteração da forma discóide para uma forma esférica irregular, exposição de receptores na superfície (receptores de fator de von Willebrand e de fibrinogênio) e

secreção de substâncias contidas em grânulos (ADP, serotonina, fibrinogênio, fator de von Willebrand, fibronectina e PDGF – fator de crescimento derivado de plaquetas).<sup>1</sup>

A formação do coágulo de fibrina resulta de uma série de reações envolvendo proteínas circulantes no sangue como precursores ou formas inativas (zimogênios). Estas reações são mostradas na figura 1. A ativação da cascata da coagulação leva à formação do fator Xa, enzima da classe das serinoendopeptidases que converte protrombina em trombina. A trombina é a enzima responsável pela conversão do fibrinogênio em fibrina. É uma serinoendopeptidase com grande especificidade por seus substratos, que apresenta dois sítios reguladores distintos do sítio ativo. Essas regiões, chamadas exosítios I e II, são carregadas positivamente e importantes para a ligação da enzima com fibrino-

<sup>1</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

<sup>2</sup> Departamento de Biofísica Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

<sup>3</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre.

**Correspondência para:** Alessandra Ciprandi

Laboratório 109 – Caixa Postal 15.005 – 91501-970 – Porto Alegre-RS

Tel. (51) 33166092; Fax: (51) 33167309 – E-mail: aleciprandi@yahoo.com.br



filariose, a leishmaniose, a doença de Lyme, a babesiose canina, a tristeza parasitária bovina e muitas outras.

As substâncias presentes na saliva que é injetada no hospedeiro modificam as características do tecido lesado e isto pode contribuir para a transmissão de patógenos.<sup>3</sup> Colaboraram para tal sugestão estudos nos quais inóculos de *Leishmania major* contendo extratos de glândula salivar de *Lutzomyia longipalpis* foram mais efetivos em causar leishmaniose cutânea do que os mesmos inóculos sem esses extratos.<sup>4</sup>

Por outro lado, foi mostrado que a saliva de *Rhodnius prolixus* infectado com *Trypanosoma rangeli* possui menos substâncias anti-hemostáticas, o que provocaria um aumento no tempo de procura por sangue na pele do hospedeiro pelo inseto e favoreceria a transmissão do patógeno.<sup>5</sup> Deste modo, a redução da eficiência alimentar do vetor pode ser uma vantagem seletiva para o parasita. A possibilidade de neutralizar a ação dos componentes da saliva dos vetores relacionados com o aumento na transmissão de patógenos abre uma nova possibilidade no desenvolvimento de vacinas.<sup>3</sup>

As diminutas quantidades destas substâncias nos organismos dificultam seu estudo. Mesmo assim, o isolamento de agentes anticoagulantes e a caracterização dos seus sítios de ação vêm sendo cada vez maior devido ao desenvolvimento da química de proteínas, da biologia molecular e da elucidação da bioquímica da coagulação.<sup>6,7</sup>

A droga de escolha utilizada atualmente na terapia anticoagulante é a heparina, que inibe trombina via ativação da antitrombina. Embora eficaz e amplamente usada, seu uso apresenta alguns problemas, como a necessidade de antitrombina para ação anticoagulante, incapacidade de inativar a trombina ligada ao coágulo e ligação inespecífica a outras proteínas plasmáticas que não a trombina. Isto contribui para a variabilidade da resposta à dose e a necessidade de monitoramento freqüente para o adequado nível de anticoagulação.<sup>8</sup> Por essa razão, tem sido feito esforço grande para desenvolver novas drogas anticoagulantes.

Serão apresentadas, a seguir, os principais anticoagulantes e antiplaquetários de animais hematófagos estudados até o momento. A tabela 1 mostra uma lista dos organismos que produzem estas moléculas, juntamente com suas propriedades mais importantes.

### 1. Anti-hemostáticos de sanguessugas

Cerca de 75% das espécies de sanguessugas são hematófagas e muitas delas podem ingerir de duas a dez vezes seu próprio peso em sangue em uma única refeição. Esse material pode levar até seis meses para ser digerido e uma refeição pode ser armazenada por um longo período, podendo chegar a um ano e meio.<sup>9</sup> As sanguessugas devem contar, então, com um conjunto de substâncias potentes capazes de conservar o sangue em estado fluido.

O primeiro inibidor de fXa encontrado em sanguessugas foi a antistasina, isolada de glândula salivar de *Haementeria officinalis*. Além da atividade anticoagulante, ela apresenta atividade antimetastática.<sup>10</sup> No processo de inibição (do tipo reversível, *slow, tight-binding*, com  $K_i = 0,47$  nM), a antistasina é clivada pelo fXa, mas mantém a inibição.<sup>11</sup> Sua estrutura é bastante peculiar, apresentando uma homologia entre as metades N-terminal e C-terminal da proteína – dos seus 199 aminoácidos, os resíduos 1-55 (domínio I) são 56% similares aos resíduos 56-110 (domínio II). Isto sugere uma possível duplicação do gene na evolução da antistasina.<sup>12</sup>

Outra molécula com atividade anti-hemostática encontrada na glândula salivar de *H. officinalis* é o LAPP (*Leech Antiplatelet Protein*). Esta molécula inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno por bloquear a adesão das plaquetas ao colágeno.<sup>13</sup>

A sanguessuga *Haementeria ghilianii* utiliza uma estratégia diferente: a glândula salivar produz uma enzima com ação fibrinogenolítica e um inibidor de fXIIIa. A hementina, fibrinogenase de 82 kDa, é uma metalo-endopeptidase com alta afinidade pelo fibrinogênio ( $K_m$  1 mM) (7) e a tridegina é um inibidor pequeno (7,3 kDa) e específico de fXIIIa.<sup>14</sup>

A glândula salivar de *Theromyzon tessulatum* apresenta potente atividade anti-fXa e antitrombina. O inibidor de trombina, teromina, é um homodímero de 14,5 kDa. A presença de 16 resíduos de cisteína sugere uma alta estabilidade para a molécula. A inibição, do tipo *tight-binding*, é muito potente ( $K_i$  12 fM).<sup>15</sup> O inibidor de fXa, terostasina, tem 9 kDa e também apresenta 16 cisteínas.<sup>16</sup> Os dois inibidores são capazes de reduzir a ativação de granulócitos e monócitos por LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), provavelmente por também inibir peptidases que processem moléculas sinalizadoras liberadas pelas células ativadas. A teromina e a terostasina apre-

**Tabela 1**  
**Moléculas anti-hemostáticas isoladas de animais hematófagos**

Animal	Alvo	Nome	PM (kDa)	K <sub>i</sub>	IC <sub>50</sub>	Referência
<b>MOSCAS</b>						
<i>Chrysops spp.</i>	GP1Ib11a	Crisoptina	65	95 pM		53
<i>Glossina morsitans</i>	trombina	TTI	3,5	0,6 pM		49
<i>Haematobia irritans</i>	trombina	Trombostasina	9,2			51
<b>MOSQUITOS</b>						
<i>Aedes aegypti</i>	fXa		35,5			54
<i>Anopheles albimanus</i>	trombina	Anofelina	6,5	5,87 pM		55
<i>Anopheles stephensi</i>	trombina		45			57
<i>Culex quinquefasciatus</i>	PAF		40-50			58
<i>Culicoides variipennis</i>	fXa		28			60
<i>Lutzomyia longipalpis</i>						64
<i>Simulium vittatum</i>	fXa		18			62
<b>BARBEIROS</b>						
<i>Cimex lectularius</i>	tenase (fVIII, fXa, PL)		17			73
<i>Rhodnius prolixus</i>	trombina	Rodnina)	11	0,2 pM		67
		(prolixina-G				
	fVIII	Nitroforina 2				68
		(prolixina-S)				
	ADP	RPAI	19			70
<i>Triatoma pallidipennis</i>	trombina	Triabina	20	3 pM		71
	plaqueta	Palidipina	20			72
<b>CARRAPATOS</b>						
<i>Boophilus microplus</i>	trombina	BmAP	60			30
	trombina	BmAC2	1,7			31
<i>Ixodes ricinus</i>	fXa	Ixodina				6
	trombina	Ixina	7			27
<i>Ixodes scapularis</i>	VIIa/FT/fX(a)	Ixolaris	16		30-420 pM	28
<i>Dermacentor andersoni</i>	GP1Ib11a	Variabilina	5		157 nM	33
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	fXa		65			29
<i>Amblyomma americanum</i>	trombina	Americanina	12	73 pM		42
<i>Hyalomma dromedarii</i>	trombina e fXa	F6	0,72	66 nM		44
<i>Hyalomma truncatum</i>	fXa		17	0,69 nM		45
<i>Ornithodoros moubata</i>	fXa	TAP	6,8	0,59 nM		35
	plaqueta	Moubatina	17		50 nM	38
	trombina	Ornitodorina		1 pM		37
<i>Ornithodoros savignyi</i>	fXa		12	0,83 nM		39
	trombina	Savignina	12	4,89 pM		40
<b>SANGUESSUGAS</b>						
<i>Haementeria ghilianii</i>	fibrinogênio	Hementina	82			7
	fXIIIa	Tridegina	7,3		9,2 nM	14
<i>Haementeria officinalis</i>	fXa	Antistasina	17	0,47 nM		10
	plaqueta	LAPP	16		60 nM	13
<i>Hirudo medicinalis</i>	trombina	Hirudina	7			20
<i>Macrobdella decora</i>	GP1Ib-IIIa	Decorsina	4,4		1,5nM	17
<i>Theromyzon tessulatum</i>	trombina	Teromina	14,5	12 fM		15
	fXa	Terostasina	9	34 pM		16
<b>NEMATÓDEOS</b>						
<i>Ancylostoma caninum</i>	fXa	AcAP	8,7		336 pM	74
<i>Ancylostoma ceylanicum</i>	fXa	AceAP	9,6			77
<b>MAMÍFEROS</b>						
<i>Desmodus rotundus</i>	fXa	Draculina	88,5	15 nM		78
	plasminogênio	DSPA	44			80

sentam alto grau de identidade entre si e com a seqüência da tessulina, um inibidor de tripsina presente neste mesmo animal, sugerindo que estes inibidores tenham evoluído de um gene ancestral que, após duplicação gênica, tenha divergido e gerado peptídeos com especificidades por alvos diferentes.<sup>15</sup>

A sanguessuga *Macrobodella decora* inibe a agregação plaquetária do hospedeiro através da decorsina, um peptídeo pequeno (4,4 kDa) de pl (ponto isoelétrico) ácido com estrutura rígida mantida por três pontes dissulfeto. Apresenta a seqüência de aminoácidos – arginil-glicil-aspartil – (conhecida como motivo RGD) envolvida no reconhecimento do receptor plaquetário de fibrinogênio glicoproteína IIb/IIIa (GPIIb/IIIa), inibindo a ligação do fibrinogênio ao seu receptor.<sup>17</sup>

Mas, sem dúvida, a hirudina é o anticoagulante de sanguessuga mais estudado até hoje. Ela foi primeiro descrita por Haycraft, em 1894,<sup>18</sup> como anticoagulante presente na glândula salivar de *Hirudo medicinalis*, e isolada em 1967 por Markwardt.<sup>19</sup> A hirudina é um peptídeo inibidor de trombina de 7 kDa, composto por uma única cadeia de 65 resíduos de aminoácidos com três pontes dissulfeto intracadeia. Sua porção N-terminal é globular e fortemente compacta devido à presença das três pontes dissulfeto, enquanto sua porção C-terminal é linear, com numerosos resíduos carregados negativamente. Esses últimos resíduos de aminoácidos reagem com o exossítio I da trombina, enquanto os resíduos da porção N-terminal interagem com o sítio catalítico. Esse padrão de interação explica porque a hirudina é altamente específica para trombina e não se liga a outras serino-endopeptidases.<sup>20</sup>

A disponibilidade de hirudina recombinante tem permitido grande avanço nos estudos farmacológicos e de uso clínico. O estudo das características da ligação da hirudina à trombina levou ao desenvolvimento de pequenos compostos sintéticos contendo apenas os domínios necessários para ligação à trombina.<sup>21</sup>

Um desses compostos, a bivalirudina (originalmente nomeada hirulog) tem sido investigada em muitos estudos clínicos e foi aprovada para uso como anticoagulante em angioplastia coronariana nos Estados Unidos e Nova Zelândia.<sup>8</sup> Trata-se de um peptídeo sintético de 20 aminoácidos que interage simultaneamente com o exossítio I e com o sítio catalítico da trombina e produz uma

inibição transitória, já que a porção da molécula ligada ao sítio ativo é clivada e liberada enquanto a porção ligada ao exossítio I permanece ligada. Uma grande vantagem da bivalirudina é a sua capacidade de inibir a atividade da trombina ligada ao coágulo.<sup>8</sup>

Estudos clínicos mostraram que a bivalirudina é eficaz como droga anticoagulante durante angioplastia coronariana, sem apresentar complicações hemorrágicas.<sup>22</sup> A comparação dos efeitos da bivalirudina com heparina concluiu que o uso de bivalirudina tem eficácia similar ao uso da heparina mas com menor risco de sangramento.<sup>23</sup> Por outro lado, o uso da bivalirudina no tratamento de infarto agudo do miocárdio reduziu o risco de novo infarto, quando comparado à heparina e em associação com aspirina e estreptoquinase, mas ocasiona um aumento no sangramento.<sup>24</sup> Uma outra aplicação potencial da bivalirudina seria na trombocitopenia induzida por heparina, condição na qual o uso da heparina é contra-indicado. Os estudos realizados até o momento sugerem que a bivalirudina pode ser útil nestes casos, mas estudos mais rigorosos deverão ser feitos.<sup>25</sup>

## 2. Anti-hemostáticos de carrapatos

Os carrapatos hematófagos são ectoparasitas que inserem suas peças bucais na derme do hospedeiro e permanecem fixados por vários dias. Estes parasitas devem inocular pela saliva um conjunto de substâncias que inibam reações hemostáticas, inflamatórias e imunológicas que seriam desenvolvidas pelo hospedeiro durante o prolongado contato.

### 2.1 Família Ixodidae (carrapatos duros)

Sabbatani, em 1899,<sup>26</sup> foi o primeiro a demonstrar que extratos de corpo inteiro de *Ixodes ricinus* previnem a coagulação sanguínea. Mais tarde, essa atividade foi caracterizada como um inibidor de fXa e denominada de ixodina.<sup>6</sup> *I. ricinus* apresenta também um inibidor de trombina denominado ixina, que inibe também a agregação plaquetária induzida por trombina.<sup>27</sup>

Recentemente, foi obtido a partir de uma biblioteca de DNAC (DNA complementar) de glândula salivar de *Ixodes scapularis* (*I. dammini*) um clone de DNAC com homologia ao inibidor da via extrínseca da coagulação TFPI (*tissue factor pathway inhibitor*). A proteína recombinante obtida é um inibidor específico de fVIIa/FT (fator tecidual)

dependente de fX ou fXa. O ixolaris, como esse inibidor foi chamado, apresenta similaridade com membros da família de inibidores Kunitz. O mecanismo de ação proposto para o ixolaris é a interação com fVIIa/FT via domínio Kunitz 1 e com fX(a) via domínio Kunitz 2, formando um complexo quaternário fVIIa/FT/ixolaris/fX(a).<sup>28</sup>

*Rhipicephalus appendiculatus* apresenta um anticoagulante de alto peso molecular na glândula salivar. É uma proteína de 65 kDa que inibe protrombinase.<sup>29</sup> O carrapato bovino *Boophilus microplus*, que causa prejuízos anuais de cerca de 2 bilhões de dólares à bovinocultura brasileira, conta com dois inibidores para a mesma etapa da coagulação sanguínea, a inibição de trombina impedindo a formação de fibrina. Um desses inibidores purificados de saliva, BmAP (*Boophilus microplus Anticoagulant Protein*), é uma proteína de 60 kDa, enquanto o segundo, BmAC2, é um peptídeo de apenas 1,7 kDa. Ambos inibem a agregação plaquetária induzida por trombina, mas interagem com a enzima de maneira diferente. O BmAP liga-se ao sítio ativo e provavelmente ao exossítio I.<sup>30</sup> O BmAC2, por sua vez, provavelmente liga-se apenas ao exossítio I, já que o anticoagulante inibe a atividade da trombina sobre fibrinogênio e sobre substrato peptídico sintético longo, mas não altera a atividade da enzima sobre substratos sintéticos de cadeia peptídica com pequeno número de resíduos de aminoácidos.<sup>31</sup>

Outros alvos de anticoagulantes de glândulas salivares de carrapatos são os fatores V e VII, como no caso de *Dermacentor andersoni*.<sup>32</sup> A saliva deste carrapato possui ainda um peptídeo de 5 kDa, denominado variabilina, que inibe a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e trombina, e também inibe a adesão do fibrinogênio à GPIIb/IIIa. Este peptídeo contém a seqüência RGD, envolvida no reconhecimento do receptor plaquetário GPIIb/IIIa.<sup>33</sup>

### 2.2 Família Argasidae (carrapatos moles)

Dentro dessa família, o gênero *Ornithodoros* é o mais bem estudado, apresentando atividades anti-fXa, antitrombina e antiagregação plaquetária. Hellmann e Hawkins<sup>34</sup> descreveram a presença de atividade anticoagulante em glândula salivar, intestino, embriões e fluido coxal de *Ornithodoros moubata*, caracterizando-a como antitrombina. Posteriormente, Waxman e colegas<sup>35</sup> isolaram um inibidor de fXa que denominaram de TAP (*Tick*

*Anticoagulant Peptide*). Através de técnicas de DNA, este inibidor foi obtido nas quantidades necessárias para estudos de caracterização da molécula e estudos pré-clínicos. O TAP é um peptídeo de 6,8 kDa e pl ácido, com inibição do tipo reversível, *slow, tight-binding* e  $K_i = 0,59$  nM. Estudos comparando TAP recombinante e heparina em modelo de trombose arterial em primatas mostraram que ele inibe a formação do trombo sem efeitos adversos na hemostasia primária.<sup>36</sup>

O inibidor de trombina, ornitorina, é um peptídeo potente ( $K_i = 1$  pM), que liga-se ao sítio ativo da enzima através de sua extremidade N-terminal e ao exossítio I através da extremidade C-terminal.<sup>37</sup> Deste carrapato foi ainda isolado um inibidor de agregação plaquetária de 17 kDa, a moubatina. Ela é específica para agregação plaquetária induzida por colágeno mas não tem efeito sobre a adesão de plaquetas ao colágeno.<sup>38</sup>

Outro carrapato do mesmo gênero, *O. savignyi*, também apresenta várias atividades anti-hemostáticas. Um inibidor específico de fXa isolado de glândula salivar, de 12 kDa, apresenta similaridade com TAP, e  $K_i$  semelhante (0,83 nM), com inibição tipo competitiva, *slow, tight-binding*.<sup>39</sup>

A savignina, inibidor de trombina de glândula salivar, apresenta homologia com um anticoagulante de *O. moubata*, a ornitorina. É um peptídeo de 12,4 kDa específico para trombina. Este inibidor liga-se ao sítio ativo e ao exossítio I e também inibe a agregação plaquetária induzida por trombina.<sup>40</sup>

A saliva de *Amblyomma americanum* inibe fXa e trombina. O inibidor de trombina foi purificado a partir de extratos de glândula salivar e caracterizado como sendo um potente ( $K_i = 73$  pM) peptídeo de 12 kDa, denominado americanina.<sup>41,42</sup>

Embrião e ninfas do carrapato de camelo *Hyalomma dromedarii* apresentam atividade anticoagulante. Em embrião, há um peptídeo de 720 Da que inibe trombina e fXa com afinidades semelhantes ( $K_i = 65$  nM).<sup>43</sup> Em ninfas, um inibidor não-competitivo de fXa de 15 kDa, também age sobre trombina.<sup>44</sup> O carrapato *H. truncatum* possui um inibidor não-competitivo de fXa de 17 kDa na glândula salivar.<sup>45</sup>

### 3. Anti-hemostáticos de moscas

As moscas hematófagas causam lesões de capilares e alimentam-se ingerindo o sangue resul-

tante destes hematomas. Substâncias anti-hemostáticas presentes na saliva desses animais ajudam a promover a formação desses hematomas.<sup>46</sup>

O primeiro relato de atividade anticoagulante na mosca tsé-tsé (*Glossina morsitans morsitans*) foi feito em 1966 por Hawkins,<sup>47</sup> que detectou um ativador de plasminogênio na glândula salivar e uma atividade anticoagulante atribuída a um inibidor de trombina. Foram também encontradas duas frações com inibidores da agregação plaquetária: um componente de alto peso molecular (>30 kDa) com atividade ADPásica e inibidora da agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e adrenalina, e um componente de menor peso molecular (11-13 kDa) que inibe a agregação plaquetária induzida por trombina.<sup>48</sup> Esta molécula, o TTI (*Tsetse Thrombin Inhibitor*) é um pequeno peptídeo (3,5 kDa) com alta atividade inibitória ( $K_i = 0,6 \text{ pM}$ ) sobre trombina.<sup>49</sup>

Estudos posteriores mostraram que o gene que codifica o TTI é expresso na glândula salivar e no intestino, e a expressão é induzida pela alimentação. Esse anticoagulante apresenta então função dupla: evitar a coagulação sanguínea no local da lesão no hospedeiro, permitindo a alimentação, e manter o sangue fluido no trato digestivo do parasita.<sup>50</sup>

A mosca-dos-chifres, *Haematobia irritans*, espécie na qual ambos os sexos são hematófagos, também contém um inibidor salivar de trombina, a trombostasina. Essa molécula, de 9,2 kDa e pl ácido, inibe a agregação plaquetária induzida por trombina e bloqueia a atividade da enzima ligando-se ao seu sítio catalítico.<sup>51</sup>

As moscas da família Tabanidae, conhecidas como mutucas, têm na glândula salivar inibidores de trombina, que por técnicas cromatográficas, parecem ser diferentes em cada espécie estudada (*Hybomitra muehlfeldi*, *Tabanus autumnalis*, *Haematopota pluvialis* e *Heptatoma pellucens*).<sup>52</sup>

Na glândula salivar de mutucas do gênero *Chrysops* foi encontrado um potente inibidor de agregação plaquetária induzida por trombina, ADP e colágeno. Esse inibidor, crisoptina, é uma proteína de 65 kDa que age como antagonista do receptor GPIIb/IIIa, impedindo a ligação de plaquetas ativadas ao fibrinogênio, com alta afinidade ( $IC_{50} = 95 \text{ pM}$ ). Uma vez que esta proteína não possui o motivo RGD, ela não age da mesma forma que as desintegrinas encontradas em veneno de serpentes.<sup>53</sup>

#### 4. Anti-hemostáticos de mosquitos

A coagulação sanguínea tem um papel limitado na prevenção da perda de sangue provocada por lesões vasculares pequenas, como é o caso das picadas de mosquito. Para a manutenção do hematoma no qual o mosquito se alimenta, parece que a ação de anticoagulantes não seria necessária. Anticoagulantes de mosquitos devem servir principalmente para manter o fluxo de sangue nas peças bucais.<sup>54</sup> Além disso, substâncias anti-hemostáticas presentes na saliva de mosquitos facilitam a procura por sangue no hospedeiro e reduzem a duração do contato com o hospedeiro. Isso aumentaria a sobrevivência do inseto, já que muitos hospedeiros matam os mosquitos ou impedem-nos de se alimentarem através de movimentos.<sup>46</sup>

O mosquito transmissor da malária *Anopheles albimanus* possui um inibidor de trombina na glândula salivar (a anofelina). Este peptídeo de 6,5 kDa inibe tanto a atividade pró-coagulante da enzima como sua atividade pró-agregação plaquetária. A anofelina age sobre a trombina ligando-se simultaneamente ao sítio ativo e ao exossítio I, com alta afinidade ( $K_i = 5,87 \text{ pM}$ ), produzindo uma inibição do tipo competitiva *slow, tight binding*.<sup>55,56</sup> Diferentemente, a saliva de *Anopheles stephensi* possui um inibidor de trombina de 45 kDa.<sup>57</sup>

A atividade anticoagulante das glândulas salivares de fêmeas do transmissor da febre amarela e da dengue, *Aedes aegypti*, é dirigida ao fator Xa. O inibidor de 54 kDa é termolábil e apresenta similaridade com os membros da família das serpinas, inibidores de serino-endopeptidases largamente distribuídos na natureza.<sup>54</sup>

O mosquito *Culex quinquefasciatus* apresenta, em sua saliva, uma inédita atividade fosfolipásica C específica para o fator de ativação plaquetária, batizada de "PAF-fosforilcolina-hidrolase". A enzima responsável por esta atividade, provavelmente, promove uma modulação negativa nas respostas inflamatórias no hospedeiro, já que, no homem, o PAF é um importante mediador de interações intercelulares. Em alguns animais, como nas aves, o PAF é forte agonista da agregação plaquetária, o que indicaria a adaptação desse mosquito a outros hospedeiros, antes dos humanos.<sup>58</sup>

Membros da família Culicinae (*Culex spp.*, *Aedes spp.*) contêm inibidores de fXa, enquanto os da família Anofelinae (*Anopheles spp.*) contêm antitrombina. Esse fato pode refletir a adaptação a hospedeiros preferidos, devido às mudanças apresentadas na

hemostasia dos vertebrados, ou à evolução independente após separação das duas subfamílias.<sup>59</sup>

O mosquito-pólvora *Cullicoides variipennis* apresenta um inibidor de fXa de 28 kDa em seu arsenal anti-hemostático.<sup>60</sup>

Anticoagulantes sintetizados por membros da família *Simuliidae* (borrachudos) são direcionados à via comum da cascata da coagulação, tendo como alvos o fator Xa, em *Simulium metallicum* e *S. ochraceum*, e o fator Xa e trombina, em *S. argus* e *S. vittatum*.<sup>61</sup> Essa última espécie foi melhor estudada, e o inibidor de fXa de glândula salivar foi purificado e caracterizado como sendo uma proteína de 18 kDa com inibição do tipo *tight-binding*.<sup>62</sup> Foi ainda isolado de glândula salivar desta espécie um outro anticoagulante cujo alvo é o fator V da coagulação.<sup>63</sup>

O estudo das atividades farmacológicas presentes na glândula salivar do mosquito-palha, *Lutzomyia longipalpis*, transmissor da *Leishmania sp.*, seguiu uma abordagem diferente da usualmente empregada, que começa pela identificação de compostos ativos e sua purificação até a obtenção da seqüência primária da proteína de interesse.

Ribeiro e colegas<sup>64</sup> analisaram diretamente clones de DNAc glândula-específicos obtidos de uma biblioteca de DNAc de glândula salivar. Foram isolados clones que apresentaram homologies com DNAc codificadores de proteínas que podem estar relacionadas com a hematofagia.<sup>64</sup> Este achado é coerente com as atividades encontradas na saliva: apirásica, 5'-nucleotidásica, hialuronidásica, anticoagulante e ainda a presença de um peptídeo contendo o motivo RDG (relacionado com inibição da agregação plaquetária).

### 5. Anti-hemostáticos de barbeiros

Assim como nos mosquitos, a saliva dos triatomíneos, injetada durante a fase exploratória, tem grande importância na localização dos vasos sanguíneos.<sup>46</sup>

Hellmann e Hawkins<sup>65,66</sup> foram os primeiros a estudar anti-hemostáticos em *Rhodnius prolixus*. Foram detectadas duas atividades anticoagulantes: uma no trato digestivo, caracterizada como anti-trombina (nomeada prolixina-G), e outra na glândula salivar, atribuída inicialmente à inibição do fator VIII pela prolixina-S.

Friedrich e colegas isolaram, em 1993,<sup>67</sup> um inibidor de trombina de extratos de corpo inteiro de *R. prolixus*, nomeado rodnina, que correspon-

deria à prolixina-G. O inibidor de 11 kDa e pl ácido é específico para trombina, com a qual forma complexo 1:1 com alta afinidade ( $K_i = 0,2 \text{ pM}$ ).

A nitroforina 2, também denominada prolixina-S, é uma heme-proteína de 20 kDa. O alvo do anticoagulante foi determinado como sendo a *tenase* intrínseca, formada pelos fatores VIII, IXa, cálcio e fosfolípídeo.<sup>68</sup> Mais tarde, Isawa e colegas<sup>69</sup> mostraram que a nitroforina 2 liga-se ao fIXa interferindo na sua associação com fosfolípidios na composição do complexo da *tenase* intrínseca. O anticoagulante liga-se também ao fIX, inibindo sua ativação pelo fXIa e pelo complexo fVII-FT.

Além de anticoagulantes, *R. prolixus* dispõe também em suas glândulas salivares de dois inibidores de agregação plaquetária, RPAI-1 e RPAI-2 (*Rhodnius prolixus Aggregation Inhibitor*). Eles inibem a agregação plaquetária induzida por colágeno, por ácido araquidônico e por baixas concentrações de ADP. O mecanismo de ação é por seqüestro de ADP, sem atividade ADPásica, impedindo assim as respostas das plaquetas a este agonista. A confirmação deste mecanismo veio com a análise do DNAc, que mostrou homologia entre o inibidor e proteínas da família das lipocalinas, proteínas dotadas de uma cavidade adaptada para ligar pequenas moléculas.<sup>70</sup>

O barbeiro *Triatoma pallidipennis* conta com duas proteínas salivares que atuam sobre eventos anti-hemostáticos distintos: a triabina, inibidor de trombina, e a palidipina, inibidor da agregação plaquetária induzida por colágeno. A triabina é um inibidor específico da trombina, forma complexo 1:1 não covalente e é capaz de inibir a agregação plaquetária induzida por trombina. Provavelmente a interação com a enzima dá-se somente pelo exossítio I, já que a triabina não inibe a atividade amidolítica sobre substratos sintéticos pequenos (ocorre no sítio ativo), mas inibe a clivagem do fibrinogênio e a ativação de proteína C por trombina-trombomodulina (ações mediadas pelo exossítio I). A constante de inibição é extremamente baixa (3 pM).<sup>71</sup> A palidipina inibe especificamente a agregação plaquetária induzida por colágeno. Ela não altera a adesão das plaquetas ao colágeno, mas inibe a liberação de ADP por plaquetas e parece bloquear a transdução de sinal que leva à ativação plaquetária.<sup>72</sup>

A glândula salivar do percevejo *Cimex lectularius* possui um anticoagulante que inibe a ativação de fX a fXa pela *tenase* intrínseca (forma-



da pelos fatores VIII, IXa, cálcio e fosfolípido). Este anticoagulante não inibe fIXa e nem fVIII, e, possivelmente, liga-se ao zimogênio fX, impedindo sua ativação.<sup>73</sup>

### 6. Anticoagulantes de ancilóstomas

Alguns helmintos também dependem da hematofagia como fonte alimentar. Em 1995, Cappello e colegas<sup>74</sup> isolaram um inibidor específico de fXa de extratos de corpo inteiro do nematódeo *Ancylostoma caninum*, AcAP (*Ancylostoma caninum Anticoagulant Protein*). Ele foi caracterizado como um peptídeo de 8,7 kDa que inibe a conversão da protrombina em trombina. Utilizando estratégias de clonagem molecular, Stanssens e colegas<sup>75</sup> caracterizaram uma família de peptídeos anticoagulantes correspondentes ao já descrito AcAP. Esses peptídeos homólogos (AcAP5, AcAP6 e AcAPc2) inibem a formação de trombina pela protrombinase, possuem dez cisteínas, pl ácido e apresentam similaridade com membros da família de inibidores de serino-endopeptidases de *Ascaris*, os quais são clivados pela enzima-alvo (fXa) durante a inibição. AcAP5 e AcAP6 inibem a atividade do fator Xa ligando-se ao sítio ativo da enzima, e o AcAP5 inibe também fXIa. Por outro lado, AcAPc2 age sobre o complexo fVIIa/FT na presença de fXa, sendo que o mecanismo de ação proposto envolve a ligação do AcAPc2 ao exossítio do fXa, com a formação de um complexo inibitório quaternário entre AcAPc2/fXa/fVIIa/FT.

Outro ancilóstoma, parasita de humanos, *A. ceylanicum*, possui atividades anticoagulante e antiagregação plaquetária induzida por colágeno e ADP (76). Baseados na seqüência de aminoácidos dos anticoagulantes de *A. caninum*, AcAP5 e AcAPc2, foram construídos oligonucleotídeos iniciadores utilizados na identificação e isolamento de um clone de DNAC a partir de uma biblioteca de DNAC de *A. ceylanicum*. O peptídeo recombinante, AceAP1, é um inibidor específico de fXa de 9,6 kDa, homólogo à família de inibidores de serino-endopeptidases de *Ascaris* como AcAP5 e AcAPc2.<sup>77</sup>

### 7. Anticoagulantes de morcegos

O mamífero hematófago morcego-vampiro, *Desmodus rotundus*, conta com o inibidor de fator Xa denominado draculina em sua saliva. É uma glicoproteína de 88,5 kDa e pl ácido cuja atividade é dependente da correta glicosilação da molécula.<sup>78,79</sup>

Além da draculina, o morcego conta ainda com um ativador de plasminogênio, Bat-PA ou DSPA (*Desmodus Salivary Plasminogen Activator*), em sua saliva. É uma glicoproteína que apresenta três variantes truncadas, Bat-PA H, I e L de 44, 40 e 38 kDa respectivamente, e alta identidade com t-PA (ativador tecidual de plasminogênio). Sua atividade é aumentada 45.000 vezes na presença de fibrina, o que parece interessante para a terapia fibrinolítica em casos de trombose.<sup>80</sup> Estudos em animais mostraram que o DSPA teve potente efeito trombolítico e reduziu a reoclusão do vaso quando comparado ao t-PA. Esses estudos revelam ainda vantagens do DSPA sobre t-PA, como a afinidade extremamente alta pela fibrina e o prolongado tempo de meia-vida plasmática.<sup>7,81</sup>

### Conclusão

A chave para o sucesso do parasitismo de animais hematófagos está na habilidade de se evadirem do repertório de agonistas imunofarmacológicos do hospedeiro através da produção de antagonistas salivares específicos.

O estudo destas substâncias tem revelado uma enorme diversidade nas soluções encontradas para a hematofagia. A hematofagia tem origem poli-filética, mas a evolução convergente tem equipado muitos hematófagos com recursos semelhantes para a alimentação sangüínea, não só entre artrópodos mas também nos morcegos, ancilóstomas e sanguessugas.<sup>46</sup>

Essa diversidade natural de compostos pode ser útil em terapêutica ou em pesquisas biomédicas. O isolamento dessas substâncias é limitado não só pelas dificuldades em obter saliva destes animais mas também pelo fato de que estão presentes em quantidades muito pequenas. Como a grande maioria das substâncias anticoagulantes são peptídeos ou proteínas, avanços nos métodos em biotecnologia e síntese abrem novas possibilidades para obtenção desses anticoagulantes em quantidades suficientes para estudos clínicos e pré-clínicos.

O desenvolvimento nesse campo tem sido facilitado por tecnologias como procedimentos de separação de proteínas com alta eficiência, micro-técnicas de seqüenciamento de proteínas e identificação da estrutura. Além da biotecnologia, especialmente os avanços da biologia molecular permitem a produção de algumas destas substâncias

nas quantidades necessárias para investigações bioquímicas, farmacológicas, imunológicas e de estudos pré-clínicos e clínicos.<sup>6,7</sup> Novas abordagens serão possíveis com o estudo de genomas e proteomas, com um conhecimento mais amplo das substâncias que estão sendo sintetizadas e suas origens.

Muitos compostos isolados de animais hematófagos ou análogos desenhados a partir deles têm sido testados para desenvolver drogas mais específicas e seguras, com menos efeitos colaterais sistêmicos como hipotensão e prolongamento do tempo de sangramento. Esta perspectiva é assegurada pelos estudos pré-clínicos e clínicos já realizados com algumas destas moléculas, especialmente os resultados do emprego da hirudina em doenças cardiovasculares. O grande repertório de moléculas com propriedades inibitórias, imunológicas e farmacocinéticas diferentes assegura que drogas anticoagulantes com propriedades mais adequadas para o uso clínico estarão disponíveis em um futuro não distante.

### Abstract

*In this review, we present anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation isolated from hematophagous animals. These animals have to inhibit, at the site of injury, the host hemostasis in order to blood-feed and maintain the blood fluid inside their digestive tract. During evolution, hematophagous animals developed a diversity of anti-homeostatic substances that are injected into the host through their saliva and that are crucial to successful parasitism. These anti-homeostatic substances could be used as tools in vascular physiology investigation and they also have potential therapeutic applications. Rev. bras. hematol. hemoter. 2003;25 (4): 250-262.*

**Key words:** Hematophagous; saliva; anticoagulant; antiplatelet.

### Referências Bibliográficas

- Batlouni M. Ativação plaquetária e trombose arterial. Arq Bras Cardiol 1993;60(6):425-31.
- Loscalzo J, Schafer AI (ed.). Thrombosis and Hemorrhage. 2<sup>o</sup> ed. Baltimore: Williams & Wilkins 1998.
- Ribeiro JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? Infect Agents Dis 1995; 4(3):143-52.
- Titus RG, Ribeiro JM. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. Science 1988;239(4845):1.306-8.
- Garcia ES, Mello CB, Azambuja P, Ribeiro JM. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. Exp Parasitol 1994; 78(3):287-93.
- Markwardt F. Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. Die Pharmazie 1994;49(5):313-6.
- Zavalova LL, Basanova AV, Baskova IP. Fibrinogen-fibrin system regulators from bloodsuckers. Biochemistry (Mosc.) 2002;67(1):135-42.
- Gladwell TD. Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor. Clin Therap 2002;24(1):38-58.
- Villee CA, Walker Jr WF, Barnes RD. Zoologia Geral. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara 1988.
- Tuszynski GP, Gasic TB, Gasic GJ. Isolation and characterization of antistatin. An inhibitor of metastasis and coagulation. J Biol Chem 1987;262(20):9.718-23.
- Dunwiddie C, Thornberry NA, Bull HG, Sardana M, Friedman PA, Jacobs JW, Simpson E. Antistatin a leech-derived inhibitor of factor Xa. Kinetic analysis of enzyme inhibition and identification of the reactive site. J Biol Chem 1989;264(28):16.694-9.
- Nutt E, Gasic T, Rodkey J, Gasic GJ, Jacobs JW, Friedman PA, Simpson E. The amino acid sequence of antistatin. A potent inhibitor of factor Xa reveals a repeated internal structure. J Biol Chem 1988;263(21):10.162-7.
- Connolly TM, Jacobs JW, Condra C. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. I. Identification isolation and characterization. J Biol Chem 1992;267(10):6.893-8.
- Finney S, Seale L, Sawyer RT, Wallis RB. Tridegin a new peptidic inhibitor of factor XIIIa from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. Bioche J 1997;324(3):797-805.
- Salzet M, Chopin V, Baert J, Matias I, Malecha J. Theromin a novel leech thrombin inhibitor. J Biol Chem 2000;275(40):30.774-80.
- Chopin V, Salzet M, Baert J, Vandenbulcke F, Sautiere PE, Kerckaert JP, Malecha J. Therostatin a novel clotting factor Xa inhibitor from the rhynchobdellid leech *Theromyzon tessulatum*. J Biol Chem 2000;275(42): 32.701-7.
- Seymour JL, Henzel WJ, Nevins B, Stults JT, Lazarus RA. Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. J Biol Chem 1990;265(17):10.143-7.
- Haycraft JB. Über die einwirkung eines sekretes des officinellen blutegel auf die gerinnbarkeit des bluts. Naunyn Schmiedeberg's Arch. Exp. Pathol. Pharmak. 1894. 18:209-17. apud Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. Thromb Res 1994; 74(1):1-23.

19. Markwardt, F; Schäfer, G; Töpfer, H; Walsmann, P. Isolation of hirudin from the medicinal leech. *Die Pharmazie*. 1967. 22(6):239-41. apud Markwardt F. The development of hirudin as an antithrombotic drug. *Thromb Res* 1994;74(1):1-23.
20. Salzet M. Anticoagulants and inhibitors of platelet aggregation derived from leeches. *FEBS Lett* 2001;492(3):187-92.
21. Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry* 1990;29(30):7.095-101.
22. Topol EJ, Bonan R, Jewitt D, Sigwart U, Kakkar VV, Rothman M, de Bono D, Ferguson J, Willerson JT, Strony J, et al. Use of a direct antithrombin, hirulog, in place of heparin during coronary angioplasty. *Circulation* 1993;87:1.622-9.
23. Bittl JA, Strony J, Brinker JA, Ahmed WH, Meckel CR, Chaitman BR, Maraganore J, Deutsch E, Adelman B. Treatment with bivalirudin (Hirulog) as compared with heparin during coronary angioplasty for unstable or postinfarction angina. *Hirulog Angioplasty Study Investigators*. *N Engl J Med* 1995;333:764-9.
24. White H. Direct thrombin inhibition and thrombolytic therapy: Rationale for the Hirulog and Early Reperfusion/Occlusion (HERO-2) trial. *Am J Cardiol* 1998;82:57P-62P.
25. Campbell KR, Mahaffey KW, Lewis BE, Weitz JI, Berkowitz SD, Ohman EM, Califf RM. Bivalirudin in patients with heparin-induced thrombocytopenia undergoing percutaneous coronary intervention. *J Invasive Cardiol* 2000;12(Supl.):14F-19F.
26. Sabbatani L. Fermento anticoagulante dell' *Ixodes ricinus*. *Arch Ital Biol* 1899;31:37-53. Apud Markwardt F. Coagulation inhibitors from blood-sucking animals. A new line of developing antithrombotic drugs. *Die Pharmazie* 1994;49(5):313-6.
27. Hoffmann A, Walsmann P, Riesener G, Paintz M, Markwardt F. Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. *Die Pharmazie* 1991;46(3):209-12.
28. Francischetti IM, Valenzuela JG, Andersen JF, Mather TN, Ribeiro JM. Ixolaris a novel recombinant tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick *Ixodes scapularis*: identification of factor X and factor Xa as scaffolds for the inhibition of factor VIIa/tissue factor complex. *Blood*. 2002. 99(10):3602-12.
29. Limo MK, Voigt WP, Tumbo-Oeri AG, Njogu RM, Ole-Moiyoi OK. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Exp Parasitol* 1991; 72(4):418-29.
30. Horn F, dos Santos PC, Termignoni C. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch Biochem Biophys* 2000;384(1):68-73.
31. Ciprandi A, Santos PC, Termignoni C, Chagas JR, Horn F. Purification of a low-molecular-weight thrombin inhibitor from *Boophilus microplus* saliva. In: XXIX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular. Livro de Resumos. Caxambu, 2000, p. 22.
32. Gordon JR, Allen JR. Factors V and VII anticoagulant activities in the salivary glands of feeding *Dermacentor andersoni* ticks. *J Parasitol* 1991;77(1):167-70.
33. Wang X, Coons LB, Taylor DB, Stevens Jr. SE., Gartner TK. Variabilin a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J Biol Chem* 1996;271(30):17.785-90.
34. Hellmann K, Hawkins RI. Action of tick extracts on blood coagulation and fibrinolysis. *Thromb Diath Haemor* 1967;18(4):617-23.
35. Waxman L, Smith DE, Arcuri KE, Vlasuk GP. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 1990; 248 (4955): 593-6.
36. Schaffer LW, Davidson JT, Vlasuk GP, Siegl PKS. Antithrombotic efficacy of recombinant Tick Anticoagulant Peptide. A potent inhibitor of coagulation factor Xa in a primate model of arterial thrombosis. *Circulation* 1991;84:1.741-8.
37. Van de Locht A, Stubbs MT, Bode W, Friedrich T, Bollschweiler C, Hoffken W, Huber R. The ornithodorin-thrombin crystal structure a key to the TAP enigma? *EMBO J* 1996;15(22):6.011-7.
38. Waxman L, Connolly TM. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J Biol Chem* 1993;268(8):5.445-9.
39. Gaspar AR, Joubert AM, Crause JC, Neitz AW. Isolation and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp Appl Acarol* 1996;20(10):583-98.
40. Nienaber J, Gaspar ARM, Neitz AWH. Savignin a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Parasitol*. 1999. 93(2):82-91.
41. Zhu K, Sauer JR, Bowman AS, Dillwith JW. Identification and characterization of anticoagulant activities in the saliva of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *J Parasitol* 1997a;83(1):38-43.
42. Zhu K, Bowman AS, Brigham DL, Essenberg RC, Dillwith JW, Sauer JR. Isolation and characterization of americanin a specific inhibitor of thrombin from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp Parasitol* 1997b;87(1):30-8.
43. Ibrahim MA, Ghazy AH, Khalil MI. The embryos of the camel tick *Hyalomma dromedarii* contain a potent peptide inhibitor of both thrombin and FXa. *J Egypt Ger Soc Zoo* 2000;32:99-114.
44. Ibrahim MA, Ghazy AH, Maharem TM, Khalil MI. Factor Xa (FXa) inhibitor from the nymphs of the camel tick

- Hyalomma dromedarii. Comp Biochem. Physiol B 2001; 130(4):501-12.
45. Joubert AM, Crause JC, Gaspar AR, Clarke FC, Spickett AM, Neitz AW. Isolation and characterization of an anticoagulant present in the salivary glands of the bont-legged tick *Hyalomma truncatum*. Exp Appl Acarol 1995;19(2):79-92.
  46. Ribeiro JM. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. Annu. Rev. Entomol. 1987. 32:463-78.
  47. Hawkins RI. Factors affecting blood clotting from salivary glands and crop of *Glossina austeni*. Nature 1966;212 (5063):738-9.
  48. Mant MJ, Parker KR. Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in in vitro platelet aggregation. Br J Haematol 1981;48(4):601-8.
  49. Cappello M, Bergum PW, Vlasuk GP, Furnidge BA, Pritchard DI, Aksoy S. Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent anti-thrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. Am J Trop Med Hyg 1996;54(5):475-80.
  50. Cappello M, Li S, Chen X, Li CB, Harrison L, Narashimhan S, Beard CB, Aksoy S. Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. Proc Nat Acad Sci USA 1998;95(24):14290-5.
  51. Zhang D, Cupp MS, Cupp EW. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. Insect Biochem Mol Biol 2002;32(3):321-30.
  52. Kazimirova M, Sulanova M, Kozanek M, Takac P, Labuda M, Nuttall PA. Identification of anticoagulant activities in salivary gland extracts of four horsefly species (Diptera: Tabanidae). Haemostasis 2001; 31(3): 294-305.
  53. Reddy VB, Kounga K, Mariano F, Lerner EA. Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. J Biol Chem 2000;275(21):15.861-7.
  54. 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.
  55. Valenzuela JG, Francischetti IM, Ribeiro JM. Purification cloning and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. Biochemistry 1999;38(34):11.209-15.
  56. Francischetti IM, Valenzuela JG, Ribeiro JM. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. Biochemistry 1999;38(50):16.678-85.
  57. Waidhet-Kouadio P, Yuda M, Ando K, Chinzei Y. Purification and characterization of a thrombin inhibitor from the salivary glands of a malarial vector mosquito *Anopheles stephensi*. Biochim Biophys Acta 1998; 1.381(2):227-33.
  58. Ribeiro JM, Francischetti IM. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. J Exp Biol 2001;204(22):3.887-94.
  59. Stark KR, James AA. Salivary gland anticoagulants in culicine and anopheline mosquitoes (Diptera:Culicidae). J Med Entomol 1996;33(4):645-50.
  60. Perez de Leon AA, Valenzuela JG, Tabachnick WJ. Anticoagulant activity in salivary glands of the insect vector *Culicoides variipennis sonorensis* by an inhibitor of factor Xa. Exp Parasitol 1998;88(2):121-30.
  61. Abebe M, Cupp MS, Ramberg FB, Cupp EW. Anticoagulant activity in salivary gland extracts of black flies (Diptera: Simuliidae). J Med Entomol 1994; 31: 908-11.
  62. Jacobs JW, Cupp EW, Sardana M, Friedman PA. Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. Thromb Haemost 1990; 64(2):235-8.
  63. Abebe M, Ribeiro JM, Cupp MS, Cupp EW. Novel anticoagulant from salivary glands of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor V. J Med Entomol 1996;33:173-6.
  64. Charlab R, Valenzuela JG, Rowton ED, Ribeiro JM. Toward an understanding of the biochemical and pharmacological complexity of the saliva of a hematophagous sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Proc Natl Acad Sci USA 1999;96(26):15.155-60.
  65. Hellmann K, Hawkins RI. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius Prolixus* Stal. Nature 1964; 201(492):1.008-9.
  66. Hellmann K, Hawkins RI. Prolixins-S and prolixin-G, two anticoagulants from *Rhodnius prolixus* Stal. Nature 1965;207(994):265-7.
  67. Friedrich T, Kroger B, Bialojan S, Lemaire HG, Hoffken HW, Reuschenbach P, Otte M, Dodt J. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. J Biol Chem 1993;268(22):16.216-22.
  68. Ribeiro JM, Schneider M, Guimaraes JA. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2) the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Biochem J 1995;308(1):243-9.
  69. Isawa H, Yuda M, Yoneda K, Chinzei Y. The insect salivary protein prolixin-S inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. J Biol Chem 2000;275(9):6.636-41.
  70. Francischetti IM, Ribeiro JM, Champagne D, Andersen J. Purification cloning expression and mechanism of action of a novel platelet aggregation inhibitor from the salivary gland of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J Biol Chem 2000;275(17):12.639-50.
  71. Noeske-Jungblut C, Haendler B, Donner P, Alagon A, Possani L, Schleuning WD. Triabin a highly potent exosite inhibitor of thrombin. J Biol Chem 1995; 270(48):28.629-34.

72. Noeske-Jungblut C, Kratzschmar J, Haendler B, Alagon A, Possani L, Verhallen P, Donner P, Schleuning WD. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J Biol Chem* 1994;269(7):5.050-3.
73. Valenzuela JG, Guimaraes JA, Ribeiro JM. A novel inhibitor of factor X activation from the salivary glands of the bed bug *Cimex lectularius*. *Exp Parasitol* 1996; 83(2):184-90.
74. Cappello M, Vlasuk GP, Bergum PW, Huang S, Hotez PJ. *Ancylostoma caninum* anticoagulant peptide: a hookworm-derived inhibitor of human coagulation factor Xa. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92(13):6.152-6.
75. Stassens P, Bergum PW, Gansemans Y, Jespers L, Laroche Y, Huang S, Maki S, Messens J, Lauwereys M, Cappello M, Hotez PJ, Lasters I, Vlasuk GP. Anticoagulant repertoire of the hookworm *Ancylostoma caninum*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93(5):2.149-54.
76. Carroll SM, Howse DJ, Grove DI. The anticoagulant effects of the hookworm *Ancylostoma ceylanicum*: observations on human and dog blood in vitro and infected dogs in vivo. *Thromb Haemost* 1984;51(2):222-7.
77. Harrison LM, Nerlinger A, Bungiro RD, Cordova JL, Kuzmic P, Cappello M. Molecular characterization of *Ancylostoma* inhibitors of coagulation factor Xa. Hookworm anticoagulant activity in vitro predicts parasite bloodfeeding in vivo. *J Biol Chem* 2002;277 (8):6.223-9.
78. Fernandez AZ, Tablante A, Bartoli F, Beguin S, Hemker HC, Apitz-Castro R. Expression of biological activity of draculin the anticoagulant factor from vampire bat saliva is strictly dependent on the appropriate glycosylation of the native molecule. *Biochim Biophys Acta* 1998;1.425(2):291-9.
79. Fernandez AZ, Tablante A, Beguin S, Hemker HC, Apitz-Castro R. Draculin the anticoagulant factor in vampire bat saliva is a tight-binding noncompetitive inhibitor of activated factor X. *Biochim Biophys Acta* 1999;1.434 (1):135-42.
80. Gardell SJ, Duong LT, Diehl RE, York JD, Hare TR, Register RB, Jacobs JW, Dixon RAF, Friedman PA. Isolation characterization and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen-activator. *J Biol Chem* 1989;264(30):17.947-52.
81. Witt W, Maass B, Baldus B, Hildebrand M, Donner P, Schleuning WD. Coronary thrombolysis with Desmodus salivary plasminogen activator in dogs. Fast and persistent recanalization by intravenous bolus administration. *Circulation* 1994;90(1):421-6.

**Avaliação:**

Editor e dois revisores externos

*Conflito de interesse:* não declarado*Recebido:* 27/12/2002*Aceito após modificações:* 15/04/2003