

Metabolismo de biomoléculas na embriogênese do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Metabolism of Biomolecules in the Embryogenesis of the Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Melina Garcia Guizzo^{1,2}, Leonardo Abreu³, Aoi Masuda¹, Carlos Logullo³ & Itabajara da Silva Vaz Junior^{1,2}

ABSTRACT

Background: The hard tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is an hematophagous ectoparasite that causes important economic losses in the cattle raising. The control of the parasite is usually accomplished through the use of acaricides. Even though these chemicals substances present effectiveness, their continuous use can lead to the selection of resistant parasites. When not used properly acaricides can cause environmental damages in addition to risks for animal and human health. Because of these drawbacks there are efforts to the development of alternatives control methods. The immunological control is a promising method due to target specificity, which increases the environmental and animal safety. The development of such approach relies on the discovery and characterization of molecules involved in the metabolism of the parasite different life stages. The embryogenesis is the stage where the metabolites of maternal origin are mobilized through catabolic and anabolic pathways necessary for the development of the embryo. The study of the substrates and enzymes involved in metabolic pathways of the embryogenesis allows the directed search to potential antigens to the development of an anti-*R. microplus* vaccine.

Review: The embryo, during its development, passes through the stages of a sincicial blastoderm, celular blastoderm and segmentation, and both morfological changes and energy sources mobilization are related. Lipids are the major energetic source to the cellular blastoderm formation. Up to cellularization stage and after embryo segmentation, sugars are the main metabolite required. It supports that tick embryogenesis occurs with two distinct phases regarding glucose utilization by the embryo. In the initial phase, until the formation of the celular blastoderm, there is the utilization of the maternal energetic source stored in oocytes, like glycogen. After segmentation, until larval hatching, the embryo performs gluconeogenesis through non-glucidic compounds to obtain the energy input required for its metabolism. Therewith occurs the activation of the glycolytic and gluconeogenic pathways to provide glucose to the developing embryo. Due to the high levels of glucose available, it is suggested that the insulin pathway is active and be conserved in *R. microplus*, as previously described for other organisms. Glycogen accumulation observed throughout tick embryogenesis could be a response to an endogenous insulin-like signal. During gluconeogenesis's amino acids stored in the storage proteins of the yolk granules are enzymatically mobilized to supply the metabolic energy required for the embryo development. In this context, three peptidases involved in the degradation of yolk proteins in eggs and one peptidase in larvae were characterized, and demonstrate the importance of the use of amino acids in this phase of the tick's life. Another metabolite involved in the development of the embryo is water, whose homeostasis must be maintained in the parasitic and environmental stages of the *R. microplus*'s life. The function of water maintenance in eggs is particularly important for embryo development.

Conclusion: The study of the energetic pathways important to the metabolism of *R. microplus*'s embryo is a promising way for development of control methods. In this context different enzymes involved in providing energetic substrates for the embryogenesis have been indentified, characterized and can be used as targets in the immunological control of the tick. Proteinases characterized from *R. microplus* eggs, BYC and VTDCE, were tested as antigens to immunize bovines and provided to be immunoprotective against the parasite. Other enzymes also showed a potential to be used as targets in an anti-*R. microplus* vaccine.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, metabolism, embryogenesis, biomolecules, energy.

Descritores: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, metabolismo, embriogênese, biomoléculas, energia.

I. INTRODUÇÃO

II. BALANÇO METABÓLICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

1. Metabolismo de glicose e glicogênio
 - 1.1 Sinalização celular mediada pela cascata de insulina no *R. microplus*
2. Metabolismo protéico
3. Metabolismo dos lipídeos
4. Metabolismo da água

III. DISCUSSÃO

IV. REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um ectoparasita hematófago que causa importantes perdas econômicas produtivas na bovinocultura extensiva [21]. 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 [51]. 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* [66]. Com isso estima-se um prejuízo mundial de 10 bilhões de dólares ao ano com as perdas decorrentes do parasitismo causada pelo *R. microplus* [31]. 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 [32,57,58]. 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 [30]. Sendo assim, há a necessidade econômica, social e ambiental de esforços direcionados ao estudo da fisiologia do *R. microplus* objetivando criar alternativas para o desen-

volvimento de novos métodos de controle do parasita [41]. 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 [53]. 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 [34,69]. 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 [21,22,68]. 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 [20,36,49,50,62]. 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 [63].

A embriogênese nos organismos ovíparos ocorre na ausência de nutrientes exógenos sendo dependente das reservas maternas estocadas nos oócitos, principalmente como grânulos de vitelo [28,64]. 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 [15,16]. 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 [63].

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 [19,29]. Há uma correlação entre as mudanças morfológicas ocorridas no embrião durante

a embriogênese e a mobilização dos componentes energéticos [13]. No início da embriogênese o embrião é unicelular e após intensas divisões mitóticas torna-se unicelular polinucleado caracterizando a etapa de blastoderma sincicial [2,64]. 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 [44]. 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 [13]. No sétimo dia o embrião apresenta-se segmentado e tem início a segunda fase energética [44] 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 [54]) 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 [13].

II. BALANÇO METABÓLICO DURANTE A EMBRIOGÊNESE DO CARRAPATO *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS*

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 [13]. 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 [44]. 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 [44].

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 [44]. 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 [43].

1.1 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* [1,45]. A insulina participa do metabolismo dos carboidratos e na regulação da expressão gênica da PI3K (fosfatidilinositol 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 PEPCK além de regular a expressão de genes específicos [37]. A insulina exógena quando administrada em meio próprio para cultura de células de uma linhagem embrionária de *R. microplus*, denominada BME26 [6,24] estimula o acúmulo de glicogênio celular, sendo os inibidores de PI3K capazes de bloquear esse efeito [1]. 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* [40]. Sabe-se que quando a concentração de glicose no sangue dos organismos mamíferos [48] 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 [40]. 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 [1]. A administração do inibidor de GSK-3 β Austerpallone em fêmeas adultas ingurgitadas (teleógenas) e parcialmente ingurgitadas (partenógenas) afeta o desenvolvimento do embrião através da diminuição da oviposição e da eclosão dos ovos [27]. 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 [27], indicando um envolvimento da GSK-3 na embriogênese do carrapato.

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 [28]. 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 [61,63]. A vitelina é a principal proteína do vitelo e por ser uma hemeproteína, 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 [2,23]. Depois da fertilização do oócito uma das funções da vitelina é o fornecimento de aminoácidos para o desenvolvimento embrionário [13,17]. 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 hemeproteínas [10,38]. Com isso os ovos devem conter todo o heme necessário para a síntese de hemeproteínas 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 neces-

sário para a síntese das hemoproteínas envolvidas na formação do embrião. Cada vitelina pode ligar à sua estrutura mais de trinta moléculas de heme [38,56]. Tendo em vista que a molécula de heme livre é um potente gerador de radicais livres [35] a vitelina atua como um antioxidante [38]. 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 [38]. 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 [13,38].

Os grânulos de vitelo possuem um grupo de enzimas responsáveis pela disponibilização dos metabólitos ali estocados [18,63]. 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 [2] 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 [65]. Torna-se ativa por autocatálise e hidrolisa vitelina em pH ácido [52]. 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 [52]. 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 hemoproteínas, evitando assim, a citotoxicidade celular gerada por essa molécula [65]. 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 [39,46]. A BYC está envolvida na degradação das proteínas do vitelo durante a embriogênese [36,39], sendo que a acidificação dos grânulos de vitelo é responsável pela ativação da BYC através da remoção do pró-peptídeo por auto-proteólise [39]. 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 [39]. 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 [2,46]. 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 [20]. 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 [36]. Outra enzima envolvida na degradação da vitelina é uma cisteíno endopeptidase denominada VTDCE (Vitelin-Degrading Cysteine Endopeptidase) que se apresenta ativa no estágio embrionário, larval e em ovários de teleógenas [61]. 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 VTDCE mostra a maior atividade na hidrólise da vitelina. Em um ensaio *in vitro* em pH ácido a VTDCE 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 [62]. Em um teste de vacinação de bovinos com a VTDCE 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* [62].

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* [14]. 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 [26]. 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* [26]. 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 [25]. 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 [44]. 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.

3. Metabolismo dos lipídeos

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 [42,44]. 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 [13].

Em insetos os lipídeos correspondem a aproximadamente 30-40% do peso seco dos ovos [11], sendo o principal recurso energético para o embrião em desenvolvimento [5]. 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 [71]. 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 [71]. 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 [60]. 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 [59]. 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 [55].

4. Metabolismo da água

Na etapa de vida parasitária, que ocorre no hospedeiro, assim como na etapa de vida ambiental os carrapatos sofrem um estresse hídrico que deve ser administrado para a manutenção da homeostasia metabólica e sobrevivência do parasita [3]. Esse balanço é possível através de fatores como a função osmorregulatória da glândula salivar, que impede a dessecação do parasita no solo através da absorção de vapor d'água da atmosfera e também permite que aproximadamente 70% do conteúdo de água absorvido pelo intestino da fêmea devido ao grande aporte de fluídos decorrente da hematofagia seja excretado de volta ao hospedeiro durante a alimentação, permitindo a homeostase hídrica e a produção da porção fluida da saliva [9]. Por sua vez os ovos não são capazes de absorver vapor d'água do ambiente [47]. Sendo assim, eles devem ser capazes de manter a água em níveis satisfatórios para a sobrevivência do embrião. Para isso possuem mecanismos que os tornam mais resistentes à desidratação quando comparados a larvas

e adultos [70]. Há um sistema de glândulas na fêmea do *R. microplus* responsável por formar uma camada lipídica que é depositada na superfície dos ovos durante a oviposição para prevenir a dessecação dos ovos no ambiente [8]. Em *Rhipicephalus sanguineus* a desidratação dos ovos a um nível crítico não permite a eclosão dos ovos, mesmo quando os ovos são colocados em um ambiente para reidratação após o estresse hídrico, sugerindo que a homeostasia contínua do conteúdo de água é essencial para a formação do embrião [70]. Em mosquitos quando o inseto é exposto a múltiplas desidratações, e quando reidratados não recebem substratos energéticos, como o açúcar, há a produção de ovos com menor massa seca, provavelmente devido à utilização das reservas energéticas maternas para o balanço fisiológico de água [7]. Isso sugere que desidratações tem um custo energético que esgota as reservas do inseto, consequentemente interferindo no estoque energético para a formação do embrião.

As aquaporinas são proteínas de membrana celular que formam canais de passagem exclusivos de água e/ou solutos não polares já identificadas em tecidos dos carrapatos *Ixodes ricinus*, *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor variabilis*. Em *R. sanguineus* demonstrou-se a expressão de uma aquaporina exclusivamente permeável a água em tecidos envolvidos com o alto fluxo de água como o intestino e glândula salivar [4]. Em *I. ricinus* o mesmo foi demonstrado com uma aquaporina homóloga à descrita em *R. sanguineus* [12]. Embora a principal função descrita das aquaporinas seja a de regular o transporte de água, em *D. variabilis* observou-se a expressão de uma aquaporina em ovários, mas não em glândula salivar, sugerindo um papel correlacionado com o aporte nutricional e desenvolvimento embrionário [33].

III. 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 hemoproteínas 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.

A manutenção da homeostase hídrica tem papel fundamental na fisiologia da formação do embrião de carrapatos. Tendo isso em vista observou-se que a dessecação dos ovos do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* interferiu no desenvolvimento do embrião impedindo a eclosão dos ovos, demonstrando assim a importância dos mecanismos de prevenção da perda de água na embriogênese. Algumas proteínas com função de canais celulares de passagem de água já foram caracterizadas em carrapatos e fornecem informações para o estudo das aquaporinas também em *R. microplus*. Essas proteínas de membrana exercem papel na homeostase da água em tecidos associados com alto fluxo dessa molécula, podendo também estar presentes

em tecidos envolvidos com a formação dos oócitos, o que sugere seu envolvimento no desenvolvimento do embrião e infere uma nova abordagem investigativa quanto às suas funções fisiológicas.

Declaration of interest. The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

REFERÊNCIAS

- 1 Abreu L.A., Fabres A., Esteves E., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I., Daffre S. & Logullo C. 2009. 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*. 153(2): 185-190.
- 2 Abreu L.A., Valle D., Manso P.P., Façanha A.R., Pelajo-Machado M., Masuda H., Masuda A., Vaz Jr. I., Lenzi H., Oliveira P.L. & Logullo C. 2004. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 34(5): 443-449.
- 3 Anderson J.F. 2002. The natural history of ticks. *The Medical Clinics of North America*. 86(2): 205-218.
- 4 Ball A., Campbell E.M., Jacob J., Hoppler S. & Bowman A.S. 2009. Identification, functional characterization and expression patterns of a water-specific aquaporin in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 39(2): 105-112.
- 5 Beenackers A.M.T., Chino H. & Law J.H. 1988. Lipophorin nomenclature. *Insect Biochemistry*. 18: 1-2.
- 6 Bell-Sakyi L., Zwegarth E., Blouin E.F., Gould E.A. & Jongejan F. 2007. Tick cell lines: tolls for tick and tick-borne disease research. *Trends in Parasitology*. 23(9): 450-457.
- 7 Benoit J.B., Yoder J.A., Lopez-Martinez G., Elnitsky M.A., Lee R.E.Jr. & Denlinger D.L. 2007. Habitat requirements of the seabird tick, *Ixodes uriae* (Acari: Ixodidae), from the Antarctic Peninsula in relation to water balance characteristics of eggs, nonfed and engorged stages. *Journal of Comparative Physiology. B, Biochemical, Systemic and Environmental Physiology*. 177(2): 205-215.
- 8 Booth T.F. 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Experimental & Applied Acarology*. 14(2): 137-149.
- 9 Bowman A.S. & Sauer J.R. 2004. Tick salivary glands: function, physiology and future. *Parasitology*. 129(Suppl 1): 67-81.
- 10 Braz G.R., Coelho H.S., Masuda H. & Oliveira P.L. 1999. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Current Biology:CB*. 9(13): 703-706.
- 11 Briegel H. 1990. Metabolic relationship between female body size, reserves and fecundity of *Aedes aegypti*. *Journal of Insect Physiology*. 36(Suppl 3): 165-172.
- 12 Campbell E.M., Burdin M., Hoppler S. & Bowman A.S. 2010. Role of an aquaporin in the sheep tick *Ixodes ricinus*: Assessment as a potential control target. *International Journal for Parasitology*. 40(1): 15-23.
- 13 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., da Silva Vaz Jr. I. & Logullo C. 2006. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. *Veterinary Parasitology*. 138(3-4): 49-357.
- 14 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. 1995. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Experimental & Applied Acarology*. 19(6): 325-336.
- 15 Cherry L.M. 1973. The accumulation and utilization of food reserves by adult female cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrine). *Australian Journal of Zoology*. 21: 403-412.
- 16 Chippendale G.M. 1978. Carbohydrates in reproduction and embryonic development. In: *Biochemistry of Insects*. New York:Academic Press, pp.42-45.
- 17 Cho W.L., Tsao S.M., Hays A.R., Walter R., Chen J.S., Snigirevskaya E.S. & Raikhel A.S. 1999. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. *The Journal of Biological Chemistry*. 274(19): 13311-13321.
- 18 Clara R.O., Soares T.S., Torquato R.J., Lima C.A., Watanabe R.O., Barros N.M., Carmona A.K., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I. & Tanaka A.S. 2011. *Boophilus microplus* cathepsin L-like (BmCL1) cysteine protease: Specificity study using a peptide phage display library. *Veterinary Parasitology*. 181(2-4): 291-300.
- 19 Corson M.S., Teel P.D. & Grant W.E. 2004. Microclimate influence in a physiological model of cattle-fever tick

- (*Boophilus spp.*) population dynamics. *Ecological Modelling*. 180(4): 487-514.
- 20 Da Silva Vaz Jr. I., Logullo C., Sorgine M., Velloso F.F., Rosa de Lima M.F., Gonzales J. C., Masuda H., Oliveira P.L. & Masuda A. 1998.** Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 66(3-4): 331-341.
- 21 De la Fuente J., Almazán C., Canales M., Pérez de la Lastra J.M., Kocan K.M. & Willadsen P. 2007.** 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*. 8(1): 23-8.
- 22 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., Leonart R., de Armas C.A., Rey S., Rodríguez J.L., Artilés M. & García L. 1998.** Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vaccine*. 16(4): 366-373.
- 23 Diehl P.A., Aeschlimann A. & Obenchain F.D. 1982.** Tick reproduction: oogenesis and ovoposition. In: Obenchain F.D. & Galun R. (Eds). *Physiology of ticks*. Oxford: Pergamon Press, pp.277-350.
- 24 Esteves 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. 2008.** Cellular and molecular characterization of an embryonic cell (BME26) from the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 38(5): 568-580.
- 25 Estrela A.B., Seixas A., Teixeira V.O., Pinto A.F. & Termignoni C. 2010.** Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 157(4): 326-335.
- 26 Estrela A.B., Seixas A. & Termignoni C. 2007.** A cysteine endopeptidase from tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae with vitellin digestion activity. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry and Molecular Biology*. 148(4): 410-416.
- 27 Fabres A., de Andrade C.P., Guizzo M.G., Sorgine M.H., Paiva-Silva G.O., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I. & Logullo C. 2010.** Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology*. 137(10): 1537-1546.
- 28 Fagotto F. 1990.** Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 14(4): 217-235.
- 29 Gonzalés J.C. 1974.** *O carrapato do boi: vida, resistência e controle*. São Paulo: Mestre Jou, 101p.
- 30 Graf J.F., Gogolewski R. Leach-Bing N. Sabatini G.A., Molento M.B., Bordin E.L. & Arantes G.J. 2004.** Tick control: an industry point of view. *Parasitology*. 129: 427-442.
- 31 Grisi L., Massard C.L., Moya-Borja G.E. & Pereira J.B. 2002.** Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária*. 21(125): 8-10.
- 32 Guerrero F.D., Nene V.M., George J.E., Barker S.C. & Willadsen P. 2006.** Sequencing a new target genome: the *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) genome project. *Journal of Medical Entomology*. 43(1): 9-16.
- 33 Holmes S.P., Li D., Ceraul S.M. & Azad A.F. 2008.** An Aquaporin-Like Protein from the Ovaries and Gut of American Dog Tick (Acari:Ixodidae). *Journal of Medical Entomology*. 45(1): 68-74.
- 34 Imamura S., Konnai S., Vaz I.da S., Yamada S., Nakajima C., Ito Y., Tajima T., Yasuda J., Simuunza M., Onuma M. & Ohashi K. 2008.** Effects of anti-tick cocktail vaccine against *Rhipicephalus appendiculatus*. *The Japanese Journal of Veterinary Research*. 56(2): 85-98.
- 35 Lara F.A., Lins U., Paiva-Silva G., Almeida I.C., Braga C.M., Miguens F.C., Oliveira P.L. & Dansa-Petretsky M. 2003.** 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*. 206: 1707-1715.
- 36 Leal A.T., Seixas A., Pohl C.P., Ferreira C.A., Logullo C., Oliveira P.L., Farias S.E., Termignoni C., da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2006.** Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 114(3-4): 341-345.
- 37 Lochhead P.A., Coghlan M., Rice Q.J.S. & Sutherland C. 2001.** Inhibition of GSK-3 selectively reduces glucose-6-phosphatase and phosphoenolpyruvate carboxykinase gene expression. *Diabetes*. 50: 937-946.
- 38 Logullo C., Moraes J., Dansa-Petretski M., da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Sorgine M.H., Braz G.R., Masuda H. & Oliveira P.L. 2002.** Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(12): 1805-1811.

- 39 Logullo C., da Silva Vaz Jr. I., 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. 1998. Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology*. 116(6): 525-532.
- 40 Logullo C., Witola W.H., Andrade C., Abreu L., Gomes J., da Silva Vaz Jr. I., Imamura S., Konnai S., Ohashi K. & Onuma M. 2009. Expression and activity of glycogen synthase kinase during vitellogenesis and embryogenesis of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 161(3-4): 261-269.
- 41 Mehlhorn H., Al-Rasheid K.A., Al-Quraishy S. & Abdel-Ghaffar F. 2011. Research and increase of expertise in arachno-entomology are urgently needed. *Parasitology Research*. 436(11): 2480-2487.
- 42 Moraes J. 2007. 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.
- 43 Moraes J., Arreola R., Cabrera N., Saramago L., Freitas D., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I., Tuena de Gomez-Puyou M., Perez-Montfort R., Gomez-Puyou A. & Logullo C. 2011. Structural and biochemical characterization of a recombinant triosephosphate isomerase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 41(6): 400-409.
- 44 Moraes J., Galina A., Alvarenga P.H., Rezende G.L., Masuda A., da Silva Vaz Jr. I. & Logullo C. 2007. Glucose metabolism during embryogenesis of the hard tick *Boophilus microplus*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*. 146(4): 528-533.
- 45 Murillo-Maldonado J.M., Sánchez-Chávez G., Salgado L.M., Salceda R. & Riesgo-Escovar J.R. 2011. Drosophila insulin pathway mutants affect visual physiology and brain function besides growth, lipid and carbohydrate metabolism. *Diabetes*. 60(5): 1632-1636.
- 46 Nascimento-Silva M.C., Leal A.T., Daffre S., Juliano L., da Silva Vaz Jr. I., Paiva-Silva G.O., Oliveira P.L. & Sorgine M.H. 2008. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 149(4): 599-597.
- 47 Needhan G.R. & Tell P.D. 1991. Off-host physiological ecology of ixodid ticks. *Annual Review of Entomology*. 36: 659-681.
- 48 Nelson D.L. & Cox M.M. 2008. Hormonal regulation of fuel metabolism. In: *Leninger - Principles of Biochemistry*. New York: W.H. Freeman and Company, pp.922-929.
- 49 Parizi L.F., Masuda A. & da Silva Vaz Jr. I. 2007. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 35(3): 285-294.
- 50 Parizi L.F., Utiumi K.U., Imamura S., Onuma M., Ohashi K., Masuda A. & da Silva Vaz Jr. I. 2011. Cross immunity with *Haemaphysalis longicornis* glutathione S-transferase reduces an experimental *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Experimental Parasitology*. 127(1): 113-118.
- 51 Peter R.J., Van den Bossche P., Penzhorn B.L. & Sharp B. 2005. Tick, fly, and mosquito control - Lessons from the past, solutions for the future. *Veterinary Parasitology*. 132(3-4): 205-215.
- 52 Pohl P.C., Sorgine M.H., Leal A.T., Logullo C., Oliveira P.L., da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, Biochemistry & Molecular Biology*. 151(4): 392-399.
- 53 Pruett J.H. 1999. Immunological control of arthropod ectoparasites - a review. *International Journal for Parasitology*. 29(1): 25-32.
- 54 Rao K.P. & Gopalakrishnareddy T. 1962. Nitrogen excretion in arachnids. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 7: 175-178.
- 55 Ryan R.O. & Van der Horst D.J. 2000. Lipid transport biochemistry and its role in enzyme production. *Annual Review of Entomology*. 45: 233-260.
- 56 Ryter S.W. & Tyrrel R.M. 2000. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro-and antioxidant properties. *Free Radical Biology and Medicine*. 28(2): 289-309.
- 57 Rosario-Cruz R., Almazan C., Miller R.J., Dominguez-Garcia D.I., Hernandez-Ortiz R. & de la Fuente J. 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library*. 14: 2657-

6265.

- 58 Santos T.R.B., Da Rosa Farias N.A., Cunha Filho N.A. & da Silva Vaz Jr. I. 2008. Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (B.) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(1): 25-30.
- 59 Santos R., Mariano A.C., Rosas-Oliveira R., Pascarelli B., Machado E.A., Meyer-Fernandes J.R. & Gondim K.C. 2008. Carbohydrate accumulation and utilization by oocytes of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 67(2): 55-62.
- 60 Santos R., Rosas-Oliveira R., Saraiva F.B., Majerowicz D. & Gondim K.C. 2011. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 77(1): 1-16.
- 61 Seixas A., Dos Santos P.C., Velloso F.F., da Silva Vaz Jr. I., Masuda A., Horn F. & Termignoni C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*. 126: 155-163.
- 62 Seixas A., Leal A.T., Nascimento-Silva M.C., Masuda A., Termignoni C. & da Silva Vaz Jr. I. 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 124(3-4): 322-340.
- 63 Seixas A., Oldiges D.P., da Silva Vaz Jr. I. & Termignoni C. 2010. Endocrinologia e controle da vitelogênese em carrapatos. *Acta Scientiae Veterinariae*. 38(2):95-111.
- 64 Song J.L., Wong J.L. & Wessel G.M. 2006. Oogenesis: Single cell development and differentiation. *Developmental Biology*. 300(1): 385-405.
- 65 Sorgine M.H., Logullo C., Zingali R.B., Paiva-Silva G.O., Juliano L. & Oliveira P.L. 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of hard tick *Boophilus microplus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 275(37): 28659-28665.
- 66 Suarez C.E. & Noh S. 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*. 180(1-2): 109-125.
- 67 Thompson M.B. & Stewart R.J. 1997. Embryonic metabolism and growth in lizards of the genus *Eumeces*. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Physiology*. 118(3): 647-654.
- 68 Willadsen P. 1997. Vaccines, genetics and chemicals in tick control: the Australian experience. *Tropical Animal Health and Production*. 29(Suppl 4): 91-94.
- 69 Willadsen P. 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology*. 129: 367-387.
- 70 Yoder J.A., Benoit J.B., Rellinger E.J. & Tank J.L. 2006. Developmental profiles in tick water balance with a focus on the Rocky Mountain spotted fever vector. *Rhipicephalus sanguineus*. *Medical and Veterinary Entomology*. 20(4): 365-372.
- 71 Ziegler R. & Van Antwerpen R. 2006. Lipid uptake by insects oocytes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 36(4): 264-272.