

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**METABOLISMO ENERGÉTICO NA EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO
*RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Autor: Melina Garcia Guizzo

PORTO ALEGRE

2011/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**METABOLISMO ENERGÉTICO NA EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO
*RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS***

Autor: Melina Garcia Guizzo

**Trabalho apresentado como requisito parcial
para graduação em Medicina Veterinária**

Orientador: Itabajara da Silva Vaz Júnior

PORTO ALEGRE

2011/2

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio das agências fomentadoras CNPq, CAPES, FAPERGS, FAPERJ e INCT-Entomologia Molecular.

Um agradecimento especial ao orientador desse trabalho, e também do período de iniciação científica durante a graduação, Itabajara da Silva Vaz Júnior, que foi essencial para a minha formação profissional.

Aos queridos amigos do Laboratório de Imunologia Aplicada à Sanidade Animal do Centro de Biotecnologia da UFRGS.

À minha família pelo apoio.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	BALANÇO ENERGÉTICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO <i>RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS</i>.....	7
2.1	Metabolismo de glicose e glicogênio.....	7
2.1.2	Sinalização celular mediada pela cascata de insulina.....	9
2.2	Metabolismo proteico.....	10
2.3	Metabolismo lipídico.....	16
3	DISCUSSÃO.....	17
	REFERÊNCIAS.....	21

1 INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago que causa importantes perdas econômicas produtivas na bovinocultura extensiva (DE LA FUENTE et al., 2007). Devido à ação espoliativa, ocorre diminuição no ganho de peso e na produção de leite dos animais parasitados, além de danos ao couro, implicando em um menor valor agregado ao produto (PETER et al., 2005). Além de causar perda direta na produção, o *R. microplus* é vetor dos agentes da tristeza parasitária bovina, uma enfermidade que cursa com um quadro de anemia hemolítica e é causada pelos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e a riquetsia *Anaplasma marginale* (SUAREZ; NOH, 2011). Com isso estima-se um prejuízo mundial de 10 bilhões de dólares ao ano com as perdas decorrentes do parasitismo causada pelo *R. microplus* (GRISI et al., 2002). Usualmente o controle preventivo ou terapêutico deste carrapato é realizado através do uso dos acaricidas, produtos químicos que embora apresentem eficácia contribuem para a seleção de carrapatos resistentes, além de poderem causar danos à saúde animal e humana (GUERRERO et al., 2006; ROSARIO-CRUZ et al., 2009). Essas moléculas acumulam-se como resíduos na carne e no leite dos animais tratados, assim como no meio-ambiente, quando os acaricidas não são adequadamente utilizados (GRAF et al., 2004). Sendo assim, há a necessidade econômica, social e ambiental de esforços direcionados ao estudo da fisiologia do *R. microplus* objetivando criar alternativas para o desenvolvimento de novos métodos de controle do parasita (MEHLHORN et al., 2011). Dentre os métodos propostos estão o manejo rotatório de pastagens, o controle biológico através de inimigos naturais, a seleção de linhagens bovinas mais resistentes à infestação e o controle imunológico através do uso de vacinas contra o parasita (PRUETT, 1999). O controle imunológico caracteriza-se como um método de controle promissor por ser

uma tecnologia não contaminante do ambiente e dos produtos de origem animal (IMAMURA et al., 2008; WILLADSEN, 2004). A eficácia e viabilidade do uso de vacinas contra o *R. microplus* foi mostrada em diversos países, principalmente Cuba e Austrália, sendo a imunização capaz de diminuir a capacidade reprodutiva da fêmea, levando à redução do número de parasitas através da diminuição da infestação larval no campo ao longo das gerações (DE LA FUENTE et al., 2007; DE LA FUENTE et al., 1998; WILLADSEN, 1997). Através de manejo integrado entre o uso de vacinas e a rotatividade de acaricidas com diferentes princípios ativos torna-se possível reduzir a níveis economicamente aceitáveis a população de carrapatos nas pastagens, reduzindo a seleção de carrapatos resistentes aos agentes químicos. Uma estratégia para a seleção de proteínas alvo para o desenvolvimento de vacinas anti-*R. microplus* é a identificação e caracterização de moléculas envolvidas no metabolismo do carrapato em suas diferentes fases de vida (DA SILVA VAZ et al., 1998; LEAL et al., 2006; PARIZI; MASUDA; DA SILVA VAZ, 2007; PARIZI et al., 2011; SEIXAS et al., 2008). Um exemplo é o estudo de moléculas envolvidas nas rotas metabólicas de obtenção de energia para o desenvolvimento do embrião, que já permitiu identificar potenciais alvos para o controle imunológico (SEIXAS et al., 2010).

A embriogênese nos organismos ovíparos ocorre na ausência de nutrientes exógenos sendo dependente das reservas maternas estocadas nos oócitos, principalmente como grânulos de vitelo (FAGOTTO, 1990; SONG; WONG; WESSEL, 2006). Durante a ovogênese de um organismo ovíparo há um aumento no tamanho do ovário caracterizado pelo acúmulo de RNAs, carboidratos, lipídeos e proteínas nos oócitos que servem como substratos energéticos para as vias metabólicas durante a embriogênese (CHERRY, 1973). Sendo assim, o estudo da formação do embrião com o objetivo de identificar alvos para vacinação pode ser focado em

moléculas responsáveis pela reserva, mobilização e síntese de metabólitos energéticos (SEIXAS et al., 2010).

O desenvolvimento embrionário do *R. microplus* em condições controladas de temperatura (28 °C) e umidade (80 %) ocorre em 21 dias desde a postura até a eclosão dos ovos (CORSON; TEEL; GRANT, 2004). Há uma correlação entre as mudanças morfológicas ocorridas no embrião durante a embriogênese e a mobilização dos componentes energéticos (CAMPOS et al., 2006). No início da embriogênese o embrião é unicelular e após intensas divisões mitóticas torna-se unicelular polinucleado caracterizando a etapa de blastoderma sincicial (ABREU et al., 2004; SONG; WONG; WESSEL, 2006). As transformações ocorridas no zigoto até o quarto dia de desenvolvimento utilizam como fonte energética o glicogênio materno caracterizando assim a primeira fase de consumo energético pelo embrião (MORAES et al., 2006). Entre o quarto e o sexto dia ocorre a formação do blastoderma celular caracterizado pela proliferação de células embrionárias. Após a formação do blastoderma celular o embrião sintetiza vários componentes através da ativação da expressão zigótica, que resulta no aumento do conteúdo de RNA total (CAMPOS et al., 2006). No sétimo dia o embrião apresenta-se segmentado e tem início a segunda fase energética (MORAES et al., 2006) caracterizada por intensa gliconeogênese, decorrente do catabolismo dos aminoácidos estocados no vitelo, que resulta em acúmulo de glicose, guanina (um dos produtos de excreção de nitrogênio em aracnídeos (RAO; GOPALAKRISHNAREDDY, 1962)) e glicogênio. A diminuição do peso seco dos ovos, assim como o aumento no consumo de oxigênio durante a segmentação e a celularização do *R. microplus* indicam um intenso metabolismo durante essas etapas de vida do carrapato (CAMPOS et al., 2006).

2 BALANÇO ENERGÉTICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

2.1 Metabolismo de glicose e glicogênio

O metabolismo dos compostos glicídicos é importante na fisiologia e desenvolvimento de todos os organismos. Portanto, o estudo dos substratos e enzimas pertencentes às vias que garantem um balanço energético positivo é essencial para uma melhor compreensão da etapa de desenvolvimento embrionário.

No *R. microplus* o embrião utiliza a glicose materna armazenada sob forma de glicogênio nos oócitos para a obtenção de energia durante a fase inicial da embriogênese. Os carboidratos são a principal fonte de energia utilizada na segmentação do embrião (CAMPOS et al., 2006). Nos organismos aeróbios a glicose estocada como glicogênio é inicialmente metabolizada através da glicólise. A hexoquinase (HK), a primeira enzima da via glicolítica, catalisa a formação de glicose-6-fosfato (G6P) a partir de glicose. No *R. microplus* essa enzima tem maior atividade até o terceiro dia da embriogênese seguida de declínio contínuo até o nono e retornando a aumentar progressivamente até o vigésimo dia (MORAES et al., 2006). Os níveis de atividade da HK coincidem com a diminuição na concentração de glicogênio nos primeiros sete dias da embriogênese e também com o aumento na concentração de glicogênio na segunda fase de desenvolvimento. Ao mesmo tempo há um aumento na concentração de glicose e de guanina. Estes resultados sugerem que a HK inicialmente fosforila glicose originada do glicogênio materno e na segunda fase da embriogênese utiliza a glicose proveniente da gliconeogênese no próprio embrião. A última enzima utilizada na glicólise é a piruvato quinase (PK) que inicialmente tem uma menor atividade até a formação das células embrionárias seguida de progressivo aumento até a

eclosão larval. O aumento nos níveis de HK e PK após a formação do blastoderma celular é explicado pelos altos níveis de glicose presentes nesse momento da embriogênese.

A via das pentoses-fosfato é uma rota metabólica alternativa para a oxidação de glicose-6-fosfato e que se encontra ativa em altas concentrações glicêmicas. A principal enzima dessa via é a glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), que no embrião tem atividade máxima no quinto dia da embriogênese diminuindo progressivamente a níveis basais ao longo do desenvolvimento do embrião. A análise em conjunto das atividades da HK, PK e G6PDH sugere que a G6P seja metabolizada em duas diferentes fases durante a embriogênese: uma antes da formação do blastoderma celular e outra após. Na primeira fase a G6P seria dirigida para a via das pentoses-fosfato gerando poder redutor (NADPH) para biossínteses redutivas e unidades fundamentais para síntese de nucleotídeos necessárias para a formação das células embrionárias no sexto dia. Após a formação do blastoderma celular acredita-se que o destino da G6P seja preferencialmente a glicólise para obtenção de energia na forma de ATP (MORAES et al., 2006).

Após o consumo da reserva de glicogênio materno nos ovos a energia necessária para que o embrião se desenvolva é obtida principalmente pela via metabólica da gliconeogênese. Nessa reação forma-se glicose através de compostos não-glicídicos, principalmente aminoácidos, e há acúmulo de glicose, glicogênio e guanina. A fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK), que catalisa a conversão de oxalacetato a fosfoenolpiruvato, é uma enzima chave da gliconeogênese, não havendo atividade enzimática na primeira fase metabólica da embriogênese (MORAES et al., 2006). Na segunda fase da embriogênese a atividade da PEPCK aumenta a partir do décimo segundo dia da embriogênese havendo também um aumento progressivo na concentração de guanina decorrente do catabolismo dos aminoácidos.

A triose fosfato isomerase (TIM) é uma enzima presente nas vias glicolítica e gliconeogênica e catalisa a isomerização reversível de dihidroxiacetona fosfato (DHAP) em gliceraldeído 3-fosfato (G3-P). Após a formação do blastoderma celular há um aumento na transcrição e na atividade da TIM coincidindo com o que ocorre com as outras enzimas da via glicolítica, HK e PK (MORAES et al., 2011).

2.1.2 Sinalização celular mediada pela cascata de insulina no *R. microplus*

Sugere-se que a via de sinalização por insulina regule os níveis de glicose no embrião do *R. microplus* durante o seu desenvolvimento assim como em outros organismos, como por exemplo a *Drosophila* (ABREU et al., 2009; MURILLO-MALDONADO et al., 2011). A insulina participa do metabolismo dos carboidratos e na regulação da expressão gênica da PI3K (fosfatidil-inositol 3-OH quinase), p85 (subunidade reguladora da PI3K), e Akt (proteína quinase B). A insulina aumenta o transporte da glicose, a síntese de glicogênio e lipídeos, impede a gliconeogênese e glicogenólise através da inibição da transcrição da PEPCCK além de regular a expressão de genes específicos (LOCHHEAD et al., 2001). A insulina exógena quando administrada em meio próprio para cultura de células de uma linhagem embrionária de *R. microplus* denominada BME26 (BELL-SAKYI et al., 2007; ESTEVES et al., 2008) estimula o acúmulo de glicogênio celular, sendo os inibidores de PI3K capazes de bloquear esse efeito (ABREU et al., 2009). Sendo assim, sugere-se que a via de sinalização da insulina através de PI3K/Akt seja responsável pelo acúmulo de glicogênio na embriogênese do *R. microplus* e está conservada em carrapatos, assim como em outros organismos.

A glicogênio sintase quinase (GSK-3) é uma enzima envolvida no metabolismo do glicogênio do *R. microplus* (LOGULLO et al., 2009). Sabe-se que quando a concentração de glicose no sangue dos organismos mamíferos encontra-se em níveis altos há também a presença de insulina em grandes concentrações. A sinalização por insulina na linhagem celular embrionária BME26 de *R. microplus* resulta na ativação da Akt que fosforila e inibe a GSK-3. Com a GSK-3 inibida há a ativação da glicogênio sintase que promove a formação de glicogênio. A GSK-3 apresenta duas isoformas: GSK-3 α e GSK-3 β . Apenas a isoforma GSK-3 β está presente no *R. microplus*, sendo o ovário aparentemente o principal sítio de transcrição dessa proteína (LOGULLO et al., 2009). Durante a embriogênese do carrapato, o pico de atividade da GSK-3 é coincidente com a menor concentração de glicogênio. Em resposta à estimulação de células BME26 com insulina a atividade da GSK-3 é inibida por fosforilação através da via PI3K/Akt (ABREU et al., 2009). A administração do inibidor de GSK-3 β Austerpaullone em fêmeas adultas ingurgitadas (teleógenas) e parcialmente ingurgitadas (partenógenas) afeta o desenvolvimento do embrião através da diminuição da oviposição e da eclosão dos ovos (FABRES et al., 2010). A expressão de GSK-3 foi silenciada pela técnica de RNA de interferência em partenógenas resultando numa diminuição da oviposição e da eclosão dos ovos, além de alterações morfológicas no embrião (FABRES et al., 2010), indicando um envolvimento da GSK-3 na embriogênese do carrapato.

2.2 Metabolismo proteico

A ovogênese nos animais ovíparos inicia-se no ovário da fêmea adulta durante o período de alimentação. Na formação dos oócitos, metabólitos energéticos de origem materna são estocados nessas estruturas, principalmente em forma de grânulos de vitelo (FAGOTTO,

1990). Para o desenvolvimento do embrião em artrópodes grandes quantidades de proteínas do vitelo são requeridas, sendo muitas delas sintetizadas fora dos oócitos. Corpo gorduroso, ovários e intestino são os principais órgãos envolvidos na síntese de proteínas do vitelo (SEIXAS et al., 2003; SEIXAS et al., 2010). A vitelina é a principal proteína do vitelo e por ser uma hemoproteína, confere aos ovos uma coloração amarronzada. O precursor da vitelina, a vitelogenina, é sintetizada no corpo gorduroso, exportada para a hemolinfa materna, endocitada pelos oócitos e depois estocada nos grânulos de vitelo (ABREU et al., 2004). Depois da fertilização do oócito uma das funções da vitelina é o fornecimento de aminoácidos para o desenvolvimento embrionário (CAMPOS et al., 2006; CHO et al., 1999). Sabe-se que o *R. microplus* nas fases embrionária e também larval, além da fêmea adulta ingurgitada, não sintetiza o anel de protoporfirina, sendo dependente da hemoglobina obtida através da digestão do sangue do hospedeiro vertebrado para a síntese de suas hemoproteínas (BRAZ et al., 1999; LOGULLO et al., 2002). Com isso os ovos devem conter todo o heme necessário para a síntese de hemoproteínas requeridas para o desenvolvimento embrionário. A vitelina atua também como um reservatório de heme, ligando à sua estrutura o heme livre que excede o conteúdo necessário para a síntese das hemoproteínas envolvidas na formação do embrião. Cada vitelina pode ligar à sua estrutura mais de trinta moléculas de heme. (LOGULLO et al., 2002; RYTER; TYRREL, 2000) . Tendo em vista que a molécula de heme livre é um potente gerador de radicais livres (LARA et al., 2003) a vitelina atua como um antioxidante (LOGULLO et al., 2002). A degradação da vitelina para fornecer aminoácidos durante a embriogênese inicia logo após a oviposição e 40% de seu total é consumido pelo embrião em formação até o momento da eclosão larval, sugerindo que sua metabolização é um processo lento e controlado (LOGULLO et al., 2002). A vitelina remanescente após a embriogênese é utilizada como fonte energética durante a fase larval até que o carrapato encontre o

hospedeiro vertebrado e inicie a alimentação. E devido à função da vitelina de ligante de heme, o conteúdo total de heme permanece constante durante a embriogênese independente da taxa de degradação da vitelina. Sabe-se que embora a concentração de vitelina diminua consideravelmente no início da embriogênese, o total proteico presente nos ovos do *R. microplus* permanece constante na transição da oviposição à eclosão. Tais observações indicam que aminoácidos derivados da degradação da vitelina são utilizados na síntese de outros componentes proteicos importantes para a formação do blastoderma (CAMPOS et al., 2006; LOGULLO et al., 2002).

Os grânulos de vitelo possuem um grupo de enzimas responsáveis pela disponibilização dos metabólitos ali estocados (CLARA et al., 2011; SEIXAS et al., 2010). A degradação da vitelina durante da embriogênese é desencadeada pela acidificação dos grânulos de vitelo e tem sido associada com a atividade de diferentes proteases. A acidificação dos grânulos de vitelo inicia a partir do quarto dia de desenvolvimento embrionário (ABREU et al., 2004) coincidindo com a formação do blastoderma sincicial. Essa acidificação ocorre devido a um aumento na atividade da bomba H^+ - ATPase, e ativa diferentes endopeptidases envolvidas na hidrólise do vitelo. Foram caracterizadas três proteinases responsáveis pela hidrólise da vitelina nos ovos de *R. microplus*, sendo duas dessas enzimas pertencentes à classe das aspártico proteinases (THAP e BYC) e uma à classe das cisteíno proteinases (VTDCE). A THAP (Tick Heme-binding Aspartic Protease) é uma proteinase que tem a atividade regulada através de heme (SORGINE et al., 2000). Torna-se ativa por autocatálise e hidrolisa vitelina em pH ácido (POHL et al., 2008). A síntese da THAP ocorre no corpo gorduroso, ovário e intestino sendo secretada para a hemolinfa materna e concentrada nos oócitos após sua endocitose pelo ovário. No ovário de teleógenas, assim como nos ovos, essa enzima aparece como dois polipeptídeos (proenzima e enzima

ativa), sendo parte desses polipeptídeos convertidos em sua forma ativa no início da embriogênese enquanto que os polipeptídeos remanescentes são proteoliticamente processados durante o restante do desenvolvimento do embrião (POHL et al., 2008). A regulação da atividade da THAP por heme sugere seu envolvimento em um mecanismo controlado de degradação da vitelina. A taxa de degradação da vitelina pela THAP deve estar de acordo com a utilização de heme para a síntese de hemeproteínas, evitando assim, a citotoxicidade celular gerada por essa molécula (SORGINE et al., 2000). A BYC (*Boophilus* Yolk pro-Cathepsin) é um precursor de uma aspártico proteinase, tendo assim sua atividade completamente inibida pela adição de um inibidor dessa classe de enzimas (LOGULLO et al., 1998; NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). A BYC está envolvida na degradação das proteínas do vitelo durante a embriogênese (LEAL et al., 2006; LOGULLO et al., 1998) sendo que a acidificação dos grânulos de vitelo é responsável pela ativação da BYC através da remoção do pró-peptídeo por auto-proteólise (LOGULLO et al., 1998). A síntese dessa proteinase ocorre no intestino e no corpo gorduroso de fêmeas completamente ingurgitadas e a proteína está presente em ovos e na hemolinfa de teleógenas (LOGULLO et al., 1998). A vitelina é seu substrato específico embora também apresente uma menor atividade sobre a hemoglobina bovina, sendo a hemoglobina um substrato clássico para aspártico endopeptidases (ABREU et al., 2004; NASCIMENTO-SILVA et al., 2008). Interessantemente, demonstrou-se que a BYC, diferentemente de outras aspártico endopeptidases, não tem o segundo resíduo de ácido aspártico no sítio catalítico. Devido à participação na disponibilização de substratos energéticos para o desenvolvimento do embrião foi testada como antígeno vacinal contra o *R. microplus*. Na vacinação de bovinos com BYC nativa, dentre os parâmetros analisados, houve principalmente a diminuição na fertilidade e eclosão dos ovos nos animais imunizados, atestando o envolvimento da proteína durante a

embriogênese (DA SILVA VAZ et al., 1998). Já na vacinação com a BYC recombinante, embora a proteção total contra o *R. microplus* tenha sido semelhante à obtida pela vacinação com a BYC nativa, a diminuição no número e do peso de teleógenas no grupo vacinado foi a principal alteração encontrada (LEAL et al., 2006). Outra enzima envolvida na degradação da vitelina é uma cisteína endopeptidase denominada VTDC (Vitelin-Degrading Cysteine Endopeptidase) que se apresenta ativa no estágio embrionário, larval e em ovários de teleógenas (SEIXAS et al., 2003). Sugere-se que seja sintetizada fora do ovário como uma pró-endopeptidase, sendo associada fortemente à vitelina nos grânulos de vitelo e ativada por acidificação do meio. Quando comparada com as outras duas enzimas envolvidas na degradação da vitelina durante a embriogênese, THAP e BYC, a VTDC mostra a maior atividade na hidrólise da vitelina. Em um ensaio *in vitro* em pH ácido a VTDC foi capaz de hidrolisar todos os peptídeos relacionados à vitelina purificada de ovos de primeiro dia, enquanto a THAP hidrolisou parcialmente os peptídeos e a BYC não hidrolisou a vitelina (SEIXAS et al., 2008). Em um teste de vacinação de bovinos com a VTDC nativa houve redução no número e no peso das teleógenas assim como redução da postura e fertilidade dos ovos sugerindo o potencial do uso da proteína para o controle do *R. microplus* (SEIXAS et al., 2008).

Assim como a metabolização de aminoácidos é importante para o desenvolvimento embrionário, ela também o é para a sobrevivência do carrapato na etapa de vida larval até que o mesmo encontre o hospedeiro vertebrado e realize sua primeira alimentação. Peptídeos relacionados à vitelina foram identificados nas larvas de *R. microplus* (CANAL et al., 1995). Sabe-se que a vitelina está presente na larva em jejum e que há diminuição da concentração celular da proteína com o passar dos dias, sugerindo sua metabolização durante o desenvolvimento larval (ESTRELA; SEIXAS; TERMIGNONI, 2007). Há também uma

diminuição no conteúdo total de proteína durante o desenvolvimento larval. Tendo em vista a diminuição de ambos os conteúdos de vitelina e proteína total ao longo da fase de vida larval sugere-se que nessa etapa a vitelina seja utilizada em outras rotas metabólicas que não as de síntese de aminoácidos como ocorre na embriogênese. Para que a vitelina possa ser utilizada como fonte de aminoácidos é fundamental que seja hidrolisada por enzimas com atividades proteolíticas. Um aumento da atividade de cisteíno endopeptidases durante o desenvolvimento larval é associada com a degradação da vitelina. A RmLCE (*R. microplus* Larval Cysteine Endopeptidase) é uma cisteíno endopeptidase com atividade de hidrólise da vitelina em larvas de *R. microplus* (ESTRELA, SEIXAS; TERMIGNONI, 2007). Diferentemente da VTDCE a RmLCE não está fortemente associada à vitelina. Ambas VTDCE e RmLCE têm a capacidade de degradar a vitelina presente nos ovos, porém a RmLCE é significativamente mais ativa sobre a vitelina larval quando comparada com a atividade da VTDCE sob o mesmo substrato (ESTRELA et al., 2010). As vitelinas do ovo e da larva apresentam diferenças de composição em suas subunidades. A RmLCE é responsável pela degradação dos polipeptídeos da vitelina que não foram metabolizados durante a embriogênese pela VTDCE. Além de degradar vitelina a RmLCE também é capaz de hidrolisar hemoglobina sugerindo o papel da enzima na metabolização dessa molécula no início da alimentação larval. Assim, quando administrado um inibidor de cisteíno proteinases em larvas e em intestino de partenógenas a degradação respectivamente de vitelina e hemoglobina é inibida.

Após a formação do blastoderma celular, evento que ocorre entre o quarto e o sexto dia da embriogênese, inicia-se o catabolismo de aminoácidos para a síntese de glicose através da gliconeogênese. De forma que ao final do desenvolvimento embrionário são encontradas grandes concentrações de guanina nos ovos, provenientes da metabolização dos aminoácidos (MORAES et al., 2006). O aminoácido aspartato através da ação da aspartato

aminotransferase (AAT) é convertido em oxalacetato, metabólito que será dirigido para a via da gliconeogênese. Com isso a AAT tem sua atividade aumentando progressivamente após a formação das células embrionárias à medida que a via da gliconeogênese torna-se ativa. A glutamato desidrogenase (GDH), responsável pela desaminação oxidativa dos aminoácidos, segue padrão de atividade semelhante à AAT estando de acordo com o indicativo de intensa degradação de aminoácidos logo após a celularização embrionária.

2.3 Metabolismo lipídico

Em *R. microplus* os metabólitos lipídicos constituem a principal fonte energética para a formação do blastoderma celular. Sendo assim, a concentração de lipídeos totais nos ovos sofre redução na passagem da primeira para a segunda fase energética da embriogênese [42, (MORAES et al., 2006)]. O monitoramento nos ovos da concentração do acetoacetato, metabólito originado da degradação dos ácidos graxos, está de acordo com a variação de lipídeos ocorrida na celularização do embrião. Com isso ocorre um aumento da concentração desse corpo cetônico na transição do embrião sincicial para o embrião segmentado [42]. Mesmo os lipídeos sendo metabolizados para a formação do blastoderma celular, menos da metade do total de lipídeos presentes nos ovos é consumida até a eclosão, sugerindo que esse seja um substrato importante para a obtenção de energia na etapa de vida larval do carrapato até que o mesmo encontre seu hospedeiro e inicie a alimentação (CAMPOS et al., 2006).

Em insetos os lipídeos correspondem a aproximadamente 30-40% do peso seco dos ovos (BRIEGEL, 1990), sendo o principal recurso energético para o embrião em desenvolvimento (BEENAKKERS; CHINO; LAW, 1988). O principal lipídeo presente nos oócitos de insetos é o triacilglicerol (TAG), havendo também uma pequena quantidade de

fosfolipídeos (utilizado pelo embrião para a formação de membranas) e colesterol. Os oócitos de insetos são capazes de sintetizar TAG a partir de ácidos graxos, porém a capacidade de sintetizar ácidos graxos é limitada (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006). Sendo assim, a maior quantidade de lipídeos metabolizados na embriogênese deve ser obtida através da alimentação da fêmea ou de estoques disponibilizados a partir do corpo gorduroso materno (ZIEGLER; VAN ANTWERPEN, 2006). Em *Rhodnius prolixus*, diacilglicerol (DAG) e ácidos graxos livres (FFA) são transportados pela hemolinfa até os ovários através da lipoproteína lipoforina, e armazenados sob forma de TAG nos oócitos (SANTOS et al., 2011). Interessantemente, em fêmeas não fertilizadas de *R. prolixus* não há o consumo de TAG, mostrando que a fertilização é importante para a degradação desse substrato (SANTOS et al., 2008). Enzimas como as esterases e lipases são responsáveis por hidrolisar o TAG armazenado nos oócitos de insetos, liberando DAG que por sua vez quando hidrolisado origina ácidos graxos que são oxidados gerando energia para as reações metabólicas para o desenvolvimento do embrião (RYAN; VAN DER HORST, 2000).

3 DISCUSSÃO

O estudo do metabolismo do *R. microplus* e caracterização de moléculas vitais poderá permitir a identificação de antígenos com potencial de serem empregados no controle imunológico. Em países como Cuba e Austrália o uso de vacina anti-*R. microplus* é uma realidade que outros países vêm buscando através de esforços de diversos grupos de pesquisa. O estudo das rotas metabólicas energéticas participantes do desenvolvimento do embrião é uma das abordagens nessa busca por alvos vacinais e que vem demonstrando resultados promissores.

No metabolismo dos açúcares diferentes enzimas das vias glicolítica, gliconeogênica e glicogênica do *R. microplus* já foram caracterizadas. Devido à importância das vias para a disponibilização de glicose, a interferência em alguma dessas rotas metabólicas pode ser letal para o desenvolvimento do embrião. Ensaios demonstraram que a reserva materna de glicogênio nos ovos é inicialmente metabolizada através da glicólise como fonte de energia para a formação do embrião, e que após esgotados os estoques de glicose esse metabólito é obtido por meio da gliconeogênese pelo próprio embrião. A GSK-3 é uma importante enzima na regulação da síntese de glicogênio quando há glicose presente na célula. Sua inibição na embriogênese através de diferentes mecanismos interferiu no desenvolvimento do embrião demonstrando seu potencial como alvo para o controle do carrapato.

Após a formação do blastoderma celular e consumo do estoque de glicogênio materno, a energia requerida para o desenvolvimento do embrião é suprida pela degradação das proteínas do vitelo que são estocadas nos ovos durante a ovogênese. A disponibilização dos aminoácidos nos oócitos de *R. microplus* ocorre através da atividade de diferentes proteinases. A peptidase THAP degrada a vitelina dos ovos disponibilizando aminoácidos para as vias metabólicas energéticas da embriogênese. Além disso, essa enzima é regulada pela molécula de heme, degradando seu substrato proteico à medida que o heme é utilizado. Tal mecanismo impede os efeitos deletérios da toxicidade gerada pelo heme livre. A interferência na atividade da THAP poderia interferir na disponibilização da vitelina, alterando o desenvolvimento do embrião e também causar a morte do parasita por citotoxicidade induzida por heme. A imunização de bovinos com as formas nativa e recombinante da BYC, outra enzima envolvida na disponibilização da vitelina na embriogênese, mostrou uma proteção parcial dos bovinos contra a infestação pelo carrapato através da redução da eclosão dos ovos e peso das teleógenas após a alimentação. Sendo assim, a BYC é um alvo vacinal com potencial de

compor uma vacina multiantigênica em que a proteção parcial de diferentes antígenos se somem, resultando assim em uma sinergia na proteção contra o carrapato. Quando comparada à THAP e BYC, a VTDCE apresentou maior atividade sobre a vitelina purificada de ovos de primeiro dia após a postura. Em experimentos de vacinação com a VTDCE nativa houve redução no peso e número de teleógenas após a alimentação em bovinos imunizados, além de redução na fertilidade e eclosão dos ovos. Esses dados sugerem que a VTDCE possa atuar em diferentes etapas de vida do *R. microplus*, caracterizando-se como uma molécula relevante para o desenvolvimento de métodos de controle do parasita. A RmLCE é uma protease ativa na etapa de vida larval do carrapato, disponibilizando vitelina para a obtenção de energia até que a larva encontre o hospedeiro vertebrado e realize sua primeira alimentação. Assim como a BYC, a RmLCE atua sobre a hemoglobina sugerindo um papel na degradação dessa molécula no repasto sanguíneo larval. Uma intervenção na atividade da RmLCE além de poder reduzir a sobrevivência larval pela escassez de substratos energéticos disponíveis para o desenvolvimento do carrapato, poderia interferir na formação das hemeproteínas que necessitam do heme obtido através da hidrólise do sangue do hospedeiro para serem sintetizadas.

Em insetos a literatura relata a importância da metabolização dos substratos lipídicos para a formação do embrião. Estudos em *R. microplus* demonstraram que os compostos aglicanos são fundamentais para a formação do blastoderma celular durante a embriogênese, e que possivelmente sejam um substrato para a obtenção de energia também na etapa de vida larval. Pouco se sabe acerca das enzimas envolvidas na hidrólise e transporte dos lipídeos em carrapatos. Estudos dirigidos para a identificação dessas lipases poderiam elucidar a disponibilização lipídica nas diferentes etapas de vida do *R. microplus*, auxiliando no

entendimento do metabolismo do parasita e no desenvolvimento de novos métodos de controle do carrapato.

REFERÊNCIAS

- ABREU, L. A., FABRES, A., ESTEVES, E., MASUDA, A., DA SILVA VAZ JR, I., DAFFRE, S.; LOGULLO, C. Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Biochemistry & Molecular Biology**. v. 153, n. 2, p. 185–190, 2009.
- ABREU, L. A., VALLE, D., MANSO, P. P., FAÇANHA, A. R., PELAJO-MACHADO, M., MASUDA, H., MASUDA, A., VAZ, I. JR., LENZI, H., OLIVEIRA, P. L.; LOGULLO C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 34, n. 5, p. 443-449, 2004.
- BEENAKKERS, A. M. T., CHINO, H.; LAW J. H. Lipophorin nomenclature. **Insect Biochemistry**. v. 18, p. 1-2, 1988.
- BELL-SAKYI, L., ZWEYGARTH, E., BLOUIN, E. F., GOULD, E. A.; JONGEJAN, F. Tick cell lines: tolls for tick and tick-borne disease research. **Trends in Parasitology**. v. 23, n. 9, p. 450-457, 2007.
- BRAZ, G. R., COELHO, H. S., MASUDA, H.; OLIVEIRA P. L. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology:CB**. v. 9, n. 13, p. 703-706, 1999.
- BRIEGEL, H. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. **Journal of Insect Physiology**. v. 36, p. 165-172, 1990.
- CAMPOS, E., MORAES, J., FAÇANHA, A. R., MOREIRA, E., VALLE, D., ABREU, L., MANSO, P. P., NASCIMENTO, A., PELAJO-MACHADO, M., LENZI, H., MASUDA, A., VAZ, I. DA S. JR.; LOGULLO C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**. v. 138, n. 3-4, p. 349-357, 2006.
- CANAL, C. W., MAIA, H. M., VAZ, JÚNIOR. I. S., CHIES, J. M., FARIAS, N. A., MASUDA, A., GONZALES, J. C., OZAKI, L. S.; DEWES H. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**. v. 19, n. 6, p. 325-336, 1995.
- CHERRY, L. M. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrine). **Australian Journal of Zoology**. v. 21, p. 403-412, 1973.
- CHO, W. L., TSAO, S. M., HAYS, A. R., WALTER, R., CHEN, J. S., SNIGIREVSKAYA, E. S.; RAIKHEL, A. S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 274, n. 19, p. 13311-13321, 1999.

CLARA, R. O., SOARES, T. S., TORQUATO, R. J., LIMA, C. A., WATANABE, R. O., BARROS, N. M., CARMONA, A. K., MASUDA, A., VAZ, I. S. JR.; TANAKA, A. S. *Boophilus microplus* cathepsin L-like (BmCL1) cysteine protease: Specificity study using a peptide phage display library. **Veterinary Parasitology**. v. 181, n. 2-4, p. 291-300, 2011.

CORSON, M. S., TEEL, P. D.; GRANT W. E. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick (*Boophilus* spp.) population dynamics. **Ecological Modelling**. v. 180, n. 4, p. 487-514, 2004.

DA SILVA VAZ, I. JR., LOGULLO, C., SORGINE, M., VELLOSO, F. F., ROSA DE LIMA, M. F., GONZALES, J. C., MASUDA, H., OLIVEIRA, P. L.; MASUDA A. Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 66, n. 3-4, p. 331-341, 1998.

DE LA FUENTE, J., ALMAZÁN, C., CANALES, M., PÉREZ DE LA LASTRA, J. M., KOCAN, K. M.; WILLADSEN, P. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. **Animal Health Research Reviews/Conference of Research Workers in Animal Disease**, v. 8, n. 1, p. 23-28, 2007.

DE LA FUENTE, J., RODRÍGUEZ, M., REDONDO, M., MONTERO, C., GARCÍA-GARCÍA, J. C., MÉNDEZ, L., SERRANO, E., VALDÉS, M., ENRIQUEZ, A., CANALES, M., RAMOS, E., BOUÉ, O., MACHADO, H., LLEONART, R., DE ARMAS, C.A., REY, S., RODRÍGUEZ, J. L., ARTILES, M.; GARCÍA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**. v. 16, n. 4, p. :366-373, 1998.

ESTEVEZ, E., LARA, F. A., LORENZINI, D. M., COSTA, G. H., FUKUZAWA, A. H., PRESSINOTTI, L. N., SILVA, J. R., FERRO, J. A., KURTTI, T. J., MUNDERLOH, U. G.; DAFFRE, S. Cellular and molecular characterization of an embryonic cell (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 38, n. 5, p. 568-580, 2008.

ESTRELA, A. B., SEIXAS, A., TEIXEIRA, V DE.O., PINTO, A. F.; TERMIGNONI, C. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**.v. 157, n. 4, p. 326-335, 2010.

ESTRELA, A. B., SEIXAS, A.; TERMIGNONI C. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology**. v. 148, n. 4, p. 410-416, 2007.

FABRES, A., DE ANDRADE, C. P., GUIZZO, M. G., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., MASUDA, A., VAZ, I.DA S. JR.; LOGULLO C. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. **Parasitology**. v. 137, n. 10, p. 1537-1546, 2010.

- FAGOTTO, F. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 14, n. 4, p. 217-235, 1990.
- GRAF, J. F., GOGOLEWSKI, R. LEACH-BING, N. SABATINI, G. A., MOLENTO, M. B., BORDIN, E. L.; ARANTES, G. J. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**. v. 129, p. 427-442, 2004.
- GRISI, L., MASSARD, C. L., MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**. v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- GUERRERO, F. D., NENE, V. M., GEORGE, J. E., BARKER, S. C.; WILLADSEN, P. Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. **Journal of Medical Entomology**. v. 43, n. 1, p. 9-16, 2006.
- RA, S., KONNAI, S., VAZ, I.DA S., YAMADA, S., NAKAJIMA, C., ITO, Y., TAJIMA, T., YASUDA, J., SIMUUNZA, M., ONUMA, M.; OHASHI K. Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. **The Japanese Journal of Veterinary Research**. v. 56, n. 2, p. :85-98, 2008.
- LARA, F. A., LINS, U., PAIVA-SILVA, G., ALMEIDA, I. C., BRAGA, C. M., MIGUENS, F. C., OLIVEIRA, P. L.; DANSA-PETRETSKY, M. A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. **The Journal of Experimental Biology**. v. 206, p. 1707-1715, 2003.
- LEAL, A. T., SEIXAS, A., POHL, C. P., FERREIRA, C. A., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., FARIAS, S. E., TERMIGNONI, C., DA SILVA VAZ, I. JR.; MASUDA, A. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 114, n. 3-4, p. 341-345, 2006.
- LOCHHEAD, P. A., COGHLAN, M., RICE, Q. J. S.; SUTHERLAND, C. Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. **Diabetes**. 50:937-946. 2001.
- LOGULLO, C., MORAES, J., DANSA-PETRETSKI, M., VAZ, I. S., MASUDA, A., SORGINE, M. H., BRAZ, G. R., MASUDA, H.; OLIVEIRA P. L. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 12, p. 1805-1811, 2002.
- LOGULLO, C., VAZ, I.DA S., SORGINE, M. H., PAIVA-SILVA, G. O., FARIA, F. S., ZINGALI, R. B., DE LIMA, M. F., ABREU, L., OLIVEIRA, E. F., ALVES, E. W., MASUDA, H., GONZALES, J. C., MASUDA, A.; OLIVEIRA P. L. Isolation o an aspartic proteinase precursor rom the egg o a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**. v. 116, n. 6, p. 525-532, 1998.

LOGULLO, C., WITOLA, W. H., ANDRADE, C., ABREU, L., GOMES, J., DA SILVA VAZ, I. JR., IMAMURA, S., KONNAI, S., OHASHI, K.; ONUMA M. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**. v. 161, n. 3-4, p. 261-269, 2009.

MEHLHORN, H., AL-RASHEID, K. A., AL-QURAI SHY, S.; ABDEL-GHAFFAR, F. Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. **Parasitology Research**. v. 436, n. 11, p. :2480-2487, 2011.

MORAES, J. Embriogênese do carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: uma visão integrada do metabolismo energético e caracterização de uma triose fosfato isomerase. 93f. Rio de Janeiro, RJ. (Dissertação de doutorado em biociências e biotecnologia). Programa de Pós-graduação em biociências e biotecnologia. Universidade Estadual do Norte Fluminense. 2007.

MORAES, J., ARREOLA, R., CABRERA, N., SARAMAGO, L., FREITAS, D., MASUDA, A., DA SILVA VAZ, I. JR., TUENA DE GOMEZ-PUYOU, M., PEREZ-MONTFORT, R., GOMEZ-PUYOU, A.; LOGULLO, C. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 41, n. 6, p. 400-409, 2011.

MORAES, J., GALINA, A., ALVARENGA, P. H., REZENDE, G. L., MASUDA, A., DA SILVA VAZ, I. JR.; LOGULLO C. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology**. v. 146, n. 4, p. 528-533, 2007.

MURILLO-MALDONADO, J. M., SÁNCHEZ-CHÁVEZ, G., SALGADO, L. M., SALCEDA, R.; RIESGO-ESCOVAR, J. R. Drosophila insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid and carbohydrate metabolism. **Diabetes**. v. 60, n. 5, p. 1632-1636, 2011.

NASCIMENTO-SILVA, M. C., LEAL, A. T., DAFFRE, S., JULIANO, L., DA SILVA VAZ, I. JR., PAIVA-SILVA, G. O., OLIVEIRA, P. L.; SORGINE, M. H. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. **Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**. v. 149, n. 4, p. 599-597, 2008.

PARIZI, L. F., MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. JR. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 35, n. 3, p. 285-294, 2007.

PARIZI, L. F., UTIUMI, K. U., IMAMURA, S., ONUMA, M., OHASHI, K., MASUDA, A.; DA SILVA VAZ, I. JR. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. **Experimental Parasitology**. v. 127, n. 1, p. 113-118, 2011.

- PETER, R. J., VAN DEN BOSSCHE, P., PENZHORN, B. L.; SHARP, B. Tick, fly, and mosquito control - Lessons from the past, solutions for the future. **Veterinary Parasitology**. v. 132, n. 3-4, p. 205-215, 2005.
- POHL, P. C., SORGINE, M. H., LEAL, A. T., LOGULLO, C., OLIVEIRA, P. L., VAZ, I. DA S.JR. ; MASUDA, A. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. Biochemistry & Molecular Biology**. v. 151, n. 4, p. 392-399, 2008.
- PRUETT J.H. Immunological control of arthropod ectoparasites – a review. **International Journal for Parasitology**. v. 29, n. 1, p. :25-32, 1999.
- RAO, K. P.; GOPALAKRISHNAREDDY, T. Nitrogen excretion in arachnids. **Comparative Biochemistry and Physiology**. v. 7, p. 175-178, 1962.
- RYAN, R. O. & VAN DER HORST, D. J. Lipid transport biochemistry and its role in enzyme production. **Annual Review of Entomology**. v. 45, p. 233-260, 2000.
- RYTER, S. W., TYRREL R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 28, n. 2, p. 289-309, 2000.
- ROSARIO-CRUZ, R., ALMAZAN, C., MILLER, R. J., DOMINGUEZ-GARCIA, D. I., HERNANDEZ-ORTIZ, R.; DE LA FUENTE, J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. **Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library**. v. 14, p. 2657-2665, 2009.
- SANTOS, R., MARIANO, A. C., ROSAS-OLIVEIRA, R., PASCARELLI, B., MACHADO, E. A., MEYER-FERNANDES, J. R.; GONDIM K. C. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 67, n. 2, p. 55-62, 2008.
- SANTOS, R., ROSAS-OLIVEIRA, R., SARAIVA, F. B., MAJEROWICZ, D.; GONDIM K. C. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**. v. 77, n. 1, p. 1-16, 2011.
- SEIXAS, A., DOS SANTOS, P. C., VELLOSO, F. F., DA SILVA VAZ, I. JR., MASUDA, A., HORN F.; TERMIGNONI C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**. v. 126, p. 155-163, 2003.
- SEIXAS, A., LEAL, A. T., NASCIMENTO-SILVA, M. C., MASUDA, A., TERMIGNONI, C.; DA SILVA VAZ, I. JR. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDC). **Veterinary Immunology and Immunopathology**. v. 124, n. 3-4, p. 322-340, 2008.
- SEIXAS, A., OLDIGES, D. P., DA SILVA VAZ, I. JR.; TERMIGNONI, C. Endocrinologia e controle da vitelogenese em carrapatos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v. 38, n. 2, p. 95-111, 2010.

SONG, J. L., WONG, J. L.; WESSEL, G. M. Oogenesis: Single cell development and differentiation. **Developmental Biology**. v. 300, n. 1, p. :385-405, 2006.

SORGINE, M. H., LOGULLO, C., ZINGALI, R. B., PAIVA-SILVA, G. O., JULIANO, L.; OLIVEIRA P. L. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 275, n. 37, p. 28659-28665, 2000.

SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. **Veterinary Parasitology**. v. 180, n. 1-2, p. 109-125, 2011.

WILLADSEN, P. Vaccines, genetics and chemicals in tick control: the Australian experience. **Tropical Animal Health and Production**. v. 29, p. 91-94, 1997.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Parasitology**. v. 129, p. 367-387, 2004.

ZIEGLER, R.; VAN ANTWERPEN, R. Lipid uptake by insects oocytes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 36, n. 4, p. 264-272, 2006.