

Tópicos Avançados em Entomologia Molecular

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular

INCT – EM – 2012.



1

## CAPÍTULO 4

# Anti-Hemostáticos da Saliva e Intestino de Animais Hematófagos: Estrutura e Função.

---

**Aparecida S. Tanaka<sup>1</sup>, Carlos Termignoni<sup>2</sup> e Mário Alberto C. Silva-Neto<sup>3</sup>.**

<sup>1</sup> Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, Rua 3 de Maio 100, Vila Clementino, São Paulo, SP, CEP 04044-020.

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica e Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

<sup>3</sup> Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Cidade Universitária, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro, RJ, CEP 21941-902.

Copyright: © 2012 [Aparecida S. Tanaka, Carlos Termignoni e Mário Alberto C. Silva-Neto]. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## Considerações Iniciais.

Os artrópodos respondem por cerca de 80% de todas as espécies de animais metazoários o que corresponde a cerca de um milhão de espécies. Estimativas conservadoras apontam para um número total ainda desconhecido, em torno de 8 milhões de espécies diferentes. De acordo com a hipótese filogenética atual a hematofagia evoluiu independentemente cerca de 20 vezes em diferentes grupos taxonômicos dentro dos artrópodos. Somente na Ordem Diptera a hematofagia evoluiu cerca de nove vezes. Na família Muscidae em especial é provável que a hematofagia tenha evoluído independentemente cerca de quatro vezes pelo menos (Wheeler e cols., 2001; Black IV e Kondrantieff, 2005).

Uma vez que um artrópodo hematófago pousa ou escala até um ponto onde é possível efetuar a perfuração da pele do hospedeiro, vários estímulos locais são usados para identificar a posição adequada onde será feita a refeição. Quimiorreceptores localizados na extremidade das partes bucais ou nas antenas inspecionam a pele na busca de “sabores” adequados. Mecanorreceptores, por sua vez, presentes nas extremidades das partes bucais indicam qual a melhor posição para a penetração da pele. Os hematófagos têm necessidade vital em driblar os mecanismos hemostáticos, inflamatórios e imunológicos dos seus hospedeiros e obter com sucesso o seu repasto sanguíneo. Uma vez que a penetração da pele ocorra, será despejada no sítio de alimentação uma série de moléculas que irão modificar localmente a fisiologia do hospedeiro vertebrado. Tais modificações favorecem o artrópodo hematófago na medida em que aumentam as chances de aquisição de sangue cujas propriedades hemostáticas estão alteradas. Para isto, a saliva de animais artrópodes sugadores de sangue e eventualmente o intestino são verdadeiros arsenais de moléculas com funções anti-hemostáticas. Adicionalmente, a saliva da maioria dos animais hematófagos, também apresenta moléculas que interferem no controle da resposta imune e inflamatório do seu hospedeiro (Ribeiro e Francischetti, 2003). Nesse capítulo iremos revisar principalmente os aspectos funcionais das glândulas salivares do hemíptero hematófago *Rhodnius prolixus*. Um enfoque especial será dado àqueles aspectos que estão sendo objeto de pesquisa por parte do grupo. Existem ao menos 500 gêneros e aproximadamente 19.000 espécies conhecidas de artrópodes hematófagos, no entanto apenas algumas poucas espécies foram estudadas até o momento. Mas, o que foi confirmado nestes estudos é que estas espécies apresentam pelo menos uma anticoagulante, um vasodilatador e um inibidor de agregação plaquetária. A aquisição de sangue pelos animais hematófagos pode ser diretamente do vaso sanguíneo ou de poças de sangue resultado da hemorragia provocada pelo rompimento de vênulas e arteríolas. Animais como, borrachudos ou “black fly”, mosquito palha ou “sand fly” e carrapatos utilizam seus aparelhos bucais para dilacerarem alguns capilares, vênulas e arteríolas, alimentando-se da poça de sangue hemorrágica. Outros animais como os mosquitos e os barbeiros, utilizam o aparelho bucal para penetrar na pele e localizar os vasos sanguíneos por meio da extremidade de suas maxilas, geralmente flexíveis em busca de vasos sanguíneos, processo conhecido como “probing”. Em essencial esse processo ocorre pela movimentação das extremidades dessas maxilas dentro da pele do hospedeiro (Lavoipierre e cols., 1959; Ribeiro, 1995) Os métodos de aquisição

do sangue, portanto, podem dividir-se em: sugá-lo diretamente do vaso (“capillary feeder”) ou lesionar alguns vasos sanguíneos e se alimentar do sangue extravasado (“pool feeder”).

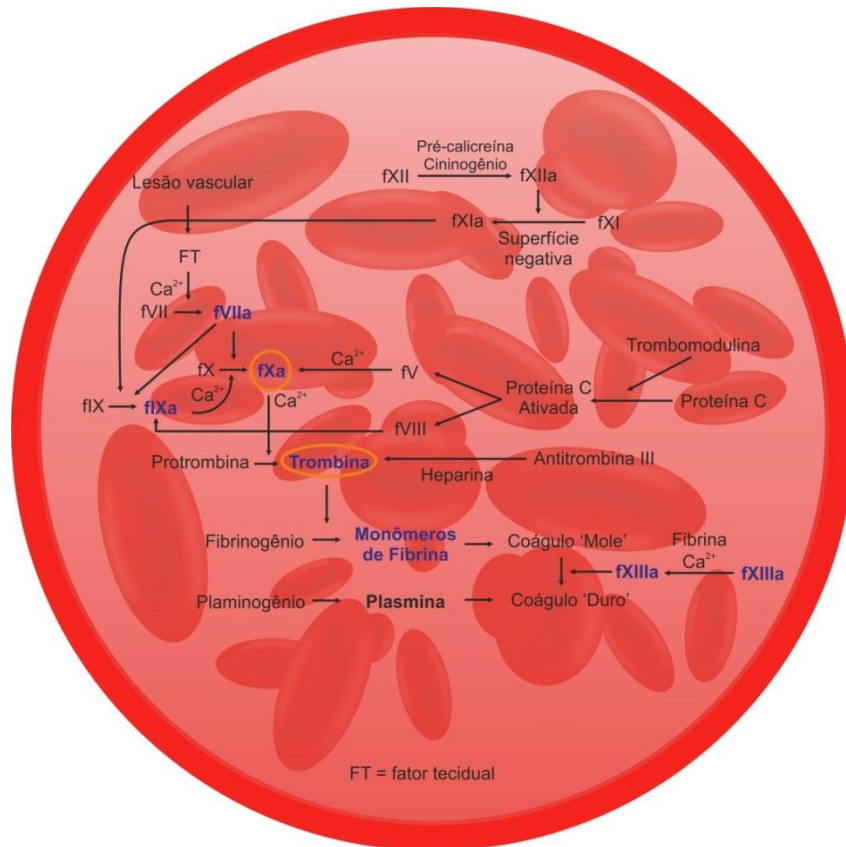
### **Substâncias Anti-Hemostáticas: Uma visão geral.**

Os animais hematófagos desenvolveram ao longo do processo evolutivo, mecanismos diferentes para se opor a hemostasia do hospedeiro durante a refeição sanguínea como: a inibição de agregação plaquetária, a utilização de vasodilatadores, a inibição da coagulação sanguínea e a ativação do processo fibrinolítico (Ribeiro e cols., 1987; Ribeiro, 1989, 1995ab). As estratégias anti-hemostáticas utilizadas pelos animais hematófagos são muito variadas, sendo baseadas em inúmeras substâncias que interferem em diferentes pontos da hemostasia. Diversas substâncias provenientes de animais hematófagos têm sido descritas, sendo grande parte delas provenientes da saliva desses animais. É interessante notar que a saliva dos hematófagos possui substâncias que atuam sobre vários alvos no sistema hemostático do hospedeiro e, em algumas espécies, a saliva possui mais de uma substância que inibi uma mesma enzima

envolvida na hemostasia. Esta redundância faz com que os animais hematófagos sejam extremamente eficientes. Mesmo no caso de espécies que são evolutivamente distantes algumas moléculas com estruturas diferentes atuam sobre um mesmo alvo na hemostasia dos seus hospedeiros (Mans e cols., 1998; Mans e Neitz, 2004).

### **Inibidores da Coagulação Sanguínea.**

Frequentemente inibidores de serinoproteases são encontrados em animais hematófagos, pois a coagulação sanguínea é constituída por uma cascata de reações catalisadas por tais enzimas. Duas delas são enzimas chaves, o fator Xa e a trombina, que participam da via comum da coagulação (Davie e cols., 1991) (Figura 1). Alguns animais apresentam estratégias distintas para controlar a coagulação sanguínea, como o carrapato *Ixodes ricinus* que, ao invés de inibir as enzimas, utiliza uma protease que cliva e inativa alguns fatores da coagulação sanguínea (Hoffmann e cols., 1991). Na tabela 1 estão resumidos alguns inibidores de fatores da cascata de coagulação. A hematofagia, curiosamente, apresenta-se distribuída entre animais invertebrados (Annelidae, Arachnidae e Insecta), mas não exclui os animais vertebrados, exemplo deste é o morcego vampiro (Schleuning e cols., 1992). Esses animais desenvolveram a capacidade de produzir uma variedade de compostos que bloqueiam a resposta hemostática de seus hospedeiros vertebrados (Ribeiro, 1987; Law e cols., 1992).



**Figura 1. Esquema da Cascata da Coagulação Sanguínea.** Geralmente, a coagulação inicia-se pela ativação do fator VII pela associação com o fator tecidual. O fVIIa, uma serinoprotease ativa que cliva o zimogênio fIX, que é ativado à fIXa e que é responsável pela ativação do fX à fXa. A atividade catalítica do IXa sobre o fator X depende da associação com o fVIIIa (um dos componentes não enzimáticos da cascata da coagulação) e com fosfolipídios de membrana. Esta associação ocorre via intermediação com íons  $\text{Ca}^{2+}$  e o complexo formado é denominado de complexo Xase intrínseco. A atividade proteolítica do fator Xa sobre a protrombina depende da sua associação com o fator Va, proteína sem atividade catalítica, e fosfolipídios de membrana por meio de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , formando o chamado complexo protrombinase. A trombina cliva o fibrinogênio liberando moléculas de fibrina, que se polimerizam formando o coágulo “mole”. A trombina também ativa o fator XIII, a qual catalisa a formação de ligações cruzadas entre os polímeros de fibrina, formando, assim, o coágulo “duro”. A trombina também ativa os fatores V e VIII, retroalimentando a cascata. Alternativamente, a coagulação pode ser iniciada pela associação entre pré-caliceína, fator XII e cininogênio de alto peso molecular. A pequena ativação inicial é reforçada porque tanto pela caliceína que ativa o fXII à fXIIa, que por sua vez pode ativar a pré-caliceína à caliceína. E seguida, o fXIIa ativa o XI que, por sua vez, ativa o fXI a fXIa. A notação "a" indica a forma ativa das proteínas da cascata. Paralelamente a ativação da cascata ocorre o controle da mesma, via ativação de proteína C em associação com trombomodulina, que atua na inativação dos fV e fVIII. Outro ponto de controle é a inibição da trombina pela anti-trombina III, uma serpina, a qual é potencializada na presença de heparina. E por fim, após a formação do coágulo, o mesmo pode ser dissolvido pela enzima plasmina proveniente da ativação de plasminogênio.

**Tabela 1.** Substâncias anticoagulantes presentes na saliva/glândula salivar e intestino\* de animais hematófagos.

Espécie	Substância	Enzima inibida	Referência
<i>Haementeria ghilianii</i>	Tridegina	Fator XIIIa	(Finney e cols., 1997)
<i>Haementeria ghilianii</i>	Ghilantina	Fator Xa	Condra e cols., 1989; Blankenship e cols., 1990)
<i>Haementeria officinalis</i>	Antistasina	Fator Xa	(Tuszynski e cols., 1987; Nutt e cols., 1988)
<i>Hirudo medicinalis</i>	Hirustasina	Calicreína	(Sollner e cols., 1994)
<i>Ixodes scapularis</i>	Ixolaris	Fator tecidual	(Francischetti e cols., 2002)
<i>Ixodes scapularis</i>	Pentalaris	Ativação do fator X induzida por fator VIIa/fator tecidual	(Francischetti e cols., 2004)
<i>Amblyomma americanum</i>	Americanina	Trombina	(Zhu e cols., 1997)
<i>Amblyomma variegatum</i>	não caracterizada	Trombina	(Kazimirová e cols., 2002)
<i>Amblyomma hebraeum</i>	Amblina	Trombina	(Lai e cols., 2004)
<i>Rhipicephalus appendiculatus</i>	65 kDa	Fator Xa	(Limo e cols., 1991)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Ornitodorina	Trombina	(van de Locht e cols., 1996)
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAP	Fator Xa	(Waxman e cols., 1990; Vlasuk e cols., 1991)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Savignina	Trombina	Nienaber e cols., 1999)
<i>Hyalomma truncatum</i>	17 kDa	Fator Xa	(Joubert e cols., 1995)
	RAS 1 a 4		
<i>Rhipicephalus microplus</i> ( <i>Boophilus</i> )	BmAP	Trombina	(Horn e cols., 2000)
<i>Rhipicephalus microplus</i> ( <i>Boophilus</i> )	Microfilina	Trombina	(Ciprandi e cols., 2006)
<i>Rhipicephalus microplus</i> ( <i>Boophilus</i> )	Boophilina*	Trombina	(Macedo-Ribeiro e cols., 2008)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Nitroforina 2	Trombina	(Zhang e cols., 1998)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Rodinina*	Trombina	(Friedrich e cols., 1993; van de Locht e cols., 1995)
<i>Hirudo medicinalis</i>	Hirudina	Trombina	(Markwardt, 1970)
<i>Hematobia i. irritans</i>	Trombostasina	Trombina	(Zhang e cols., 2002)
<i>Ancylostoma caninum</i>	NAPc2	FVIIa/TF	(Lee e Vlasuk, 2003)
<i>Anopheles albimanus</i>	Anofelina	Trombina	(Francischetti e cols., 1999)
<i>Anopheles stephensi</i>	Hamadarina	Fator XIIa/Calicreína	(Isawa e cols., 2002)

<i>Simulium vittatum</i>	18 kDa	Fator Xa	(Jacobs e cols., 1990)
<i>Glossina m. morsitans</i>	TTI	Trombina	(Cappello e cols., 1996)
<i>Simulium vittatum</i>	não caracterizada	Trombina e Fator Va	(Abebe e cols., 1996)
<i>Aedes aegypti</i>	AFXa	Fator Xa	(Stark e James., 1995)
<i>Aedes aegypti</i>	AaTI	Trombina	(Watanabe e cols., 2010; 2011)
<i>Anopheles albimanus</i>	6,4 kDa	Trombina	(Valenzuela e cols., 1999)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabina	Trombina	(Noeske-Jungblut e cols., 1995)
<i>Triatoma infestans</i>	Infestina*	Trombina	(Campos e cols., 2002)
<i>Triatoma infestans</i>	Infestina 4*	Fator XIIIa	(Campos e cols., 2004)

TAP - "Tick anticoagulant peptide"; TTI - "Tsetse thrombin inhibitor"; AFXa - "anticoagulant-factor Xa". \* - Moléculas presentes no intestino de hematófagos.

### Inibidores de Fator Xa.

Os animais sugadores de sangue, incluindo os mosquitos, carrapatos e sanguessugas fazem uso de inibidores de fator Xa como anticoagulantes (Waxman e cols., 1990; Sollner e cols., 1994; Stark e James, 1995; Cappello e cols., 1998) para se contrapor a hemostasia dos seus hospedeiros (Tabela 1). Essas substâncias apresentam estruturas diferentes, no entanto tem em comum a alta especificidade para o fator Xa.

### Inibidores de Trombina.

A trombina é uma enzima chave da coagulação sanguínea, pertence à família das serinoproteases apresenta uma massa molecular de 38 kDa e é constituída de duas cadeias polipeptídicas ligadas por quatro pontes dissulfeto. Paralelamente ao papel da trombina na coagulação sanguínea, esta enzima também desempenha importante função em outros processos fisiológicos como inflamação e proliferação celular (Goldsack e cols., 1998). A especificidade da trombina frente a diferentes substratos se dá pela presença de dois sítios de interação (exosítios) além do sítio ativo da mesma, denominados de: sítio de ligação de fibrinogênio e sítio de ligação de heparina (Bode e Huber, 2000). Os animais hematófagos desenvolveram ao longo do tempo, inibidores que bloqueiam a atividade pró-coagulante da trombina por ligação aos exosítios presentes na superfície da molécula. Por exemplo, a sanguessuga *H. medicinalis* produz um inibidor de trombina, a hirudina (Markwardt, 1970), que a inibe especificamente através da ligação ao exosítio 1 (de fibrinogênio) bloqueando indiretamente o sítio ativo da enzima (Grutter e cols., 1990). Este mecanismo de inibição também foi observado para outros inibidores tais como: a ornitorina purificada de carrapato *O. moubata* (van de Locht e cols., 1996) e a rodinina presente no inseto *R. prolixus* (Friedrich e cols., 1993). A triabina (Noeske-Jungblut e cols., 1995) e a microfilina (Ciprandi e cols., 2006), por outro lado, inibem a atividade da trombina por junção ao sítio de ligação iônica não

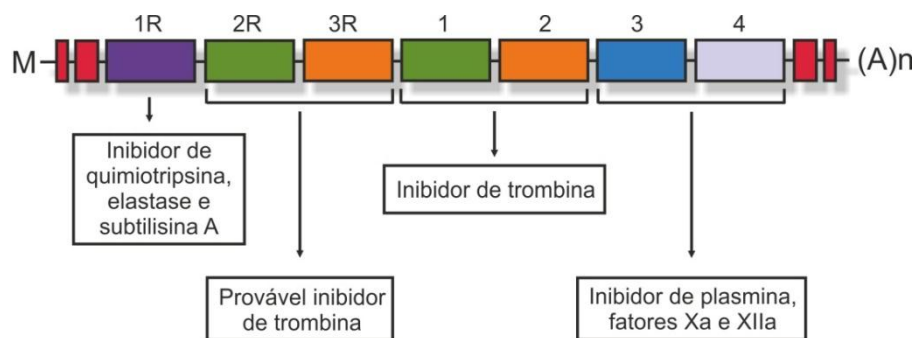


inibindo, portanto, a atividade desta enzima sobre substratos sintéticos de tamanho pequeno. Recentemente, um inibidor de trombina denominado de AaTI foi descrito em mosquito *Aedes aegypti*, este inibidor não interage com o sítio ativo da trombina, os resultados obtidos sugerem que esta molécula atua via exosítio 2 (de heparina) (Watanabe e cols., 2011). Além destes já foram descritas moléculas que utilizam mecanismos de inibição diferentes exemplo deste tem se a anofelina de *Anopheles albimanus* (Valenzuela e cols., 1999). Entre os triatomíneos, grupo de organismos onde estão incluídos os vetores da doença de Chagas foi caracterizado os seguintes inibidores de trombina: a rodinina (Friedrich e cols., 1993) e a dipetalogastina (Mende e cols., 1999), ambos serinoproteases da família denominada tipo Kazal caracterizada por apresentar domínios com massas moleculares de aproximadamente 6 kDa e 3 pontes dissulfeto. A rodinina tem como característica ser um inibidor “double-headed”, o que lhe confere maior especificidade à trombina, visto que o segundo domínio interage com o exosítio 1 (de fibrinogênio) da molécula de trombina (van de Locht e cols., 1995). Estudos cinéticos utilizando o primeiro domínio da rodinina recombinante mostraram constantes de inibição ( $K_i$ ) para a trombina com diferenças de mais de quatro ordens de grandeza quando comparado ao  $K_i$  da rodinina dois domínios. Dados semelhantes foram obtidos analisando-se os domínios que compõem a dipetalogastina (Icke e cols., 2002).

### **Infestinas.**

Um dos vetores da doença de Chagas, o inseto *T. infestans* também produz um potente inibidor de trombina no estômago denominado de infestina que apresentou uma constante de inibição de 43 pM e também capaz de inibir a tripsina ( $K_i = 2$  nM). Baseado na seqüência de aminoácidos da porção N-terminal da infestina, parte do gene foi clonado e sequenciado. A análise da seqüência de nucleotídeos revelou que o mesmo codificava para uma proteína hipotética de 24,3 kDa composta por 222 aminoácidos divididos em 4 domínios do tipo Kazal. Curiosamente, a proteína purificada a partir do estômago do barbeiro era composta pelos dois primeiros domínios do gene que foi renomeada de infestina 1-2. A proteína composta pelos quatro domínios foi chamada de infestina 1-4, e a proteína correspondente aos dois últimos domínios, embora não detectada à época, foi denominada de infestina 3-4 (Campos e cols., 2002). A r-infestina 1-4 foi capaz de inibir não apenas a trombina (0,8 nM) e tripsina (5,2 nM), mas também a plasmina (1,1 nM), fator Xa (60,0 nM) e fator XIIa (78,0 pM). A r-infestina 3-4 inibiu a plasmina (0,4 nM), o fator Xa (18,0 nM), o fator XIIa (67,0 pM) e a tripsina (3,3 nM) (Campos e cols., 2002). Recentemente, o gene completo da infestina que codifica uma proteína contendo sete domínios do tipo Kazal (Lovato e cols., 2006) foi clonado e sequenciado. Os três novos domínios foram chamados de 1R, 2R e 3R e encontram-se na região upstream do gene em relação ao domínio 1 (Figura 2). A infestina 2R-3R apresenta 77% de identidade e 85% de similaridade com a infestina 1-2 indicando que o mesmo possa ser um inibidor de trombina. A r-infestina 1R, quando expressa apresentou-se como um potente inibidor de elastase de neutrófilos humano, de quimotripsina e também de subtilisina A. A ausência da proteína infestina 1-7 no estômago do barbeiro indica que esses inibidores são codificados pelo gene como uma única proteína composta por

sete domínios do tipo Kazal, a qual é processada posteriormente em um ou dois domínios do tipo Kazal, os quais apresentam atividades inibitórias diferentes. Assim, o *T. infestans* utiliza-se das infestinas 2R-3R, 1-2 e 3-4 para bloquear a coagulação sanguínea em seu estômago durante o armazenamento do sangue até o final do processo digestivo. Estas moléculas são produzidas simultaneamente e são capazes de atuar em diversos pontos da cascata da coagulação sanguínea, o que mostra o grau de adaptação desse vetor frente a um hospedeiro vertebrado. A função fisiológica da infestina 1R, ainda não é clara, no entanto recentemente mostrou-se que este inibidor foi capaz de inibir a invasão de células em cultura por *Trypanosoma cruzi* (Lovato e cols., 2011).



**Figura 2. Gene da infestina completa. Esquema da estrutura do gene da infestina.** Os padrões idênticos indicam identidade maior que 75% na estrutura primária entre os domínios Kazal. Em vermelho encontra-se indicado o peptídeo sinal predito e a região contendo o códon de terminação.

### Inibidores da Agregação Plaquetária.

Para garantirem o bloqueio eficiente das defesas hemostáticas dos hospedeiros, além de inibirem a coagulação sanguínea, alguns artrópodos hematófagos também possuem moléculas capazes de inibirem a agregação plaquetária. Um dos mecanismos utilizados envolve o uso de enzimas, como as apirases que hidrolisam tanto ATP como ADP transformando-os em AMP. O ADP é um importante agonista da agregação plaquetária, sendo também liberado por plaquetas já ativadas para agregarem, fazendo assim um “feedback” positivo. A rápida destruição do ADP formado no local da picada por ação de apirases salivares impede a ativação da agregação plaquetária (Ribeiro e Garcia, 1981; Champagne e cols., 1995; Mans e cols., 1998; Valenzuela e cols., 1998; Valenzuela e cols., 2001). Algumas espécies fazem a inativação do ADP por desaminação da adenosina através de adenosina-deaminases salivares (Charlab e cols., 2000; Ribeiro e Modi, 2001). Alguns hematófagos são capazes de inibir a agregação plaquetária por ligação com a glicoproteína IIb-IIIa da superfície das plaquetas (Seymour e cols., 1990; Wang e cols., 1996). Outra estratégia de inibição da agregação plaquetária utilizada por estes animais é o



uso de prostaglandina  $E_2$  e prostaciclina que estimulam a formação de AMP e GMP cíclicos, ambos inibidores da agregação plaquetária (Ribeiro e cols., 1985; Ribeiro, e cols., 1988). Há também substâncias que interferem na interação das plaquetas com o colágeno, bloqueando assim a agregação plaquetária induzida por este agonista (Munro e cols., 1991). Os inibidores salivares da trombina (Tabela 1), além de inibirem a coagulação sanguínea também bloqueiam a atividade dessa enzima sobre os seus receptores presentes na superfície das plaquetas, impedindo assim a ativação plaquetária induzida pela trombina. Na tabela 2 estão mostradas algumas substâncias provenientes de animais hematófagos capazes de interferir na agregação plaquetária de seus hospedeiros.

**Tabela 2.** Substâncias inibidoras de agregação plaquetária presentes na saliva/glândula salivar de animais hematófagos.

Espécie	Substância	Mecanismo	Referência
<i>Aedes aegypti</i>	Apirase-like	Hidrólise de ADP	(Champgne e cols., 1995)
<i>Chrysops spp.</i>	Crisoptina	Inibe ligação com fibrinogênio	(Reddy e cols., 2000)
<i>Culex quinquefasciatus</i>	Fosfolipase	Hidrolisa <i>platelet-activating factor</i> (PAF)	(Ribeiro e Francischetti, 2001)
<i>Dermacentor variabilis</i>	Variabilina	Antagonista de GPIIb/IIIa	(Wang e cols., 1996)
<i>Glossina morsitans</i>	Apirase-like	Inib. AP induz. ADP, colágeno	(Mant e Parker, 1981)
<i>Haementeria officinalis</i>	LAPP	Inib. AP induz. colágeno	(Connolly e cols., 1992; Keller e cols., 1992)
<i>Hirudo medicinalis</i>	Calina	Inib. Interação vW/colágeno	(Munro e cols., 1991; Harsfalvi e cols., 1995)
<i>Ixodes dammini</i>	PGE <sub>2</sub>	Indução de cAMP e cGMP	(Ribeiro e cols., 1985)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Adenosina deaminase	desamina ADP	(Charlab e cols., 2000)
<i>Macrobdella decora</i>	Decorsina	Antagonista de GPIIb/IIIa	(Seymour e cols., 1990)
<i>Ornithodoros moubata</i>	TAI (15 kDa)	Inib. AP induz. ADP, colágeno, e trombina	(Karczewski e cols., 1995)
<i>Ornithodoros moubata</i>	Moubatina	Inib. AP induz. colágeno	(Waxman e Connolly, 1993; Keller e cols., 1993)
<i>Ornithodoros savignyi</i>	Apirase	hidrólise de ADP	(Mans e cols., 1998)
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Adenosina e 5'-AMP	Desloca ADP	(Ribeiro e cols., 1999)
<i>Phlebotomus papatasi</i>	Apirase	hidrólise de ADP	(Valenzuela e cols., 2001)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Apirase-like	Hidrólise de ADP	(Ribeiro e Garcia, 1981);
<i>Rhodnius prolixus</i>	RPAI-1	Sequestra ADP	(Francischetti e cols., 2002a)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Palidipina	Inib. AP induz. colágeno//inib. liberação de ADP	(Haendler e cols., 1995; Noeske-Jungblut e cols., 1994)
<i>Triatoma pallidipennis</i>	Triabina	Inib. AP induz. trombina	(Noeske-Jungblut e cols., 1995)
<i>Triatoma infestans</i>	Apirase-like	Hidrólise de ADP	(Faudry e cols., 2004)

Inib. - Inibição de; AP - Agregação plaquetária; Induz. - Induzido; vW - Fator de von Willebrand; LAPP – “Leech antiplatelet protein” ; TAI – “Tick adhesion inhibitor”.

## Vasodilatadores.

O volume de sangue do hospedeiro vertebrado ocupa cerca de 5% do volume da pele (Ryan, 1976), tornando difícil a localização imediata de vasos sanguíneos pelo animal hematófago durante a picada. Para facilitar a localização dos vasos sanguíneos, os hematófagos utilizam substâncias capazes de dilatá-los facilitando a localização dos mesmos, e conseqüentemente diminuindo o tempo de busca para uma alimentação rápida (por exemplo) o que resulta em um tempo menor de interação com o hospedeiro, aumentando assim a chance de sobrevivência do ectoparasita. Outra vantagem da utilização de vasodilatadores é o aumento do aporte sanguíneo. Dentre as estratégias vasodilatadoras já descritas encontram-se: a utilização de óxido nítrico (NO), um potente vasodilatador, mas como o NO é instável, os insetos (barbeiros) injetam-no associado a uma proteína carreadora como a nitroforina (Andersen e cols., 1997; Andersen e cols., 2000; Ribeiro e cols., 1993); enzimas produtoras de  $H_2O_2$  que podem ser utilizadas na degradação de serotonina e catecolaminas, ambas as substâncias vasoconstritoras (Ribeiro e Nussenzveig, 1993); por fim em carrapatos foi detectada a presença de prostaglandinas  $E_2$ ,  $F_2$  e  $I_2$  (Lerner e cols., 1991; Lerner e Shoemaker, 1992; Ribeiro e cols., 1985), potentes vasodilatadores. Na Tabela 3 encontra-se um sumário de algumas substâncias vasodilatadoras já descritas em animais hematófagos.

**Tabela 3.** Substâncias vasodilatadoras presentes na saliva/glândula salivar de animais hematófagos.

Espécie	Mecanismo	Referência
<i>Aedes aegypti</i>	Taquicinina	(Champagne e Ribeiro, 1994)
<i>Amblyomma americanum</i>	$PGF_2$ e $PGE_2$	(Ribeiro e cols., 1992)
<i>Anopheles albimanus</i>	Peroxidase	(Ribeiro e Nussenzveig, 1993b)
<i>Rhipicephalus microplus</i> (Boophilus)	$PGE_2$	(Dickison e cols., 1976)
<i>Ixodes dammini</i>	$PGE_2$ e $PGI_2$	(Ribeiro e cols., 1985)
<i>Lutzomyia longipalpis</i>	Maxidilan	(Lerner e cols., 1991; Lerner e Shoemaker, 1992)
<i>Rhodnius prolixus</i>	NO	(Ribeiro e cols., 1990; Ribeiro e Nussenzveig, 1993a)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Lisofosfatidilcolina via NO	(Golodne e cols., 2003)
<i>Simulium vittatum</i>	Maridilan	(Cupp e cols., 1994, 1998)

$PGE_2$  - Prostaglandina  $E_2$ ;  $PGF_2$  - Prostaglandina  $F_2$ ;  $PGI_2$  - Prostaglandina  $I_2$ ; NO - Óxido nítrico.

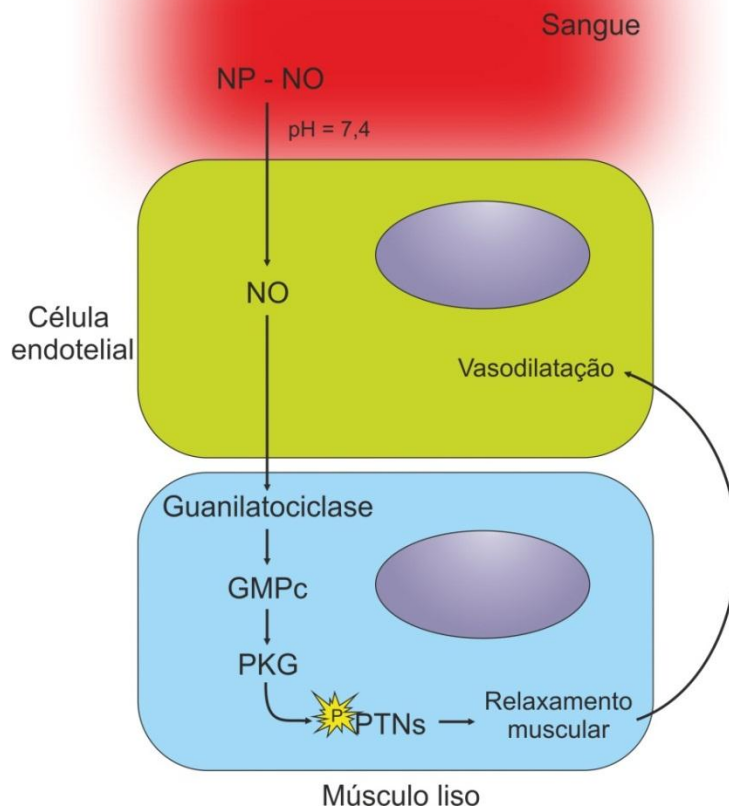
O NO é um gás produto da transformação catalítica da L-arginina em citrulina pela enzima óxido nítrico sintase (NOSs) na presença de calmodulina e vários cofatores como: protoporfirina IX heme, FMN, FAD, BH4 e NADPH. Existem basicamente três tipos diferentes de NOSs (Nussenzveig e cols., 1995; Liu e Huang, 2008; Rafikov e cols., 2011). As NOS podem ser genericamente divididas em: uma NOS neuronal que é encontrada em cérebro e sistema nervoso periférico; uma NOS induzida por citocina que é insensível a cálcio e contém calmodulina fortemente ligada a sua estrutura e é um importante gerador de NO que atua como antimicrobiano ou antitumorigênico; e finalmente, uma NOS endotelial que é predominantemente encontrada na membrana celular e que possui papel importante na transdução de sinal da corrente sanguínea para a camada de músculo liso associada ao vaso induzindo, assim, o relaxamento vascular.

Ribeiro e cols., 1990 demonstraram que os homogenatos de glândulas salivares de *Rhodnius* possuem um vasodilatador com as características gerais do NO. Uma vez que o NO possui uma meia vida extremamente curta ele é na verdade injetado pelo inseto na corrente sanguínea, ligado a um conjunto específico de proteínas denominadas nitroforinas (NPs) (Ribeiro e cols., 1993; Champagne e cols., 1995). Uma vez diluído em pH neutro, as NPs descarregam o NO que, ao interagir com a musculatura lisa do vaso, promove a vasodilatação em função da ativação de uma guanilato ciclase solúvel. A produção de GMP cíclico por tal enzima leva a ativação de uma proteína quinase dependente de nucleotídeo que fosforila proteínas envolvidas no relaxamento do músculo liso subjacente ao vaso.

O NO é na verdade bombeado para o interior da luz da glândula salivar aonde ele se liga a proteínas chamadas nitroforinas (NPs) que serão discutidas adiante. Originalmente de forma curiosa a produção de NO foi justamente demonstrada através de relaxamento de anel de aorta de coelho previamente contraída; por conversão de arginina em citrulina e também pela atividade diaforásica (Ribeiro e Nussenzveig, 1993a). Além disso, foi demonstrado em seguida, que a síntese de NO ocorre no interior das células epiteliais das glândulas salivares, enquanto as NPs são estocadas no lúmen desse órgão (Nussenzveig e cols., 1995). A dinâmica do carregamento das nitroforinas com NO foi também descrita (Nussenzveig e cols., 1995). Esse processo pode ser brevemente resumido da seguinte forma. Após uma alimentação com sangue, as ninfas de quarto estágio de *R. prolixus* perdem cerca da metade do conteúdo de proteínas de suas glândulas salivares. Elas são gradualmente resintetizadas pelo período de cerca de quatro semanas. Durante esse período as NPs são estocadas no lúmen como holoproteínas e o conteúdo total de NO decai gradativamente até atingir um mínimo próximo ao presente no período de muda. Após a muda o conteúdo de NO aumenta rapidamente em função da ativação da NOS. As NPs são então carregadas continuamente até o período da próxima alimentação. A atividade NO sintase nesse sistema estimada via NADPH diaforásica foi acompanhada durante esse ciclo. Ela se encontra em um nível basal logo após a alimentação, dobra em cerca de quatro dias após a muda e então retorna novamente ao nível basal. Esse perfil é semelhante ao carregamento das NPs com NO o que sugere que a atividade da NOS está sob

regulação de forma a prover NO de uma forma sincronizada até o próximo ciclo de alimentação. Em nosso laboratório demonstramos que o nível da NOS antes da muda, medido por “immunoblotting”, é rigorosamente a metade da concentração inicial (Gazos-Lopes e cols., Submetido). Tal perfil é severamente afetado pela infecção das glândulas salivares por *Trypanosoma rangeli* (Mesquita, 2005). Nesse caso, existe uma supressão da produção de NO em função de uma diminuição nos níveis do RNA mensageiro para tal enzima (Mesquita, 2005). O cDNA da NO sintase de *R. prolixus* foi clonado por Yuda e cols, 1996. Esses autores demonstraram que as sequências primárias das NOS de mamíferos, tais como os sítios de reconhecimento de heme, tetrabiopterina, calmodulina, FMN, FAD e NADPH estão todos conservados no gene da NOS do barbeiro. No entanto, diferenças na extensão do N-terminal e do sítio de miristoilação foram encontradas. Esses autores confirmaram, ainda, os resultados cinéticos de Ribeiro e Nussenzveig (1993a), acerca da dependência de cálcio e calmodulina da NOS de *R. prolixus*. Em conjunto esses dados apontam para uma enzima de 130 kDa de peso molecular e que pode ser incluída no grupo das NOS constitutivas descritas em mamíferos. Tal enzima possui altos níveis de expressão nas glândulas salivares de *Rhodnius*, no entanto, os mecanismos moleculares de sua regulação durante o ciclo alimentar permanecem desconhecidos.

A regulação da síntese de NO foi um tema extremamente investigado e evidências de um grande número de modelos mostram que ela ocorre basicamente ao nível da atividade enzimática, da síntese e estabilidade de RNA mensageiro da disponibilidade de cofatores, e da presença de agonistas mobilizadores de cálcio e do processamento pós traducional como, por exemplo, via miristoilação e principalmente por fosforilação reversível em resíduos de serina, treonina ou tirosina. As NOS são, ainda, substratos diretos para diferentes classes de proteínas quinases investigadas até o momento, a saber: cálcio-calmodulina quinase II, proteína quinase C, proteína quinase A, proteína quinase G e tirosina quinase. Essas enzimas estão associadas com diferentes rotas intracelulares de transdução de sinal e reconhecem diferentes sequências consenso em seus substratos. Os seus efeitos na atividade das NOS, em geral, são controversos. Tais resultados podem refletir as diferentes rotas de modulação das NOS e sua relação com o tipo celular em que se encontram. Foi mostrado ainda que, além da fosforilação direta *in vitro* das NOS, uma regulação indireta pode também ocorrer simplesmente através de rotas de transdução de sinal induzidas por diferentes agonistas (Searles, 2006). Glicosilfosfatidilinositóis (GPIs) induzem a expressão da NOS de macrófago em uma via bloqueável por tirfostina e genisteína, inibidores de tirosinas quinase, e também por calfostina C, inibidor de proteína quinase C (Tachado e cols., 1996). Mais recentemente, em insetos foi mostrado que a expressão da NOS ocorre durante a infecção de *Anopheles* e é induzida por GPIs de superfície do parasito, ativando uma via de sinalização que é semelhante a da insulina envolvendo as proteínas quinases AKT e MAPKK e ERK (Lim e cols., 2005). A obtenção dos GPIs de *T. rangeli* irá permitir o mapeamento da via de sinalização capaz de suprimir a expressão da NOS de *R. prolixus*. A NOS, em conclusão, das glândulas salivares de *R. prolixus* é um modelo para a compreensão de aspectos específicos da biologia do NO. Até onde se sabe é o único sistema onde o NO é produzido e ao invés de ser imediatamente utilizado encontra-se associado a proteínas



**Figura 3. Mecanismo de liberação de NO a partir das nitroforinas.** A existência de uma diferença de pH entre a luz da glândula salivar (pH ácido) e o sangue do hospedeiro (pH em torno de 7,0) garante uma mudança brusca de pH durante a injeção da saliva contendo as NPs. Assim o NO liberado na poça de alimentação irá atravessar a célula endotelial e promover a ativação de guanilato-ciclases solúveis presentes no músculo liso o que irá aumentar a concentração intracelular de GMPc e promover o relaxamento muscular e a vasodilatação.



transportadoras. Ademais, essa produção de NO ocorre de forma sincronizada com a expressão das NPs em um ponto bem definido do ciclo de alimentação.

### Ativadores da Fibrinólise e Agentes Fibrinolíticos.

O processo de formação do trombo é redundante, isto é, as várias vias que levam à formação do mesmo se interligam em diversos pontos a fim de manter a hemostasia. Devido à redundância do sistema hemostático, impedir uma via trombogênica pode não ser suficiente em todas as situações, com isso, algumas espécies de animais hematófagos desenvolveram mecanismos que atuam na destruição do trombo. Para tal, já foi descrito que os hematófagos podem utilizar: enzimas que desestabilizam o coágulo, clivando as ligações entre os monômeros de fibrina (Baskova e Nikonov, 1991); enzimas que degradam os polímeros de fibrina e moléculas de fibrinogênio (Malinconico e cols., 1984; Swadesh e cols., 1990; Budzynski, 1991); e enzimas que ativam o plasminogênio a plasmina (Gardell e cols., 1989). Na tabela 4 visualizam-se algumas substâncias de hematófagos que participam da degradação do trombo de fibrina.

**Tabela 4.** Substâncias pró-fibrinolíticas e fibrinolíticas presentes na saliva/glândula salivar de animais hematófagos

Espécie	Substância	Mecanismo	Referência
<i>Desmodus rotundus</i>	Bat-PA	Ativador de plasminogênio	(Gardell e cols., 1989)
<i>Haementeria depressa</i>	Hementerina	Fibrinolítico	(Kelen e Rosenfeld, 1975; Chudzinski-Tavassi e cols., 1998)
<i>Haementeria ghilianii</i>	Hementina	Fibrino(geno)lítico	(Malinconico e cols., 1984; Swadesh e cols., 1990; Budzynski, 1991)
<i>Hirudo medicinalis</i>	Destabilase	Desestabilizador de fibrina	(Baskova e Nikonov, 1991)
<i>Rhodnius prolixus</i>	Roquinase	Uroquinase-like	(Hawkins e Hellmann, 1966)

## Nitroforinas (NPs).

Durante o processo de evolução dos componentes anti-hemostáticos da saliva de *R. prolixus* houve a expansão de uma família de proteínas denominadas lipocalinas (Montfort e cols., 2000). As lipocalinas são proteínas caracteristicamente de baixa massa molecular, extracelulares e com capacidade de ligação de moléculas hidrofóbicas pequenas (Flower, 2000). Existem três grupos principais de lipocalinas na saliva de *R. prolixus*. No primeiro estão as nitroforinas (NPs), heme proteínas ligadoras de óxido nítrico (NO) e histamina e a proteína ligadora de aminas biogênicas (ABP). NPs e ABP estão relacionadas pela similaridade de sequências de aminoácidos que apesar de baixa, resultam em estruturas terciárias com alta similaridade. No segundo está presente uma proteína ligadora de ADP capaz de inibir a agregação plaquetária que é denominada "*Rhodnius prolixus* Aggregation Inhibitor" (RPAI-1) (Francischetti e cols., 2002). Finalmente o último grupo é constituído por lipocalinas ainda pouco caracterizadas e que está relacionado ao inibidor de trombina de *Triatoma pallidipennis* chamado triabina (Fuentes-Prior e cols., 1997). Curiosamente ainda não foi identificada a inibição da atividade da trombina pela saliva de *R. prolixus* que sugerisse a presença de uma proteína do tipo triabina.

As NPs são heme proteínas ligadoras de NO com peso molecular em torno de 20 kDa. Elas foram inicialmente isoladas por fracionamento das glândulas salivares de *R. prolixus* e nomeadas de NP1 a NP4 segundo sua abundância nas glândulas salivares do inseto (Champagne e cols., 1995a; Ribeiro e cols., 1995). De uma forma geral as NPs podem exibir até três atividades anti-hemostáticas: vasodilatadora (atribuída ao NO que transportam, conforme já mencionado acima), anticoagulante e são ainda capazes de ligar histamina. A ligação a NO e histamina é feita através de Fe (III) presente no grupo heme.

A clonagem, expressão e cristalização das NPs permitiram revelar detalhes sobre a sua estrutura. No caso da NP1 tal resultado representou a obtenção da primeira estrutura de uma proteína transportadora de um gás depois da hemoglobina (Weischel e cols., 1998). Cada NP liga apenas uma molécula de heme na cavidade central de uma barril Beta. O heme está ligado a proteína através de um átomo de ferro em coordenação com um resíduo de histidina na segunda fita beta do barril. Na glândula salivar, o NO sintetizado no epitélio se difunde até a luz da glândula e se liga ao átomo de ferro na porção distal do heme. A ligação e a liberação do NO podem ser observadas pela mudança do pico de absorção ou banda de Soret em um espectro cujo máximo será em torno de 420 nm quando o NO estiver ligado a NP e em torno de 404 nm na NP livre de NO (Ribeiro e cols., 1993). Tal complexo é mais estável na faixa de pH de 5 do que no pH fisiológico do sangue em torno de 7,4. Essa diferença assegura a migração do NO a partir da NP para o vaso durante a injeção da saliva na pele do hospedeiro, o que ocorre com um aumento de cerca de cinco a dez vezes na velocidade de dissociação do NO (Andersen e cols.,

2000). Um grupo particular de experimentos demonstrou que a velocidade de liberação de NO seria maior quando ele se encontra estocado nas NPs 1 e 4 ( $2,2-2,6 \text{ s}^{-1}$ ) em pH 8,0 do que nas NPs 2 e 3 ( $0,08-0,12 \text{ s}^{-1}$ ). Um sistema similar de estocagem de NO existe descrito para outro hemíptero o *Cimex lectularius* (Valenzuela e cols., 1995; Valenzuela e Ribeiro, 1998).

As NPs também são capazes de ligar uma molécula de histamina. Essa ligação não é concomitante com o de NO, mas se coordena com o ferro no lado distal do grupo heme. A histamina liberada pelas plaquetas pela degranulação dos mastócitos em hospedeiros previamente sensibilizados em resposta as lesões causadas pelas partes bucais do inseto são absorvidas pelas NPs bloqueando sua ação pró-inflamatória (Ribeiro e Walker, 1994). Essencialmente a histamina liberada irá causar vermelhidão, dor e coceira no local da lesão o que pode dificultar a alimentação do inseto. Curiosamente a histamina consegue remover o NO ligado ao grupo heme das NPs. Esse efeito ocorre no sítio de ligação de NO e a histamina acelera a liberação de NO em condições fisiológicas. Ou seja, durante a dissociação induzida por pH o NO é liberado na circulação e simultaneamente a histamina ocupa o sítio de ligação no grupo heme.

A NP2 é a responsável pela capacidade anticoagulante da saliva de *R. prolixus*. Ela foi descrita inicialmente por Hellmann and Hawkins em 1965 e chamou-se prolixina-S para distingui-la de outro anticoagulante a prolixina-G de "gut" (Hellman e Hawkins, 1964). Posteriormente descobriu-se que a prolixina-S era a NP2. Contrariamente, as NPs 1 e 4 não possuem qualquer atividade anticoagulante. O extrato bruto das glândulas salivares de *R. prolixus* é capaz de prolongar o tempo de coagulação da mistura caolina-cefalina sem afetar o tempo de protrombina, sugerindo que a NP2 é um inibidor da via intrínseca da coagulação sanguínea. Essa proteína é capaz de inibir a formação do complexo Xase intrínseco na superfície aniônica promovida pelos fosfolipídios de membranas de plaquetas ativadas (Zhang e cols., 1998). A NP2 liga-se diretamente ao fator IXa, que possui a atividade enzimática do complexo, mas não parece ser capaz de inibi-la (Isawa e cols., 2000). Dessa forma a NP2 parece interferir na interação do fator IXa com o fator VIIIa ou mesmo com os fosfolipídios de membrana. Apesar de NP2 possuir uma identidade de cerca de 80 % (143 de 180 resíduos de aminoácidos) com a NP3 essa última proteína possui uma atividade anticoagulante cerca de 300 vezes menor.

Moreira e cols. (2003) conduziram uma investigação na qual o perfil de expressão das NPs foi avaliado ao longo das várias mudas de *R. prolixus*. Eles notaram que o perfil de expressão no adulto e nas ninfas de quinto estágio, onde todas as NPs estão presentes, é na verdade o ponto culminante de um processo gradual de expressão cumulativa de NPs. Ou seja, na saliva de primeiro estágio somente está presente a NP 2; a NP 4 surge no segundo ; a NP 1 no terceiro, e a NP 3 somente no quinto. Esses mesmos autores reportaram, ainda, a presença de duas novas NPs, NP5 e NP6 que surgem no primeiro estágio ninfal. Tais proteínas possuem alta homologia com as NPs descritas por Champagne e cols., 1995, ligam NO, mas têm uma banda de Soret dita "não usual" na faixa de 412 nm.

A obtenção de uma biblioteca de cDNAs de glândulas salivares de *R. prolixus* permitiu o conhecimento das seqüências de um número grande de proteínas secretadas na luz das glândulas. Tal estratégia foi denominada sialoma e tem sido empregada para análise de um grande número de salivas de organismos hematófagos (Ribeiro e cols., 2004). Várias dessas sequências foram traduzidas *in silico* e apresentam vários trechos contendo aminoácidos básicos ou que possuem cargas positivas. Entre essas proteínas básicas está um novo membro da família das NPs a NP7. Essa proteína possui uma série de trechos positivamente carregados, capazes de interagir com vesículas contendo fosfatidilserina (PS) ou uma mistura de PS com fosfatidilcolina (PC), mas não com aquelas contendo apenas PC (Andersen e cols., 2004). Esses resultados indicam que a NP7 provavelmente atua como anti-hemostático ao se associar a plaquetas ativadas, onde existem fosfolipídios aniônicos ocupando a porção externa da célula. Nesse local também são formados os complexos Xase e protrombinase. A NP7 parece então bloquear a formação de complexo protrombinase e conseqüentemente inibir a coagulação sanguínea *in vivo*.

### Lipídios Bioativos.

A maior parte dos componentes salivares com atividades anti-hemostáticas descritos até hoje são de natureza protéica. Tais moléculas são de natureza diversa e conforme descrito podem incluir peptídios como as taquicininas (Champagne e Ribeiro, 1994) e o maxadilan (Lerner e cols., 1991), proteínas ligadoras de NO como as NPs descritas anteriormente (Champagne e cols., 1995), e lipídios e seus derivados como as prostaglandinas (Ribeiro e cols., 1992). Mais especificamente a presença de lipídios nas glândulas salivares de um artrópodo hematófago tem sido examinada no carrapato *Amblyomma americanum* pelo grupo do Dr. Sauer da Universidade do Estado de Oklahoma, USA (Shibley e cols., 1993).

Presume-se, que além da saliva mecanismos redundantes de sinalização devam operar de forma a evitar a vasoconstrição no local da picada, uma vez que a alimentação ocorre em questão de minutos. Estes mecanismos estariam baseados na existência de moléculas mensageiras na saliva, além dos anti-hemostáticos que impediriam a reação do hospedeiro numa escala muito rápida de eventos. A primeira dessas moléculas a ser identificada é um lisofosfolipídio a lisofosfatidilcolina (LPC). Essa molécula foi originalmente descrita por nosso grupo na saliva de *R. prolixus* (Golodne e cols., 2003). Nele nós demonstramos que níveis micromolares de LPC são acumulados na luz da glândula durante seu crescimento. Uma vez injetada na pele do hospedeiro, os níveis de LPC são suficientes para bloquear a agregação plaquetária induzida por colágeno e trombina e induzir a expressão de uma NOS em células endoteliais de aorta de porco em cultura. Posteriormente demonstramos que a LPC salivar age como um modulador de varias rotas de sinalização celular de macrófagos. Tal molecula mostrou-se capaz de suprimir a produção de NO em tais células e aumentar a infecção por *T. cruzi* (Mesquita e cols., 2008). O mecanismo parece envolver a ativação de receptores como o G2A ao mesmo tempo em que

bloqueia a ativação de MAPK induzidas pela estimulação de receptores do tipo Toll-Like como esquematizado na Figura 4.

### **Saliva: uma fonte de Imunomoduladores da Infecção por Patógenos.**

Quando os insetos agem como vetores há um aumento na transmissão de patógenos que está diretamente relacionado ao tempo de procura intradérmica pelo vaso. Isso ocorre em virtude da interrelação entre hemostasia, inflamação e resposta imune. Muitas das propriedades que facilitam e/ou contribuem para o sucesso da refeição sanguínea também aumentam a transmissão de patógenos. Na maior parte dos casos os insetos são infectados durante a alimentação e os patógenos são capazes de interagir com as glândulas salivares do vetor no próximo ciclo alimentar (Ribeiro, 1987). Assim duas estratégias principais são encontradas: (1) os componentes da saliva secretados no local da picada aumentam a eficiência da infecção; (2) os patógenos aumentam a probabilidade de sua transmissão modificando as atividades farmacológicas da saliva.

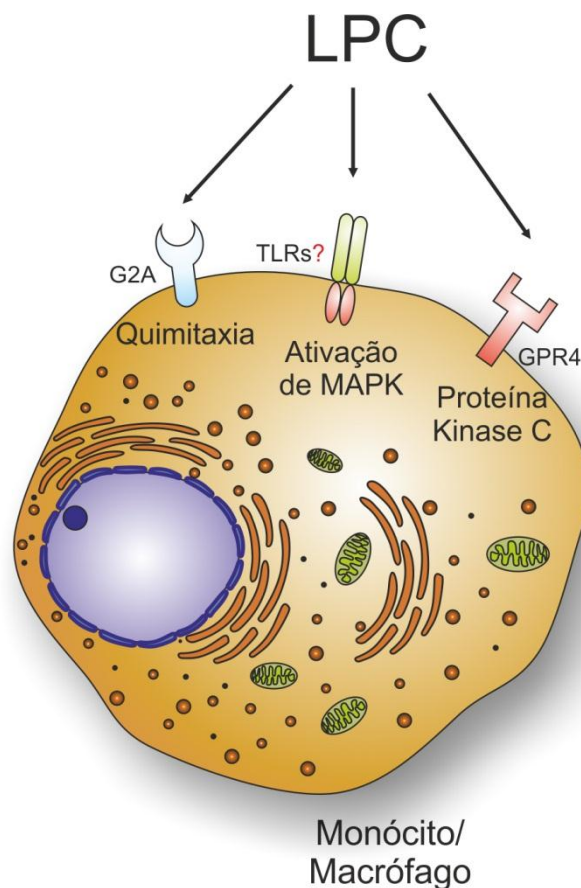
Em relação à primeira hipótese podemos dizer que os alvos da imunomodulação em geral as células do hospedeiro envolvidas na imunidade inata serão atingidas. Esse é o caso das salivas de que contém moduladores de macrófagos, células T e B como descrito em “sandflies”, “blackflies” e mosquitos (revisto em Gillespie e cols., 2006). Os carrapatos possuem um verdadeiro coquetel de moléculas que agem como moduladores de citocinas, inibidores do sistema complemento, inativadores de anafilatoxina e proteínas ligadoras de imunoglobulinas. Em conjunto, tais moléculas atingem além das células do hospedeiro acima mencionadas as células “natural killer” e os neutrófilos.

No caso da leishmaniose para atingir uma infecção experimental em geral são injetados milhões de parasitas na pele de camundongos. No entanto, se tal injeção for acompanhada saliva do vetor *Lutzomyia longipalpis* apenas uma centena de parasitas é suficiente para se obter uma boa infecção experimental. Titus e Ribeiro (1988) demonstraram que a presença da saliva do vetor aumenta a infectividade de *L. major*. Além de aumentar a natureza da lesão o número de parasitas na lesão pode ser cerca de 5000 vezes maior do que as lesões obtidas em camundongos infectados na ausência da saliva. Resultados similares foram obtidos para outros modelos de infecção a saber: *L. longipalpis* x *L. brasiliensis*; *L. longipalpis* x *Leishmania*; *Phlebotomus papatasi* x *L. major*; *Aedes* x vírus da estomatite vesicular; *Aedes* e *Culex* x vírus Cache Valley e carrapatos do gênero *Dermacentor* x vírus da encefalite viral entre outros (revisto por Valenzuela, 2002). A identificação dos fatores envolvidos na exarcebacao da transmissão desse patógenos é tarefa longa e exaustiva e está sendo conduzida em muitos laboratórios ao redor do mundo.

Em relação à segunda hipótese podemos afirmar que no caso dos esporozoítos da malária ocorre a infecção dos lobos distais e mediais da glândula salivar de mosquitos (Rossignol e cols., 1984). Tal invasão leva a uma redução da atividade apirásica o que eleva o tempo de alimentação do inseto e aumenta a transmissão de parasitas. Garcia e cols. (1994) demonstraram que



os componentes anti-hemostáticos da saliva de *R. prolixus* diminuem com a infecção por *T. rangeli*. Homogenatos de glândulas salivares de 30 dias após a infecção possuem uma quantidade menor de proteína por par de glândulas, assim como uma atividade apirásica menor e grupos nitrogênio reativos (Garcia e cols., 1994). No entanto, os mecanismos moleculares utilizados pelo parasita para modificar tais atividades e seus efeitos, ainda não foram investigados. Resultados recentes de nosso laboratório demonstraram que a produção de NO em glândulas infectadas com *T. rangeli* ocorre em função da supressão da expressão da NOS pelo parasita (Gazos-Lopes e cols., Submetido 2012). O mecanismo foi demonstrado via “western blotting” usando-se anticorpos anti-NOS e via imunocitoquímica além de RT-PCR e aponta para um envolvimento dos glicofosfatidilinosídeos de superfície do parasita como um controlador das vias intracelulares de sinalização celular em especial moduladas por proteínas fosfatases.



**Figura 4. Mecanismo de ação da LPC.** A LPC salivar ou plasmática possui vários receptores em células do sistema imune. Entre eles destaca-se mais classicamente o receptor G2A e o receptor GPR4. Em virtude de relatos acerca de sua ação inflamatória e possível que a LPC possa interagir com TLRs tradicionais como o TLR-4.



## Considerações Finais

A complexidade dos sistemas que os animais hematófagos desenvolveram pode ser mais bem compreendida pela observação de que enquanto os vertebrados desenvolveram a homeostasia cerca de 400 milhões de anos atrás (Doolittle e Feng, 1987), a hematofagia surgiu várias vezes de maneira independente na evolução, em um período entre 145 e 65 milhões de anos atrás (Balashov Yu, 1984). Supõe-se que a evolução para múltiplos mecanismos anti-homeostáticos, inclusive com grande redundância nos alvos e usando moléculas completamente diferentes, decorra de uma pressão seletiva contínua (Mans e cols., 2002; 2003). É claro que as moléculas anti-homeostáticas dos hematófagos evoluíram juntamente com o desenvolvimento das moléculas do sistema homeostático dos vertebrados de modo que é razoável supor que este seja a principal razão da alta eficiência dos hematófagos em seu modo de vida. Esta alta especificidade para bloquear as defesas do hospedeiro e a redundância dos sistemas justifica as dificuldades em se desenvolver métodos eficientes de controle desses ectoparasitas.

## Referências Bibliográficas.

Abebe, M., Ribeiro, J.M., Cupp, M.S., Cupp E.W., 1996. Novel anticoagulant from salivary glands of *Simulium vittatum* (Diptera: Simuliidae) inhibits activity of coagulation factor V. J. Med Entomol. 33,173-176.

Andersen, J.F., Champagne, D.E., Weichsel, A., Ribeiro, J.M., Balfour, C.A., Dress, V., Montfort, W.R., 1997. Nitric oxide binding and crystallization of recombinant nitrophorin I, a nitric oxide transport protein from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. Biochemistry. 36, 4423-8.

Andersen, J.F., Ding, X.D., Balfour, C., Shokhireva, T.K., Champagne, D.E., Walker, F.A, Montfort, W.R., 2000. Kinetics and equilibria in ligand binding by nitrophorins 1-4: evidence for stabilization of a nitric oxide-ferriheme complex through a ligand-induced conformational trap. Biochemistry. 39, 10118-10131.

Andersen, J.F., Gudderra N.P., Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 2004. Recognition of anionic phospholipid membranes by an antihemostatic protein from a blood-feeding insect. Biochemistry 43, 6987-6994.

Balashov Yu, S., 1984. Interaction between blood-sucking arthropods and their hosts, and its influence on vector potential. Ann. Rev. Entomol. 29, 137-156.

Baskova, I.P., Nikonov, G.I., 1991. Destabilase, the novel epsilon-(gamma-Glu)-Lys isopeptidase with thrombolytic activity. Blood Coagul. Fibrinolysis 2,167-72.

Black IV, W.C., Kondratieff, B.C., 2005. Evolution of Arthropod Disease Vectors em Biology of Disease Vectors Editor William C. Marquardt. Capítulo 2, 2ª Edição, Elsevier Academic Press, San Diego, California, pp. 9-23.

Blankenship, D.T., Brankamp, R.G., Manley, G.D., Cardin, A.D., 1990. Amino acid sequence of ghilanten: anticoagulant-antimetastatic principle of the South American leech, *Haementeria ghilianii*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 166, 1384-1389.

Bode, W., Huber, R., 2000. Structural basis of the endoproteinase-protein inhibitor interaction. Biochim. Biophys. Acta. 1477, 241-52.

Budzynski, A. Z., 1991. Interaction of hementin with fibrinogen and fibrin. Blood Coagul. Fibrinolysis 2, 149-152.

Campos, I.T., Amino, R., Sampaio, C.A., Auerswald, E.A., Friedrich, T., Lemaire, H.G., Schenkman, S., Tanaka, A.S., 2002. Infestin, a thrombin inhibitor presents in *Triatoma infestans* midgut, a Chagas' disease vector: gene cloning, expression and characterization of the inhibitor. Insect Biochem. Mol. Biol. 32, 991-997.

Campos, I.T., Tanaka-Azevedo, A.M., Tanaka, A.S. 2004. Identification and characterization of a novel factor XIIa inhibitor in the hematophagous insect, *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae). FEBS Lett. 577, 512-516.

Cappello, M., Bergum, P.W., Vlasuk, G.P., Furmidge, B.A., Pritchard, D.I., Aksoy, S., 1996. Isolation and characterization of the tsetse thrombin inhibitor: a potent antithrombotic peptide from the saliva of *Glossina morsitans morsitans*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 54, 475-480. Erratum in: Am. J. Trop. Med. Hyg. 1996 55,118.

Cappello, M., Li, S., Chen, X., Li, C.B., Harrison, L., Narashimhan, S., Beard, C.B., Aksoy, S., 1998. Tsetse thrombin inhibitor: bloodmeal-induced expression of an anticoagulant in salivary glands and gut tissue of *Glossina morsitans morsitans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 95, 14290-14295.

Champagne, D.E., Nussenzveig, R.H., Ribeiro, J.M., 1995. Purification, partial characterization, and cloning of nitric oxide-carrying heme proteins (nitrophorins) from salivary glands of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. J. Biol. Chem. 270, 8691-8695.

Champagne, D.E., Ribeiro, J.M., 1994. Sialokinin I and II: vasodilatory tachykinins from the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 91,138-142.

Champagne, D.E., Smartt, C.T., Ribeiro, J.M., James, A.A., 1995. 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. 92, 694-698.

Charlab, R., Rowton, E.D., Ribeiro, J.M., 2000. The salivary adenosine deaminase from the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. Exp. Parasitol. 95, 45-53.

- Chudzinski-Tavassi, A.M., Kelen, E.M., de Paula Rosa, A.P., Loyau, S., Sampaio, C.A., Bon, C., Anglés-Cano, E., 1998. Fibrino(geno)lytic properties of purified hementerin, a metalloproteinase from the leech *Haementeria depressa*. *Thromb. Haemost.* 80,155-160.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp. Parasitol.* 114, 40-46.
- Condra, C., Nutt, E., Petroski, C.J., Simpson, E., Friedman, P.A., Jacobs, J.W., 1989. Isolation and structural characterization of a potent inhibitor of coagulation factor Xa from the leech *Haementeria ghilianii*. *Thromb. Haemost.* 61, 437-441.
- Connolly, T.M., Jacobs, J.W., Condra, C., 1992. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. I. Identification, isolation, and characterization. *J. Biol. Chem.* 267, 6893-6898.
- Cupp, M.S., Ribeiro, J.M., Champagne, D.E., Cupp, E.W. 1998. Analyses of cDNA and recombinant protein for a potent vasoactive protein in saliva of a blood-feeding black fly, *Simulium vittatum*. *J. Exp. Biol.* 201, 1553-1561.
- Cupp, M.S., Ribeiro, J.M., Cupp, E.W. 1994. Vasodilative activity in black fly salivary glands. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 241-246.
- Davie, E.W., Fujikawa, K., Kisiel, W., 1991. The coagulation cascade: initiation, maintenance, and regulation. *Biochemistry* 30, 10363-10370.
- Dickinson, R.G., O'Hagan, J.E., Schotz, M., Binnington, K.C., Hegarty, M.P., 1976. Prostaglandin in the saliva of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 54, 475-486.
- Doolittle, R.F., Feng, D.F., 1987. Reconstructing the evolution of vertebrate blood coagulation from a consideration of the amino acid sequences of clotting proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 52, 869-874.
- Faudry, E., Lozzi, S.P., Santana, J.M., D'Souza-Ault, M., Kieffer, S., Felix, C.R., Ricart, C.A., Sousa, M.V., Vernet, T., Teixeira, A.R., 2004. *Triatoma infestans* apyrases belong to the 5'-nucleotidase family. *J. Biol. Chem.* 279,19607-19613.
- Finney, S., Seale, L., Sawyer, R.T., Wallis, R.B. 1997. Tridegin, a new peptidic inhibitor of factor XIIIa, from the blood-sucking leech *Haementeria ghilianii*. *Biochem. J.* 324,797-805.
- Flower, D.R., 2000. Experimentally determined lipocalin structures. *Biochim. Biophys. Acta.* 1482, 46-56.
- Francischetti, I.M., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2002. Biochemical and functional characterization of recombinant *Rhodnius prolixus* platelet aggregation

inhibitor 1 as a novel lipocalin with high affinity for adenosine diphosphate and other adenine nucleotides. *Biochemistry*. 41, 3810-3818.

Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2002. 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*. 99, 3602- 3612.

Francischetti, I.M., Mather, T.N., Ribeiro, J.M. 2004. Penthalaris, a novel recombinant five-Kunitz tissue factor pathway inhibitor (TFPI) from the salivary gland of the tick vector of Lyme disease, *Ixodes scapularis*. *Thromb. Haemost.* 91, 886-998.

Francischetti, I.M., Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 1999. Anophelin: kinetics and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry* 38, 16678-16685.

Friedrich, T., Kröger, B., Bialojan, S., Lemaire, H.G., Höffken, H.W., Reuschenbach, P., Otte, M., Dodt, J., 1993. A Kazal-type inhibitor with thrombin specificity from *Rhodnius prolixus*. *J. Biol. Chem.* 268, 16216-16122.

Fuentes-Prior, P., Noeske-Jungblut, C., Donner, P., Schleuning, W.D., Huber, R., Bode, W., 1997. Structure of the thrombin complex with triabin, a lipocalin-like exosite-binding inhibitor derived from a triatomine bug. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 94, 11845-11850.

Garcia, E.S., Mello, C.B., Azambuja, P., Ribeiro, J.M. 1994. *Rhodnius prolixus*: salivary antihemostatic components decrease with *Trypanosoma rangeli* infection. *Exp. Parasitol.* 78, 287-293.

Gardell, S.J., Duong, L.T., Diehl, R.E., York, J.D., Hare, T.R., Register, R.B., Jacobs, J.W., Dixon, R.A., Friedman, P.A., 1989. Isolation, characterization, and cDNA cloning of a vampire bat salivary plasminogen activator. *J. Biol. Chem.* 264, 17947-17952.

Gazos-Lopes, F., Mesquita, R. D., Silva-Cardoso, L., Senna, R., Silveira, A. B., Jablonka, W., Cudishevitch, C. O., Carneiro, A. B., Machado, E. A., Lima, L.G., Monteiro, R.Q., Nussenzveig, R. H., Folly, E., Romeiro, A., Previato, L., Oswald-Previato, L., Valenzuela, J., Ribeiro, J. M., Atella, G.C., Silva-Neto, M.A. Glycoinositolphospholipids from trypanosomatids subvert nitric oxide production in bug salivary glands. *Submetido* 2012.

Gillpespie, R. D., MBow, M.L., Titus, R.G., 2000. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunology* 22, 319-331.

Goldsack, N.R., Chambers, R.C., Dabbagh, K., Laurent, G.J., 1998. Thrombin. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 30, 641-646.

Golodne, D.M., Monteiro, R.Q., Graça-Souza, A.V., Silva-Neto, M.A., Atella, G.C., 2003. Lysophosphatidylcholine acts as an anti-hemostatic molecule in the

saliva of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. J. Biol. Chem. 278, 27766-27771.

Grutter, M.G., Priestle, J.P., Rahuel, J., Grossenbacher, H., Bode, W., Hofsteenge, J., Stone, S.R., 1990. Crystal structure of the thrombin-hirudin complex: a novel mode of serine protease inhibition. EMBO J. 9, 2361-2365.

Haendler, B., Becker, A., Noeske-Jungblut, C., Krätzschar, J., Donner, P., Schleuning, W.D., 1995. Expression of active recombinant pallidipin, a novel platelet aggregation inhibitor, in the periplasm of *Escherichia coli*. Biochem. J. 307, 465-470.

Harsfalvi, J., Stassen, J.M., Hoylaerts, M.F., Van Houtte, E., Sawyer, R.T., Vermynen, J., Deckmyn, H., 1995. Calin from *Hirudo medicinalis*, an inhibitor of von Willebrand factor binding to collagen under static and flow conditions. Blood 85, 705-711.

Hawkins, R.I., Hellmann, K., 1966. Investigations on a plasminogen activator in two blood-suckers, *Rhodnius prolixus* Stål and *Hirudo medicinalis*. Br. J. Haematol. 12, 86-91.

Hellmann, K., Hawkins, R.I. 1964. Anticoagulant and fibrinolytic activities from *Rhodnius prolixus* Stal. Nature 201, 1008-1009.

Hoffmann, A., Walsmann, P., Riesener, G., Paintz, M., Markwardt, F., 1991. Isolation and characterization of a thrombin inhibitor from the tick *Ixodes ricinus*. Pharmazie 46, 209-212.

Horn, F., dos Santos, P.C., Termignoni, C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. Arch. Biochem. Biophys. 384, 68-73.

Icke, C., Schlott, B., Ohlenschläger, O., Hartmann, M., Gührs, K.H., Glusa, E., 2002. Fusion proteins with anticoagulant and fibrinolytic properties: functional studies and structural considerations. Mol. Pharmacol. 62, 203-209.

Isawa, H., Yuda, M., Orito, Y., Chinzei, Y., 2002. A mosquito salivary protein inhibits activation of the plasma contact system by binding to factor XII and high molecular weight kininogen. J. Biol. Chem. 277, 27651-27658.

Isawa, H., Yuda, M., Yoneda, K., Chinzei, Y., 2000. The insect salivary protein, prolixin-S, inhibits factor IXa generation and Xase complex formation in the blood coagulation pathway. J. Biol. Chem. 275, 6636-6641.

Jacobs, J.W., Cupp, E.W., Sardana, M., Friedman, P.A., 1990. Isolation and characterization of a coagulation factor Xa inhibitor from black fly salivary glands. Thromb. Haemost. 64, 235-238.

Joubert, A.M., Crause, J.C., Gaspar, A.R., Clarke, F.C., Spickett, A.M., Neitz, A.W., 1995. Isolation and characterization of an anticoagulant present in the

salivary glands of the bont-legged tick, *Hyalomma truncatum*. Exp. Appl. Acarol. 19, 79-92.

Karczewski, J., Waxman, L., Endris, R.G., Connolly, T.M., 1995. An inhibitor from the argasid tick *Ornithodoros moubata* of cell adhesion to collagen. Biochem. Biophys. Res. Commun. 17, 532-541.

Kazimírová, M., Jancinová, V., Petříková, M., Takác, P., Labuda, M., Nosál, R., 2002. An inhibitor of thrombin-stimulated blood platelet aggregation from the salivary glands of the hard tick *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae). Exp. Appl. Acarol. 28,97-105.

Kelen, E.M., Rosenfeld, G., 1975. Fibrinogenolytic substance (hementerin) of Brazilian blood-sucking leeches (*Haementeria lutzi* Pinto 1920). Haemostasis 4,51-64.

Keller, P.M., Schultz, L.D., Condra, C., Karczewski, J., Connolly, T.M., 1992. An inhibitor of collagen-stimulated platelet activation from the salivary glands of the *Haementeria officinalis* leech. II. Cloning of the cDNA and expression. J. Biol. Chem. 267, 6899-6904.

Keller, P.M., Waxman, L., Arnold, B.A., Schultz, L.D., Condra, C., Connolly, T.M., 1993. Cloning of the cDNA and expression of moubatin, an inhibitor of platelet aggregation. J. Biol. Chem. 268,5450-5456.

Lai, R., Takeuchi, H., Jonczy, J., Rees, H.H., Turner, P.C., 2004. A thrombin inhibitor from the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. Gene 342, 243-249.

Lavoipierre, M.M., Dickerson, G., Gordon, R.M., 1959. Studies on the methods of feeding of blood-sucking arthropods. I. The manner in which triatomine bugs obtain their blood-meal, as observed in the tissues of the living rodent, with some remarks on the effects of the bite on human volunteers. Ann. Trop. Med. Parasitol. 53, 235-250.

Law, J.H., Ribeiro, J.M., Wells, M.A., 1992. Biochemical insights derived from insect diversity. Annu. Rev. Biochem. 61, 87-111.

Lee, A.Y., Vlasuk, G.P., 2003. Recombinant nematode anticoagulant protein c2 and other inhibitors targeting blood coagulation factor VIIa/tissue factor. J. Intern. Med. 254, 313-321.

Lerner, E.A., Ribeiro, J.M., Nelson, R.J., Lerner, M.R., 1991. Isolation of maxadilan, a potent vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. J. Biol. Chem. 266, 11234-11236.

Lerner, E.A., Shoemaker, C.B., 1992. Maxadilan. Cloning and functional expression of the gene encoding this potent vasodilator peptide. J. Biol. Chem. 267, 1062-1066.



- Lim, J., Gowda, D.C., Krishnegowda, G., Luckhart, S., 2005. Induction of nitric oxide synthase in *Anopheles stephensi* by *Plasmodium falciparum*: mechanism of signaling and the role of parasite glycosylphosphatidylinositols. *Infect. Immun.* 73, 2778-2789.
- Limo, M.K., Voigt, W.P., Tumbo-Oeri, A.G., Njogu, R.M., Ole-MoiYoi, O.K., 1991. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. *Exp. Parasitol.* 72, 418-429.
- Liu, V.W., Huang, P.L., 2008. Cardiovascular roles of nitric oxide: a review of insights from nitric oxide synthase gene disrupted mice. *Cardiovasc. Res.* 77, 19-29.
- Lovato, D.V., Amino, R., González, Y., Miranda, A., Schenkman, S., Tanaka, A.S., 2011. Infestin 1R, an intestinal subtilisin inhibitor from *Triatoma infestans* able to impair mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 129,362-367.
- Lovato, D.V., Nicolau de Campos, I.T., Amino, R., Tanaka, A.S., 2006. The full-length cDNA of anticoagulant protein infestin revealed a novel releasable Kazal domain, a neutrophil elastase inhibitor lacking anticoagulant activity. *Biochimie* 88, 673-681.
- Macedo-Ribeiro, S., Almeida, C., Calisto, B.M., Friedrich, T., Mentele, R., Stürzebecher, J., Fuentes-Prior, P., Pereira, P.J., 2008. Isolation, cloning and structural characterisation of boophilin, a multifunctional Kunitz-type proteinase inhibitor from the cattle tick. *PLoS One* 3, e1624.
- Malinconico, S.M., Katz, J.B., Budzynski, A.Z., 1984. Hementin: anticoagulant protease from the salivary gland of the leech *Haementeria ghilianii*. *J. Lab. Clin. Med.* 103, 44-58.
- Mans, B.J., Gaspar, A.R., Louw, A.I., Neitz, A.W., 1998. Apyrase activity and platelet aggregation inhibitors in the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 22, 353-366.
- Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2002. Evolution of hematophagy in ticks: common origins for blood coagulation and platelet aggregation inhibitors from soft ticks of the genus *Ornithodoros*. *Mol. Biol. Evol.* 19,1695-1705.
- Mans, B.J., Louw, A.I., Neitz, A.W., 2003. The influence of tick behavior, biotope and host specificity on concerted evolution of the platelet aggregation inhibitor savignygrin, from the soft tick *Ornithodoros savignyi*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 623-629.
- Mans, B.J., Neitz, A.W., 2004. Adaptation of ticks to a blood-feeding environment: evolution from a functional perspective. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 1-17.

- Mant, M.J., Parker, K.R., 1981. Two platelet aggregation inhibitors in tsetse (*Glossina*) saliva with studies of roles of thrombin and citrate in *in vitro* platelet aggregation. *Br. J. Haematol.* 48, 601-608.
- Markwardt, F., 1970. [Biochemical basis for the control of anticoagulant and thrombolytic therapy]. *Folia Haematol. Int. Mag. Klin. Morphol. Blutforsch.* 94, 116-128.
- Mende, K., Petoukhova, O., Koulitchkova, V., Schaub, G.A., Lange, U., Kaufmann, R., Nowak, G., 1999. Dipetalogastin, a potent thrombin inhibitor from the blood-sucking insect. *Dipetalogaster maximus* cDNA cloning, expression and characterization. *Eur. J. Biochem.* 266, 583-590.
- Mesquita, R.D., Carneiro, A.B., Bafica, A., Gazos-Lopes, F., Takiya, C.M., Souto-Padron, T., Vieira, D.P., Ferreira-Pereira, A., Almeida, I.C., Figueiredo, R.T., Porto, B.N., Bozza, M.T., Graça-Souza, A.V., Lopes, A.H., Atella, G.C., Silva-Neto, M.A., 2008. *Trypanosoma cruzi* infection is enhanced by vector saliva through immunosuppressant mechanisms mediated by lysophosphatidylcholine. *Infect. Immun.* 76, 5543-5552.
- Mesquita, R.D., de Oliveira, F.M., Shugar, D., Fantappié, M.R., Silva-Neto, M.A., 2005. Nitrophorin synthesis is modulated by protein kinase CK2. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 335, 690-699.
- Montfort, W.R., Weichsel, A., Andersen, J.F., 2000. Nitrophorins and related antihemostatic lipocalins from *Rhodnius prolixus* and other blood-sucking arthropods. *Biochim. Biophys. Acta* 1482, 110-118.
- Moreira, M.F., Coelho, H.S., Zingali, R.B., Oliveira, P.L., Masuda, H., 2003. Changes in salivary nitrophorin profile during the life cycle of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 33, 23-28.
- Munro, R., Jones, C.P., Sawyer, R.T., 1991. Calin - a platelet adhesion inhibitor from the saliva of the medicinal leech. *Blood Coagul. Fibrinolysis* 2, 179-184.
- Nienaber, J., Gaspar, A.R., Neitz, A.W., 1999. Savignin, a potent thrombin inhibitor isolated from the salivary glands of the tick *Ornithodoros savignyi* (Acari:Argasidae). *Exp. Parasitol.* 93, 82-91.
- Noeske-Jungblut, C., Krätzschar, J., Haendler, B., Alagon, A., Possani, L., Verhallen, P., Donner, P., Schleuning, W.D., 1994. An inhibitor of collagen-induced platelet aggregation from the saliva of *Triatoma pallidipennis*. *J. Biol. Chem.* 269, 5050-5053.
- Noeske-Jungblut, C., Haendler, B., Donner, P., Alagon, A., Possani, L., Schleuning, W.D., 1995. Triabin, a highly potent exosite inhibitor of thrombin. *J. Biol. Chem.* 270, 28629-28634.

- Nussenzveig, R.H., Bentley, D.L., Ribeiro, J.M., 1995. Nitric oxide loading of the salivary nitric-oxide-carrying hemoproteins (nitrophorins) in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Biol.* 198, 1093-1098.
- Nutt, E., Gasic, T., Rodkey, J., Gasic, G.J., Jacobs, J.W., Friedman, P.A., Simpson, E., 1988. The amino acid sequence of antistasin. A potent inhibitor of factor Xa reveals a repeated internal structure. *J. Biol. Chem.* 263, 10162-10167.
- Rafikov, R., Fonseca, F.V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., Fulton, D., Black, S.M., 2011. eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity. *J. Endocrinol.* 210, 271-284.
- Reddy, V.B., Kouna, K., Mariano, F., Lerner, E.A., 2000. Chrysoptin is a potent glycoprotein IIb/IIIa fibrinogen receptor antagonist present in salivary gland extracts of the deerfly. *J. Biol. Chem.* 275, 15861-15867.
- Ribeiro J.M., Walker, F.A., 1994. High affinity histamine-binding and antihistaminic activity of the salivary nitric oxide-carrying heme protein (nitrophorin) of *Rhodnius prolixus*. *J. Exp. Med.* 180, 2251-2257.
- Ribeiro, J.M., 1987. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. *Annu. Rev. Entomol.* 32, 463-478.
- Ribeiro, J.M., 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Exp. Appl. Acarol.* 7, 15-20.
- Ribeiro, J.M., 1989. Vector saliva and its role in parasite transmission. *Exp. Parasitol.* 69, 104-106.
- Ribeiro, J.M., 1995a. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists ? *Infect. Agents Dis.* 4, 143-52.
- Ribeiro, J.M., 1995b. How ticks make a living. *Parasitol. Today* 11, 91-93.
- Ribeiro, J.M., Andersen, J., Silva-Neto, M.A., Pham, V.M., Garfield, M.K., Valenzuela, J.G., 2004. Exploring the sialome of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 61-79.
- Ribeiro, J.M., Evans, P.M., MacSwain, J.L., Sauer, J., 1992. *Amblyomma americanum*: characterization of salivary prostaglandins E<sub>2</sub> and F<sub>2</sub> alpha by RP-HPLC/bioassay and gas chromatography-mass spectrometry. *Exp. Parasitol.* 74, 112-116.
- Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2001. Platelet-activating-factor-hydrolyzing phospholipase C in the salivary glands and saliva of the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J. Exp. Biol.* 204, 3887-3894.

- Ribeiro, J.M., Francischetti, I.M., 2003. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post-sialome perspectives. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 73-88.
- Ribeiro, J.M., Garcia, E.S., 1981. Platelet antiaggregating activity in the salivary secretion of the blood sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Experientia* 37, 384-386.
- Ribeiro, J.M., Hazzard, J.M., Nussenzveig, R.H., Champagne, D.E., Walker, F.A., 1993. Reversible binding of nitric oxide by a salivary heme protein from a bloodsucking insect. *Science* 260, 539-541.
- Ribeiro, J.M., Katz, O., Pannell, L.K., Waitumbi, J., Warburg, A., 1999. Salivary glands of the sand fly *Phlebotomus papatasi* contain pharmacologically active amounts of adenosine and 5'-AMP. *J. Exp. Biol.* 202, 1551-1559.
- Ribeiro, J.M., Makoul, G. T., Robinson, D.R., 1988. *Ixodes dammini*: evidence for salivary prostacyclin secretion. *J Parasitol.* 74, 1068-1069.
- Ribeiro, J.M., Makoul, G.T., Levine, J., Robinson, D.R., Spielman, A., 1985. Antihemostatic, antiinflammatory, and immunosuppressive properties of the saliva of a tick, *Ixodes dammini*. *J. Exp. Med.* 161, 332-344.
- Ribeiro, J.M., Marinotti, O., Gonzales, R., 1990. A salivary vasodilator in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Br. J. Pharmacol.* 101, 932-936.
- Ribeiro, J.M., Modi, G., 2001. The salivary adenosine/AMP content of *Phlebotomus argentipes* Annandale and Brunetti, the main vector of human kala-azar. *J. Parasitol.* 87, 915-917.
- Ribeiro, J.M., Nussenzveig, R.H., 1993. Nitric oxide synthase activity from a hematophagous insect salivary gland. *FEBS Lett.* 330, 165-168.
- Ribeiro, J.M., Nussenzveig, R.H., 1993. The salivary catechol oxidase/oxidase activities of the mosquito *Anopheles albimanus*. *J. Exp. Biol.* 179, 273-287.
- Ribeiro, J.M., Schneider, M., Guimarães, J.A., 1995. Purification and characterization of prolixin S (nitrophorin 2), the salivary anticoagulant of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 308, 243-249.
- Ribeiro, J.M., Vachereau, A., Modi, G.B., Tesh, R.B., 1989. A novel vasodilatory peptide from the salivary glands of the sand fly *Lutzomyia longipalpis*. *Science* 243, 212-214.
- Rosignol, P.A., Ribeiro, J.M., Spielman, A., 1984. Increased intradermal probing time in sporozoite-infected mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 33, 17-20.
- Ryan, T.J., 1976. The blood vessels of the skin. *J. Invest. Dermatol.* 67, 110-118.

- Schleuning, W.D, Alagon, A., Boidol, W., Bringmann, P., Petri, T., Krätzschar, J., Haendler, B., Langer, G., Baldus, B., Witt, W., e cols., 1999. Plasminogen activators from the saliva of *Desmodus rotundus* (common vampire bat): unique fibrin specificity. *Ann. N Y Acad. Sci.* 667,395-403.
- Searles, C.D., 2006. Transcriptional and posttranscriptional regulation of endothelial nitric oxide synthase expression. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 291, C803-C816.
- Seymour, J.L., Henzel, W.J., Nevins, B., Stults, J.T., Lazarus, R.A., 1990. Decorsin. A potent glycoprotein IIb-IIIa antagonist and platelet aggregation inhibitor from the leech *Macrobdella decora*. *J. Biol. Chem.* 265, 10143-10147.
- Shiple, M.M., Dillwith, J.W., Bowman, A.S., Essenberg, R.C., Sauer, J.R., 1993. Changes in lipids of the salivary glands of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, during feeding. *J. Parasitol.* 79, 834-842.
- Söllner, C., Mentele, R., Eckerskorn, C., Fritz, H., Sommerhoff, C.P., 1994. Isolation and characterization of hirustasin, an antistatin-type serine-proteinase inhibitor from the medical leech *Hirudo medicinalis*. *Eur. J. Biochem.* 219, 937-943.
- Stark, K.R., James, A.A., 1995. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Exp. Parasitol.* 81, 321-331.
- Swadesh, J.K., Huang, I.Y., Budzynski, A.Z., 1990. Purification and characterization of hementin, a fibrinogenolytic protease from the leech *Haementeria ghilianii*. *J. Chromatogr.* 502, 359-369.
- Tachado, S.D., Gerold, P., Schwarz, R., Novakovic, S., McConville, M., Schofield, L., 1997. Signal transduction in macrophages by glycosylphosphatidylinositols of *Plasmodium*, *Trypanosoma*, and *Leishmania*: activation of protein tyrosine kinases and protein kinase C by inositolglycan and diacylglycerol moieties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94, 4022-4027.
- Titus, R.G., Ribeiro J.M., 1988. Salivary gland lysates from the sand fly *Lutzomyia longipalpis* enhance *Leishmania* infectivity. *Science* 239, 1306-1308.
- Tuszynski, G.P., Gasic, T.B., Gasic, G.J., 1987. Isolation and characterization of antistatin. An inhibitor of metastasis and coagulation. *J. Biol. Chem.* 262, 9718-9723.
- Valenzuela, J.G., 2002. High-throughput approaches to study salivary proteins and genes from vectors of disease. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 1199-1209.
- Valenzuela, J.G., Belkaid Y, Rowton, E., Ribeiro, J.M., 2001. The salivary apyrase of the blood-sucking sand fly *Phlebotomus papatasi* belongs to the novel Cimex family of apyrases. *J. Exp. Biol.* 204, 229-237.

- Valenzuela, J.G., Charlab, R., Galperin, M.Y., Ribeiro, J.M., 1998. Purification, cloning, and expression of an apyrase from the bed bug *Cimex lectularius*. A new type of nucleotide-binding enzyme. *J. Biol. Chem.* 273, 30583-30590.
- Valenzuela, J.G., Francischetti IM, Ribeiro JM. Purification, cloning, and synthesis of a novel salivary anti-thrombin from the mosquito *Anopheles albimanus*. *Biochemistry.* 1999 Aug 24;38(34):11209-15.
- Valenzuela, J.G., Ribeiro, J.M., 1998. Purification and cloning of the salivary nitrophorin from the hemipteran *Cimex lectularius*. *J. Exp Biol.* 201, 2659-2664.
- Valenzuela, J.G., Walker, F.A., Ribeiro, J.M., 1995. A salivary nitrophorins (nitric-oxide-carrying hemoprotein) in the bedbug *Cimex lectularius*. *J. Exp. Biol.* 198,1519-1526.
- Van de Locht, A., Lamba, D., Bauer, M., Huber, R., Friedrich, T., Kröger, B., Höffken, W., Bode, W., 1995. Two heads are better than one: crystal structure of the insect derived double domain Kazal inhibitor rhodniin in complex with thrombin. *EMBO J.* 14, 5149-5157.
- Van de Locht, A., Stubbs, M.T., Bode, W., Friedrich, T., Bollschweiler, C., Höffken, W., Huber, R., 1996. The ornithodorin-thrombin crystal structure, a key to the TAP enigma ? *EMBO J.* 15, 6011-6017.
- Vlasuk, G.P., Ramjit, D., Fujita, T., Dunwiddie, C.T., Nutt, E.M., Smith, D.E., Shebuski, R.J., 1991. Comparison of the *in vivo* anticoagulant properties of standard heparin and the highly selective factor Xa inhibitors antistasin and tick anticoagulant peptide (TAP) in a rabbit model of venous thrombosis. *Thromb. Haemost.* 65, 257-262.
- Wang, X., Coons, L.B., Taylor, D.B., Stevens, S.E. Jr., Gartner, T.K., 1996. Variabilin, a novel RGD-containing antagonist of glycoprotein IIb-IIIa and platelet aggregation inhibitor from the hard tick *Dermacentor variabilis*. *J. Biol. Chem.* 271, 17785-17790.
- Watanabe, R.M., Soares, T.S., Morais-Zani, K., Tanaka-Azevedo, A.M., Maciel, C., Capurro, M.L., Torquato, R.J., Tanaka, A.S., 2010. A novel trypsin Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with thrombin coagulant inhibitory activity. 92, 933-939.
- Watanabe, R.M., Tanaka-Azevedo, A.M., Araujo, M.S., Juliano, M.A., Tanaka, A.S., 2011. Characterization of thrombin inhibitory mechanism of rAaTI, a Kazal-type inhibitor from *Aedes aegypti* with anticoagulant activity. *Biochimie* 93, 618-623.
- Waxman, L., Connolly, T.M., 1993. Isolation of an inhibitor selective for collagen-stimulated platelet aggregation from the soft tick *Ornithodoros moubata*. *J. Biol. Chem.* 268, 5445-5449.



Waxman, L., Smith, D.E., Arcuri, K.E., Vlasuk, G.P., 1990. Tick anticoagulant peptide (TAP) is a novel inhibitor of blood coagulation factor Xa. *Science* 248, 593-596. Erratum in: *Science* 1990 248, 1473.

Weichsel, A., Andersen, J.F., Champagne, D.E., Walker, F.A., Montfort, W.R., 1998. Crystal structures of a nitric oxide transport protein from a blood-sucking insect. *Nat Struct Biol.* 5, 304-309.

Wheeler, W.C., Whiting, M., Wheeler, Q.D., Carpenter, J.M., 2001. The phylogeny of the extant hexapod orders. *Cladistics* 17, 113-169.

Zhang, D., Cupp, M.S., Cupp, E.W., 2002. Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 321-330.

Zhang, Y., Ribeiro, J.M., Guimarães, J.A., Walsh, P.N., 1998. Nitrophorin-2: a novel mixed-type reversible specific inhibitor of the intrinsic factor-X activating complex. *Biochemistry* 37, 10681-10690.

Zhu, K., Bowman, A.S., Brigham, D.L., Essenberg, R.C., Dillwith, J.W., Sauer, J.R., 1997. Isolation and characterization of americanin, a specific inhibitor of thrombin, from the salivary glands of the lone star tick *Amblyomma americanum* (L.). *Exp. Parasitol.* 87, 30-38.