

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**A reprodução em carrapatos e a avaliação de uma enzima de
destaque neste processo como antígeno vacinal contra
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Adriana Seixas

Porto Alegre, abril de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

**A reprodução em carrapatos e a avaliação de uma enzima de
destaque neste processo como antígeno vacinal contra
*Rhipicephalus (Boophilus) microplus***

Adriana Seixas

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular (PPGBCM) da UFRGS como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor.

**Orientador: Prof. Dr. Carlos Termignoni
Prof. Reuben Kaufman**

Porto Alegre, abril de 2008.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Eloi de Souza Garcia
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Fundação Oswaldo Cruz.

Dr. Pedro Lagerblad de Oliveira
Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Dr.^a Célia Carlini
Departamento de Biofísica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Dr.^a Lisiane de Oliveira Porciúncula
Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
(Suplente)

Abril de 2008.

Aos meus pais e irmão,

Milton, Solange e Eduardo

ÍNDICE

AGRADECIMENTOS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	10
ABREVIATURAS	12
1. INTRODUÇÃO	13
1.1 Os carrapatos.....	13
1.2 Classificação taxonômica dos carrapatos.....	14
1.3 Anatomia interna dos carrapatos.....	22
1.3.1 O intestino.....	22
1.3.2 A glândulas salivares.....	23
1.3.3 Corpo Gorduroso.....	27
1.3.4 Ovário.....	27
1.3.5 Hemolinfa.....	30
1.4 A Vitelogênese.....	32
1.5 As vitelinas de carrapato.....	32
1.6 A Oôgenese.....	35
1.7 Controle hormonal da vitelogênese em artrópodes.....	37
1.8 Fatores que regulam a reprodução de carrapatos.....	41
1.9 Papel das prostaglandinas na reprodução de artrópodes.....	42
1.10 Efeitos da alimentação hematófaga nos carrapatos.....	43
1.11 A utilização do vitelo na embriogênese.....	44
1.12 Enzimas de <i>R. microplus</i> envolvidas na degradação de Vt.....	48
1.13 A utilização destas enzimas como antígenos no controle do carrapato.....	50
1.14 Os antígenos Bm86, Bm95 e Bm91.....	52
1.15 Uma avaliação dos dez anos do desenvolvimento da primeira vacina comercial contra carrapatos.....	54
1.16 Na busca por novos antígenos.....	55
2. OBJETIVOS	57

3. RESULTADOS	58
3.1 Efeito da 20-hidroxiecdisona e da hemolinfa na oogênese do carrapato Ixodide <i>Amblyomma hebraeum</i>	59
Artigo I - Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick <i>Amblyomma hebraeum</i>	60
3.2 Distribuição e estudos funcionais de uma cisteíno endopeptidase degradadora de vitelina em <i>Rhipicephalus Boophilus</i>	92
Artigo II - Distribution and functional studies of a <i>Rhipicephalus Boophilus microplus</i> Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase.....	93
3.3 Potencial vacinal de uma enzima de carrapato processadora de vitelina (VTDCE).....	135
Artigo III - Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE)	136
4. CONCLUSÃO	164
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	178
6. ANEXOS	193
6.1 Patente VTDCE.....	194
6.2 <i>Curriculum Vitae</i>	210
6.3 Trabalhos publicados.....	216

Agradecimentos

Agradeço a todos que de uma forma ou de outra estiveram ao meu lado e me ajudaram a chegar aonde cheguei. Esta é uma grande conquista e tem um significado muito especial, pois juntamente com a conclusão desta tese de doutorado completam-se 10 anos de trabalho no Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Trajetória esta, que teve início no segundo semestre do curso de Biologia, quando ingressei como aluna de iniciação científica no laboratório do professor Carlos Termignoni, orientador que me acompanha até hoje. Foram 4 anos de iniciação científica, 2 de mestrado e 4 de doutorado. Por tudo, tenho muito a agradecer, principalmente ao professor Termignoni companheiro de toda essa jornada, e aos muitos colegas e amigos que fizeram parte do meu dia-a-dia, alguns estando comigo até hoje. O importante é que todos participaram, tornando meu ambiente de trabalho amigável e produtivo, e assim fizeram com que esta década passasse despercebida, mas cheia de ótimas recordações. Como coadjuvantes na ciência, mas protagonistas na minha vida, agradeço a minha família e ao meu noivo, que incondicionalmente estiveram ao meu lado, me apoiando, admirando e dando força nas decisões. Principalmente, quando decidi que seria bom para minha carreira uma experiência no exterior. Agradeço a todos que tornaram esse sonho possível, ao César que abdicou de muita coisa para estar ao meu lado, ao Dr. Kaufman e sua equipe por me acolherem no laboratório na Universidade de Alberta, Canadá e, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de Doutorado. Assim, vou citar alguns nomes, certamente não todos, e sem ordem de importância, pois cada um tem seu significado único pra mim.

Obrigada!

Milton, Solange, Eduardo, César, Mak, Termignoni, Andréia, Jucks, Viviam, Zé, Daiane, Mari, Daniel, Ita, Aoi, Sandra, Alexandre Leal, Alexandre Macedo, Fabiana Horn, Simone Kobe, Irina, Juli, Ana, Antônio, Rê, Marcos, Walter, Lucélia, Paula, demais professores e colegas do Centro de Biotecnologia UFRGS, Sílvia, Luciano, Professores e colegas do Departamento de Biofísica UFRGS, Professores e colegas da UFRJ, Professores e colegas da University of Alberta: Dr. Kaufman, Kevin, Alex, Xyuiang.

RESUMO

Os carrapatos estão distribuídos por todo mundo e impactam tanto a saúde animal quanto humana. A espécie *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal parasita que afeta a bovinocultura nas regiões tropicais e subtropicais do globo, causando grandes prejuízos econômicos. Os métodos de controle estão baseados no uso de acaricidas químicos, o que resulta na seleção de populações resistentes e no risco de poluição do meio ambiente e dos alimentos. As vacinas têm-se mostrado um método de controle factível, e representam uma alternativa ao uso de acaricidas químicos. No entanto, dez anos após a disponibilização da primeira vacina comercial contra carrapatos, ainda não foi encontrada uma formulação capaz de alcançar a proteção necessária para dispensar o uso de agentes químicos.

Sendo assim, estudar a biologia do parasita e conhecer mecanismos de importância fisiológica pode ser uma boa estratégia para encontrar moléculas alvo que possam ser usadas como antígenos no desenvolvimento de uma vacina eficaz. Com este objetivo, nesta tese foi estudada a reprodução em carrapatos e avaliada a eficácia de uma enzima envolvida neste processo como antígeno vacinal. Foram abordados os processos de vitelogênese e de embriogênese. Em uma primeira etapa, usando carrapatos da espécie *Amblyomma hebraeum* como modelo, foi investigada a atuação do hormônio 20-hidroxiecdisona (20E) e de fatores adicionais, presentes na hemolinfa, na captação de vitelogenina (Vg) pelos oócitos. Neste trabalho, verificamos que existem diferentes estratégias de controle da captação de Vg pelo ovário nos carrapatos Ixodidae, e que para que ocorra captação de Vg pelos oócitos de *A. hebraeum* é necessário um fator adicional presente na hemolinfa das fêmeas.

Uma vez que o desenvolvimento do embrião depende da disponibilidade do material do vitelo estocado nos oócitos, a segunda parte da tese explorou uma cisteína endopeptidase envolvida na degradação de vitelina (Vt) em ovos do carrapato *R. microplus* denominada Vitellin Degrading Cysteine endopeptidase (VTDCE). As enzimas da classe das cisteína endopeptidases estão amplamente distribuídas nas fêmeas deste carrapato. Os estudos com VTDCE mostraram que esta é uma enzima de origem materna, com provável síntese extraovariana e transporte pela hemolinfa, até ser

internalizada pelos oócitos. A VTDCE está presente durante todo o desenvolvimento embrionário, assim como em larvas. Interessantemente, esta cisteína endopeptidase apresenta a propriedade de se associar a Vt por um outro sítio, além do sítio ativo.

A VTDCE é a enzima mais eficiente na degradação de vitelina (Vt) em ovos de *R. microplus*, e devido a sua importância fisiológica, a VTDCE foi testada como antígeno em experimento de vacinação de bovinos e desafio com larvas de *R. microplus*. Os parâmetros mais afetados nos carrapatos alimentados em bovinos vacinados, com relação aos controles, foram o peso das fêmeas ingurgitadas (19,3 %) e a fertilidade dos ovos (17,6 %). Relacionado os parâmetros analisados, vimos que este antígeno confere uma proteção de 21% aos animais imunizados quando infestados por *R. microplus*. A proteção parcial alcançada pela VTDCE pode ser complementar a de outros antígenos no desenvolvimento de um coquetel antigênico contra carrapatos, uma vez que nenhum antígeno encontrado até o momento foi capaz de oferecer a proteção necessária para ser empregado individualmente na composição de uma vacina.

Estudos como os realizados nesta tese contribuem para o melhor entendimento da biologia dos carrapatos, assim como para o desenvolvimento de novos e melhores métodos de controle desses parasitas.

ABSTRACT

Ticks are distributed worldwide impacting human and animal health. The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the main parasite that affects livestock in tropical and subtropical regions of world, causing large economical losses. Tick control methods are based on the application of chemical acaricides, which has resulted in selection of resistant ticks and a potential risk of environmental pollution and food contamination. Vaccines have been shown to be a feasible tick control method that offers a cost-effective, environmentally friendly alternative to chemical control. However, ten years after the commercialization of the first vaccine against ticks, to identify tick-protective antigens remains a limiting step in the development of an efficient formulation that would avoid the use of chemical acaricides.

In face of this situation, to study the parasite biology and understanding physiological important mechanisms could be a good strategy to find new targets to be used in an efficient vaccine. In order that, this thesis subject was to investigate the reproduction process in ticks and to evaluate the efficiency of an enzyme involved in this process as vaccinal antigen. The process of vitellogenesis and embryogenesis were studied. In the first part, using *Amblyomma hebraeum* ticks as model, the role of 20-hydroxiecdisone and additional hemolymph borne factors in vitellogenin (Vg) uptake by oocytes were investigated. Our findings showed that there are different strategies to control Vg uptake by ovary in Ixodide ticks. Additionally, for Vg uptake in *A. hebraeum* ovaries, a vitellogenin uptake factor (VUF) present in female hemolymph is required.

As embryo development depends on the availability of yolk material stored into the oocytes, in the second part we studied a cysteine endopeptidase involved in Vt digestion in *R. microplus* eggs, named vitellin-degrading cysteine endopeptidase (VTDCE). Cysteine endopeptidase enzymes are widely distributed in these tick females. Studies with VTDCE demonstrate that it is a maternal derived endopeptidase involved in a route including extraovarian synthesis, transport, and ovary uptake, before internalization by oocytes. VTDCE is present during all tick development, as well as in larva. Interestingly, this cysteine endopeptidase is able to associate with Vt in another site than the active site.

VTDCE showed to be the most efficient Vt hydrolytic enzyme in *R. microplus* eggs. So, supported by its physiological role, VTDCE was used as antigen in bovine vaccination and *R. microplus* challenge experiment. The most affected biological parameters in ticks fed on vaccinated animals were weight of engorged ticks (19.3 %), and egg fertility (17.6 %). Relating the biological parameters analyzed, bovine vaccination with VTDCE as antigen resulted in an overall protection of 21%. Therefore, this partial protection could be complementary in the formulation of an antigenic cocktail against tick, once there is not one single protein that achieves the protection level necessary for an efficient and practical vaccine development.

Studies like that contribute to the better understanding of tick biology, as well as to the development of new and more efficient methods of control.

ABREVIATURAS:

Abz – aminobenzoil

BYC – *Boophilus* Yolk Pro-Cathepsin

CW - critical weight

DvCP - lipoglicoheme-carrier protein

E-64 - *trans*-epoxisucinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano

EDDnp - etilenodinitrofenil-N-[2.4-dinitrofenil]-etilenodiamina

EF - fator de ingurgitamento

FSF - fator estimulador do corpo gorduroso

HeLp - heme lipoprotein

IgG – imunoglobulina G

JH - hormônio juvenil

kDa - quilodalton

MF - fator masculino

NaCl – cloreto de sódio

pc - peso crítico

PGs - prostaglandinas

PGE₂ - prostaglandinas E₂

RmLCE - *Ripicephalus microplus* larvae Cysteine-endopeptidase

SCF - fator capacitor de esperma

SDS - dodecil-sulfato de sódio

SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil – sulfato de sódio

THAP - Tick Heme Binding Aspartic Proteinase

VCB - Vitellogenic Cathepsin B

Vg - vitelogenina

VSF - fator estimulador de vitelogênese

VIF - fator indutor de vitelogênese

VUF - vitellogenic uptake factor

Vt - vitelina

VTDC - Vitellin-Degrading Cysteine endopeptidase

20E - 20-hidroxiecdisona

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os carrapatos

Carrapatos são ácaros hematófagos encontrados em todas as regiões terrestres do planeta (Sonenshine, 1991). Estes parasitas constituem importantes vetores de doenças humanas e animais. Por sua grande importância biomédica e econômica, os carrapatos são de grande interesse para estudos científicos. Impulsionadas pela descoberta da transmissão de doenças por carrapatos, como a “Texas cattle fever” e a “Rocky Mountain spotted fever”, numerosas investigações passaram a reportar detalhes da sistemática, morfologia e ecologia destes parasitas. Nas últimas décadas do século 20, em particular, foram muitos os relatos descrevendo os fundamentos da genética, ultraestrutura, fisiologia e bioquímica dos carrapatos.

Apesar do notável aumento nos estudos sobre carrapatos, poucos livros foram escritos sobre eles. Em 1962, Don R. Arthur escreveu um texto geral sobre o assunto, intitulado *Ticks and Disease*. Dez anos depois, Yuri S. Balashov escreveu uma excelente monografia, *Bloodsucking Ticks (Ixodidae) – Vectors of Diseases of Man and Animals* (1972) que permanece de grande valor para o conhecimento da morfologia e fisiologia dos carrapatos, mas oferece pouco sobre a ecologia e transmissão de doenças. Outros livros como o *Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure* (1983), *Physiology of Ticks* (1982) e *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks* (1986) fornecem coleções editadas de artigos em tópicos especializados, mas omitem informação em muitos outros aspectos como sistemática, biologia, ecologia e relação com doenças. Em 1991, Daniel Sonenshine publicou um livro de dois volumes abordando sistemática, biologia, morfologia, fisiologia, bioquímica, ecologia, papel como vetores e por fim o controle dos carrapatos. Este livro é um marco referenciado até hoje pelos estudiosos da área.

Guias para identificação de espécies também fazem parte da literatura de disponível sobre carrapatos. Alguns exemplos são: “*Ticks of Domestic animals in Africa*” (Walker et al., 2003), “*Ticks of Domestic Animals in Mediterranean Region*” (Estrada-Peña et al, 2004) e “*Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies*” (Barros-Battesti et al.,

2006). Esta falta de obras abrangentes sobre o carrapato não é indicativo da real situação do conhecimento sobre esses animais. Com efeito, a literatura disponível em forma de artigos científicos é bastante farta.

1.2 Classificação taxonômica dos carrapatos

Baseado em estudos recentes sobre taxonomia de carrapatos (Horak, Camicas & Keirans, 2002), podemos dizer que 80% da fauna de carrapatos do mundo pertencem à família Ixodidae (carrapatos duros; 683 espécies) e, com exceção de uma espécie da família Nuttalliellidae, o restante pertence à família Argasidae (carrapatos moles; 183 espécies). Os carrapatos Argasidae estão divididos em quatro gêneros: Argas (140 espécies), Carios (4 espécies), Ornithodoros (90 espécies) e Otibius (2 espécies).

Os carrapatos Ixodide são divididos em dois grandes grupos, Prostriata e Metastriata. Prostriata contém somente o gênero Ixodes, o qual tem 250 espécies, enquanto todos os outros carrapatos Ixodide são classificados como Metastriata. A diferença distintiva entre esses dois grupos é a posição da dobra anal, anterior ao ânus em Prostriatas, e posterior ao ânus em Metastriata.

Os mais importantes carrapatos Metastriatas se dividem nos gêneros Amblyomma (100 sp.), Dermacentor (31 sp), Haemaphysalis (150 sp), Hyalomma (21 sp), Rhipicephalus (63 sp) e Boophilus (5 sp). Em 2003, foi proposto que as 5 espécies do gênero Boophilus fossem agrupadas ao gênero Rhipicephalus, por apresentarem características filogenéticas muito relacionadas, sendo considerados gêneros monofiléticos (Murell & Barker, 2003; Horak, Camicas & Keirans, 2002). Estes autores sugerem que Boophilus seja mantido como subgenero de Rhipicephalus, Rhipicephalus (Boophilus). Entretanto, alguns pesquisadores continuam mantendo a distinção, já que os carrapatos do gênero Boophilus estão entre os mais conhecidos do mundo.

As espécies *R. microplus* e *A. hebraeum*, pertencentes à superfamília Ixodidae, foram alvo de estudo nesta tese. Os carrapatos da espécie *R. microplus* (fig. 1) são carrapatos de um só hospedeiro e levam cerca de 3 semanas para completar a fase parasitária, passando de larva não alimentada até fêmea adulta completamente ingurgitada, tendo como hospedeiro o gado bovino (exceto *B. kolsi*) (ciclo fig. 2). Esses

carrapatos possuem o aparato bucal curto e os danos ao hospedeiro são agravados por preferirem se alimentar em locais onde o couro é muito valorizado (Horn & Arteché, 1985).

R. microplus é uma espécie originária do sudeste da Ásia, que se disseminou para todas as regiões tropicais e sub-tropicais não desérticas do globo, sendo encontrado na Austrália, leste e sul da África, América Central e do Sul. Esta espécie tem uma grande importância econômica, pois além de causar significativa expoliação que resulta na diminuição da produção de carne e leite e depreciar o couro do hospedeiro, é vetor dos agentes causadores da tristeza parasitária bovina (*Babesia bovis*, *Babesia bigemia*, *Anaplasma marginale*; Montenegro, 1992).

O ciclo de vida do carrapato *R. microplus* é dividido em duas fases, a fase de vida-livre com duração de cerca de 28 dias, e a fase parasitária, variando entre 19 e 24 dias, com uma moda de 21 dias. A fase de vida-livre inicia-se no momento que a teleógena (fêmea fecundada e alimentada) cai ao solo e entra no período de pré-postura que tem, em média, duração de dois a três dias. Inicia-se, então, a ovoposição que dura aproximadamente 17 dias. Uma fêmea de *R. microplus* produz de 2 mil a 3 mil ovos. A eclosão dos ovos e a liberação de larvas viáveis, que conseguem alcançar um hospedeiro suscetível, ocorre entre cinco e dez dias. A fase de vida-livre é influenciada pelas condições climáticas, que alteram o período de duração dos vários estágios, que são especialmente afetados pela umidade e temperatura, podendo prolongar-se por meses (Rocha, 1997).

Na fase parasitária, as larvas infestantes instalam-se no hospedeiro, passando a larvas parasitárias e transformando-se em metalarvas, sendo necessários de três a oito dias para esse período. Várias transformações ocorrem até que o parasita chegue ao estágio adulto, com os seguintes períodos de duração: ninfa (5 a 10 dias), metaninfa (de 9 a 20 dias). Até o estágio de metaninfa, o parasita alimenta-se de linfa. A metaninfa sofre diferenciação sexual, transformando-se em neandro após 18 a 28 dias do início do ciclo, e passando a gonandro (macho) em mais dois dias. A transformação de metaninfa em neógena (fêmea) é feita em torno de 14 a 23 dias após o início do ciclo. O macho fecunda a neógena, que inicia o hematofagismo, passando à partenógena em três dias e, finalmente, à teleógena em mais dois dias. A fase de vida-parasitária não é tão sensível às influências climáticas

como a fase de vida-livre. O início da queda das teleóginas ocorre no 19º dia da infestação, sendo em média entre o 22º e 23º dias. A fase parasitária dura em média 18 a 26 dias (Rocha,1997). Os carrapatos aumentam várias vezes seu tamanho, desde o estágio de larva que mede aproximadamente 1 mm, até o estágio adulto, quando uma fêmea ingurgitada (teleógina) pode medir até 1,2 cm. Em adultos, a diferenciação sexual é bastante evidente, pois o macho é menor que a fêmea, medindo cerca de 2 mm. O ciclo de *R. microplus* está representado na figura 2.

No gênero *Amblyomma* existem 129 espécies. Diferentemente do gênero *Rhipicephalus*, este é caracterizado por possuir aparato bucal longo, e usualmente um escudo ornamentado (exemplar do gênero, *A. hebraeum*, Fig. 3). São espécies de três hospedeiros, cada estágio larva, ninfa e adulto, requer um hospedeiro distinto (ciclo fig. 4). Quando criados em colônia podem ser mantidos apenas em um hospedeiro, no caso coelho, por várias gerações. Esta espécie está distribuída em zonas tropicais e subtropicais onde parasita uma ampla variedade de hospedeiros mamíferos, além de répteis e anfíbios (Jongejan and Uilberg, 2004). *A. hebraeum* habita a parte sudeste do continente africano, e também é um parasita importante na criação bovina. Este carrapato é vetor da teileriose dos bovinos (agentes *Theileria annulata*, *Theileria parva*) e da doença conhecida como febre da picada do carrapato (agente *Rickettsia rickettsii*) em humanos, além de servirem de porta de entrada para infecções bacterianas severas (Jongejan and Uilberg, 2004). Os carrapatos da espécie *A. hebraeum* são de 5 a 10 vezes maiores que o *R. microplus* e as fêmeas colocam cerca de 20000 ovos. O ciclo de vida de carrapatos desta espécie está descrito e representado na figura 4.

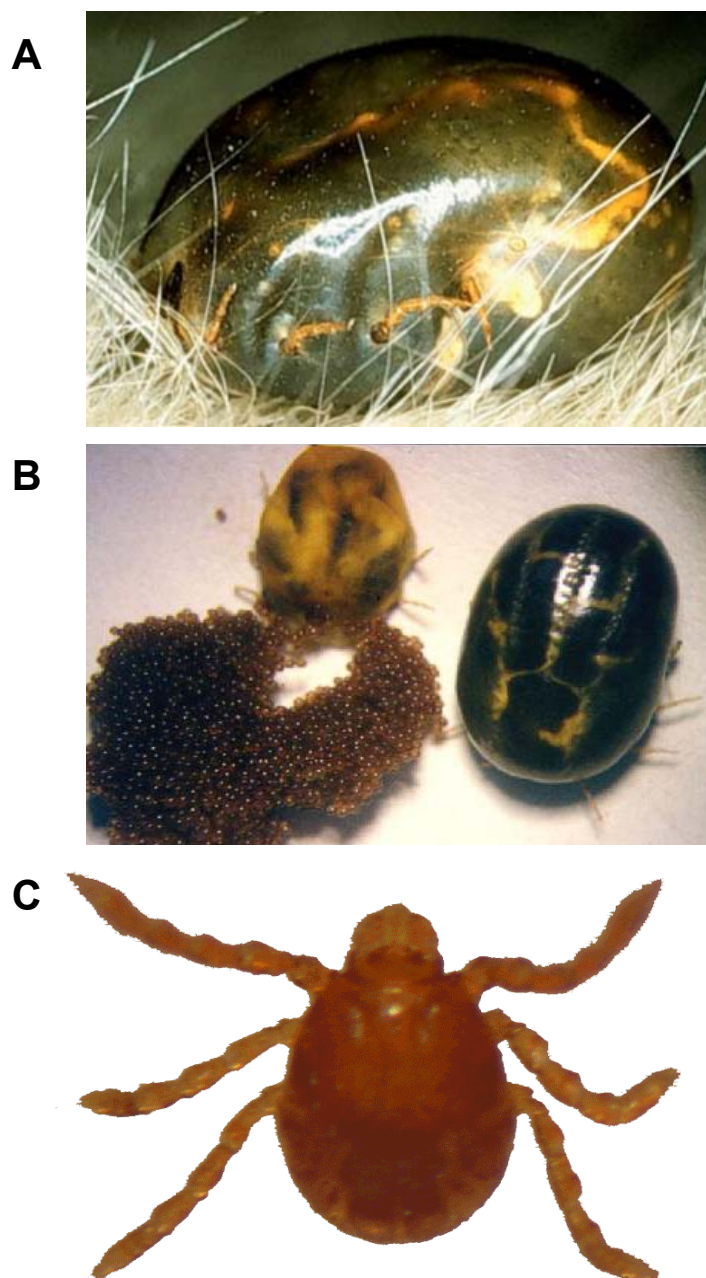


Fig. 1 – O carrapato bovino *R. microplus*. A) Vista lateral de uma fêmea teleógina. B) A fêmea antes e após realização da postura. C) O estágio larval desta espécie que possui apenas 3 pares de patas. As fotos apresentadas não estão em escala de tamanho, são apenas representativas. Fotos de : A) www.biosci.ohio-state.edu; B) Glória Braz; C) própria.

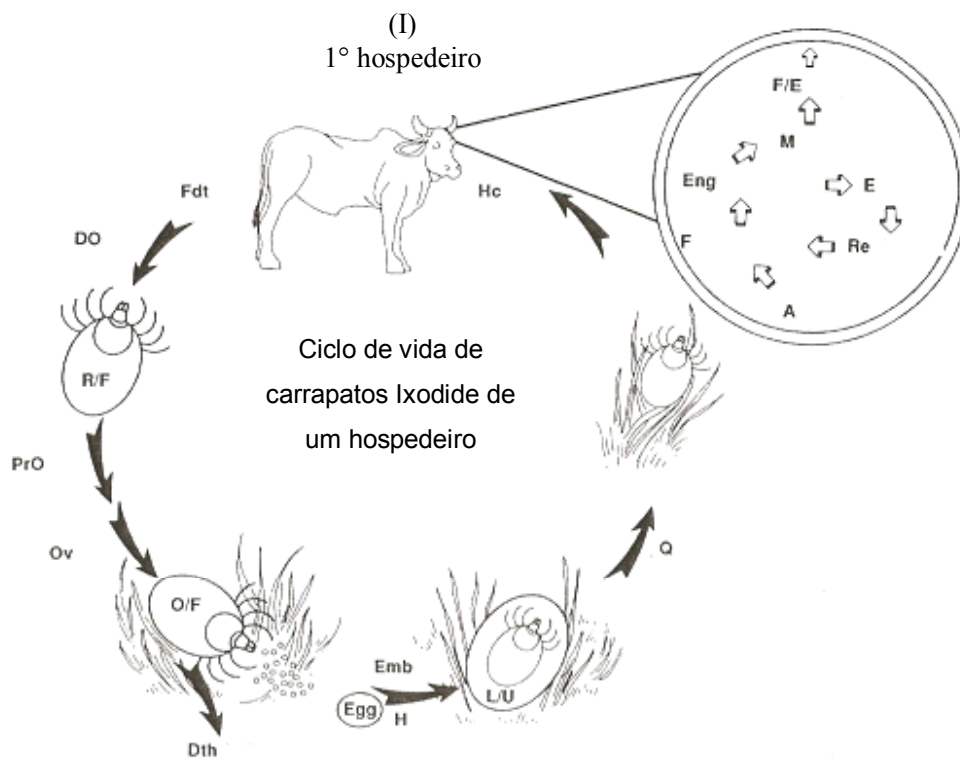


Fig. 2 – Diagrama mostrando o ciclo de vida de carrapatos Ixodidae de um único hospedeiro, como *R. microplus*. Este tipo de ciclo é encontrado em poucas espécies do gênero Ixodidae, cerca de 12 espécies incluindo o carrapato bovino *R. microplus*. Neste ciclo só ocorre uma fase de vida livre (ovo e larva, Emb - embriogênese, H- eclosão) e uma fase de vida parasitária (I). A larva não alimentada (L/U) fica na vegetação a procura de um hospedeiro (Q), ao realizar contato (Hc) ocorre a fixação (A) e o início da alimentação (F). As fêmeas ingerem sangue do hospedeiro até o ingurgitamento (E), durante esse período ocorre o acasalamento *in situ*. O macho mantém-se no hospedeiro se despreendendo e fixando-se novamente para se alimentar e fecundar outras fêmeas. A fêmea, quando repleta de sangue (R/F), se desprende do hospedeiro (Fdt) e cai ao solo (DO) entrando no período de pré-oviposição (PrO), o qual dura cerca de 3 dias. A postura (O/F) dura vários dias até a morte da fêmea (Dth). Adaptado de Sonenshine, 1991.



Fig. 3- Carrapatos *A. hebraeum* macho (A, B) e fêmea (C, D) antes e após a realização da muda para a fase adulta. As fotos mostram o dimorfismo sexual. Fotos de Alex Smith, UofA.

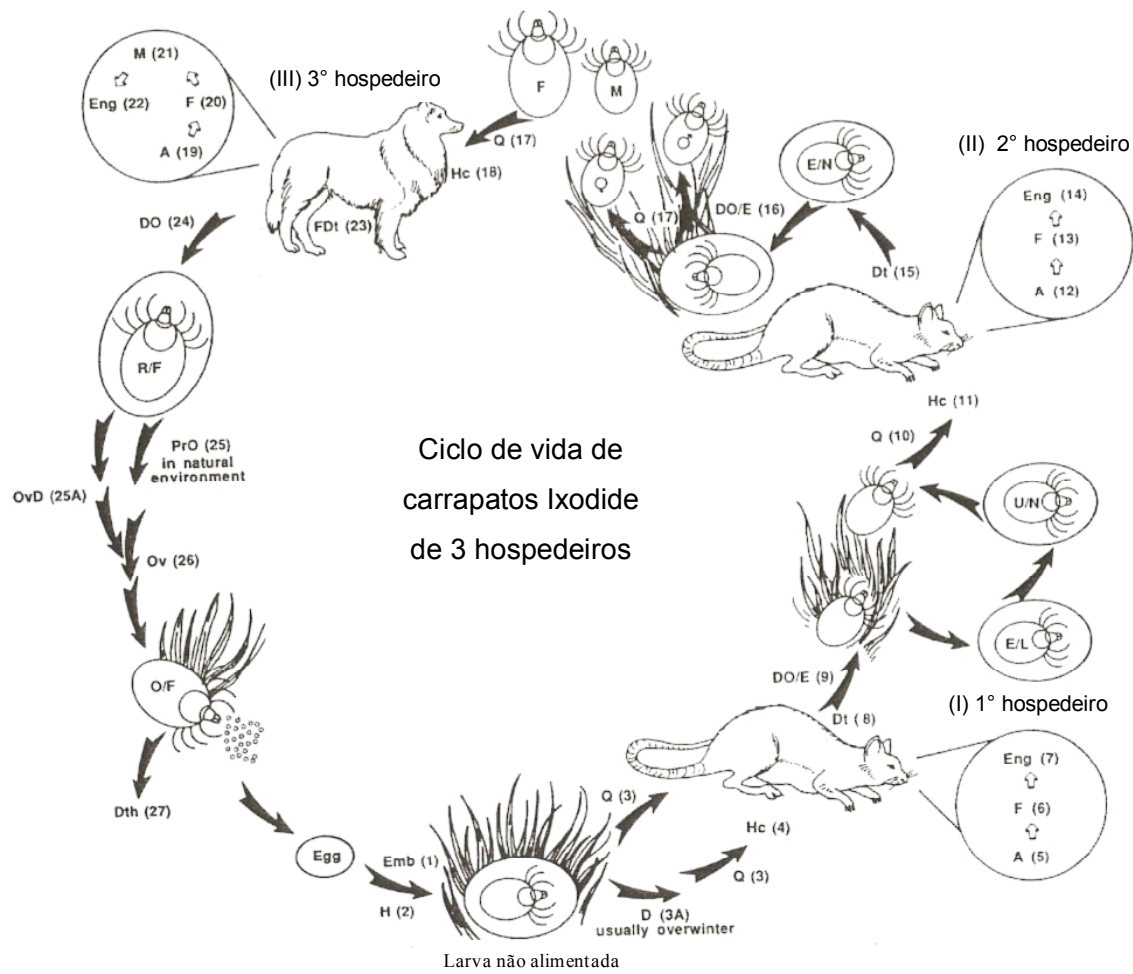


Fig. 4 – Diagrama mostrando o ciclo de vida de um carrapato de 3 hospedeiros como o *A. hebraeum*. Os diferentes eventos do ciclo estão indicados com palavras chaves e um número em parenteses como segue: Ovos (Egg, 1) são postos no meio ambiente. A eclosão (H, 2) ocorre ao fim da embriogênese (Emb) gerando a larva não alimentada que inicia a busca pelo hospedeiro [Questing behavior (Q)]. Alternativamente, a larva pode entrar em diapausa (D, 3A) até ser despertada por condições ambientais favoráveis. O começo da fase parasitária (I) ocorre no contato com o hospedeiro (Hc), a fixação (A, 5) e o início da alimentação (F,6). O ingurgitamento se completa após vários dias de acordo com a espécie quando a larva ingurgitada (E/L) se desprende do hospedeiro (Dt, 8) e cai ao solo para realização da muda (DO/E, 9), quando passa a ninfa não alimentada (U/N). As ninfas (10) procuram o segundo hospedeiro (II) fixam-se, alimentam-se, ingurgitam e se desprendem novamente (11-15). As ninfas ingurgitadas se desprendem (16) e mudam para adultos não alimentados (macho, M e fêmea, F). Esses adultos M e F sobem na vegetação na busca por outro hospedeiro (17). O ciclo é repetido quando os carrapatos encontram o terceiro hospedeiro (III) (19, 20), mas nesta etapa o desenvolvimento completo é dependente do acasalamento (M, 21) o qual ocorre no hospedeiro para todos os carrapatos Ixodide. As fêmeas após o acasalamento se alimentam até ficarem repletas de sangue (22), se desprendem (FDt, 23) e abandonam o hospedeiro (DO/24). Os machos normalmente permanecem para se refixar, alimentar e copular com outras fêmeas. As fêmeas ingurgitadas (R/F) procuram locais propícios no ambiente e após um pequeno período preoviposicional (PrO) iniciam a postura dos ovos (Ov, 26). Alternativamente, em algumas espécies, estas fêmeas podem entrar em diapausa oviposicional (OvD, 25A) e permanecerem inativas por muitos meses, por exemplo durante o inverno, antes de iniciar a postura. A fêmea coloca muitos ovos (O/F) e morre (Dth, 27). Adaptado de Sonenshine, 1991.

1.3 Anatomia interna dos carrapatos

A cavidade corporal dos carrapatos é uma hemocele aberta, banhada com o fluido corporal denominado hemolinfa, assim como pelos tecidos conectivos e membranas que suportam os órgãos internos (Sonenshine, 1991). De acordo com Balashov (1972), sua origem embrionária se dá a partir da fusão da cavidade celômica embrionária com a esquisocele. Nesta cavidade existe uma musculatura extensiva que compreende músculos dorso-ventrais e outros especializados, que além de outras funções, movem os apêndices, as cheliceras e controlam a faringe. O sistema de traqueas, que se distribui por toda a cavidade corporal de ninfas e adultos, é composto por finos túbulos que envolvem e acessam os tecidos.

Este sistema é responsável por levar oxigênio aos tecidos. Externamente, o sistema de traqueas é acessado por um par de poros respiratórios, localizados em placas espiraculares na lateral do corpo. Curiosamente, este sistema está ausente na fase larval. Todos os órgãos internos ocorrem nesta cavidade ocupando o espaço entre os músculos e as traqueas. O sistema nervoso central, singânglio, também se ramifica em nervos periféricos que se distribuem pela cavidade corporal. Outras ramificações observadas circundando os órgãos são os túbulos de Malpighi, sendo estes responsáveis pela excreção no carrapato.

1.3.1 O intestino

O sistema alimentar dos carrapatos é dividido em intestino anterior (“foregut”), médio (“midgut”) e posterior (“hindgut”) (Sonenshine, 1991). O intestino médio (fig. 5; MD) é de origem endodérmica e, em carrapatos alimentados, ocupa a maior parte da cavidade corporal cobrindo os órgãos internos dorsalmente (Balashov, 1972). Histologicamente, a parede do intestino consiste de um epitélio e de uma fina camada de células musculares alongadas. São descritos dois tipos básicos de células epiteliares: as não diferenciadas e as digestivas. Células secretórias também têm sido descritas em algumas espécies. Acredita-se que as células digestivas se desenvolvam a partir das células não diferenciadas durante a alimentação, quando elas aumentam de tamanho pela

ingestão da dieta sanguínea por pinocitose, ou vários tipos de endocitose, com a formação de fagossomos e endossomos. Com exceção da digestão intraluminal dos eritrócitos, toda a digestão da alimentação hematófaga ocorre intracelularmente. A natureza deste processo digestivo, principalmente a digestão intracelular da hemoglobina, é importante para entendermos como uma grande variedade de microorganismos pode sobreviver no intestino dos carrapatos e se disseminar pelos demais tecidos.

A excreção dos carrapatos se dá pelo acúmulo de cristais de guanina e outros dejetos, oriundos tanto do intestino como dos túbulos de Malpighi, no saco retal. Em carrapatos alimentados, esta estrutura é grande e possui coloração branca devido a excreta de nitrogênio na forma de guanina.

1.3.2 A glândulas salivares

As glândulas salivares são as maiores glândulas do corpo do carrapato. São formadas de grandes agrupamentos de ácinos, em forma de cacho de uva, situados na região lateral do corpo do carrapato (fig. 5; SGA). Um ducto salivar central se estende posteriormente por todo o comprimento da glândula e continua anteriormente no capitulum, onde ambos se fundem para formar um salivário comum. Ácinos do tipo I, denominados ácinos agranulares, localizam-se ao longo do ducto principal nas regiões anteriores e média da glândula (fig. 6, 8.1). Estes ácinos possuem células centrais grandes e altamente vacuoladas. Os ácinos agranulares são responsáveis pela secreção higroscópica que permite aos carrapatos captarem umidade do ambiente. Já os ácinos granulares ocorrem ligados às ramificações de ductos secundários, podendo ter origem diretamente no ducto principal (fig. 6, 8.3), possuem grânulos eletrondensos (Fig. 6, 8.4). Em carrapatos Argasidae existe um tipo deste ácino e em ixodidae três tipos; distinguidos por diferenças no tipo celular.

As glândulas salivares liberam grande parte do seu material granular nos primeiros dias de alimentação, no entanto ocorre nova síntese de proteínas e lipídeos. Em estudos feitos em *A. americanum*, a proteína total da glândula salivar de fêmeas alimentadas aumenta em torno de 15 vezes em relação ao conteúdo protéico de glândulas de carrapatos não alimentados (Brown e Askenase, 1986). Em adição as proteínas do

cemento, enzimas estão presentes nas células secretórias. Em *R. microplus* células denominadas células C contém acetilcolinesterase, carboxil esterase tipo B, proteases, leucino aminopeptidases, fosfatases ácidas e alcalinas (Sonenshine, 1991). O quanto estas enzimas, ou outras, são secretadas e contribuem para a formação do sítio de alimentação ou para a captação de fluidos não é conhecido. Os produtos secretórios das glândulas são anti-hemostáticos, anti-inflamatórios e imunossupressivos, que agem bloqueando as defesas do hospedeiro contra a fixação e alimentação do parasita.

As glândulas aumentam de tamanho durante a alimentação, principalmente as envolvidas na eliminação de fluídos. Subsequentemente, elas degenaram após ingurgitamento e acasalamento. A glândula salivar é o principal órgão responsável pela eliminação do excesso de água e sais durante a concentração do grande volume de sangue ingerido (Sonenshine, 1991). O controle da secreção salivar é afetado por transmissores neurosecretórios, como a dopamina, e um sistema intracelular de segundo mensageiros e moduladores. A dopamina, estimuladora da secreção salivar, é considerada a catecolamina mais comum nos tecidos de artrópodes (Kaufman, 1979).

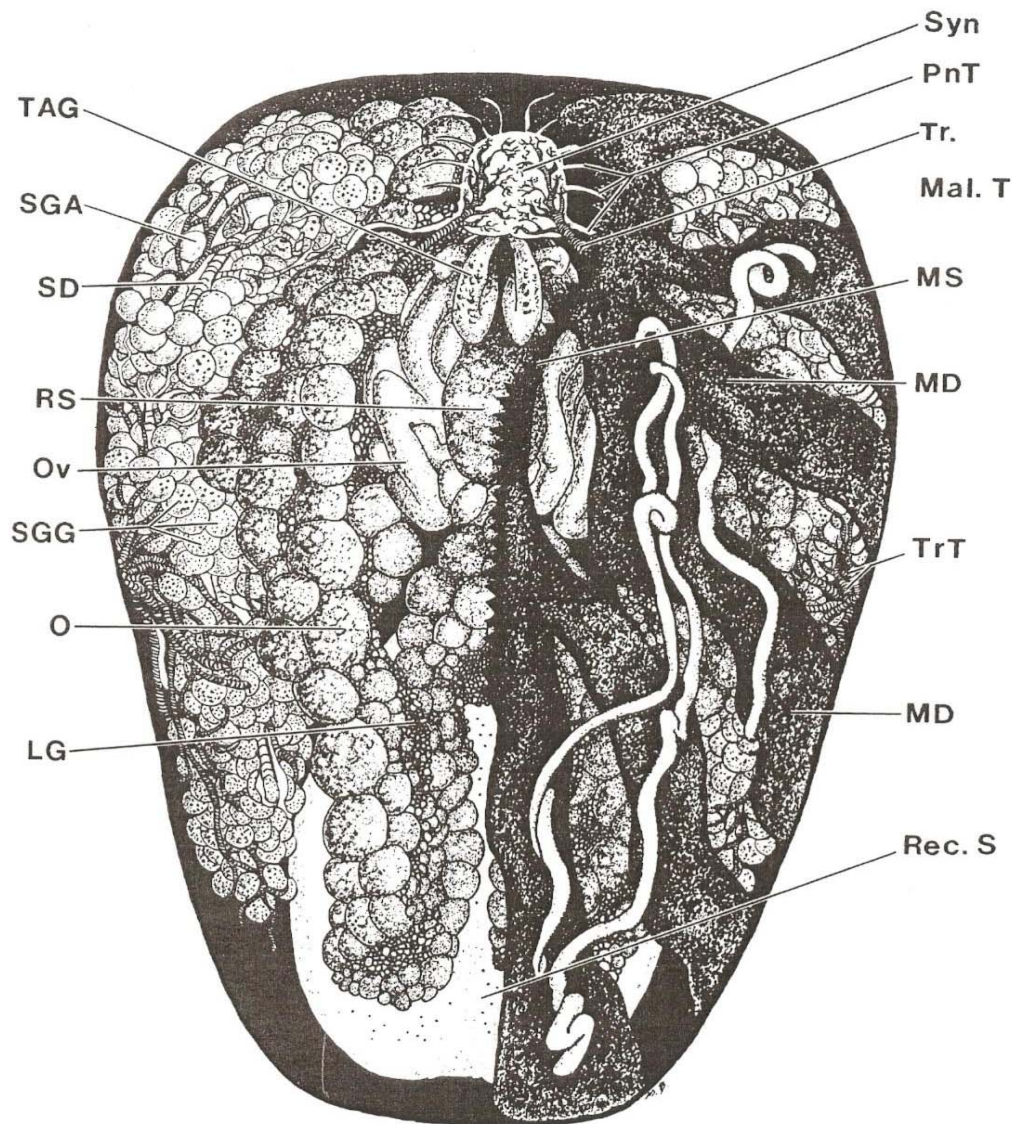


Fig. 5 – Anatomia interna representativa de uma fêmea Ixodidae. O lado esquerdo da figura mostra os órgãos internos após a remoção do intestino; o lado direito mostra a disposição do intestino que cobre a maioria dos demais órgãos. LG – fenda longitudinal (do ovário); MD – intestino médio; MS – estômago; Mal. T – túbulos de malphigui; O – ovário; Ov – oviduto; PnT – inervações; Rec. S – saco retal; SGA – glândula salivar (ácino tipo I); SGG – glândula salivar (ácino tipo II e III); zona SD – duto salivar; Syn – singânglio; TAG – glândula acessória tubular; Tr – traquea; TrT – dutos da traquea. Desenhado por Ms. M. Bloomfield, Norfolk, Virginia. Retirado de Sonenshine, 1991.

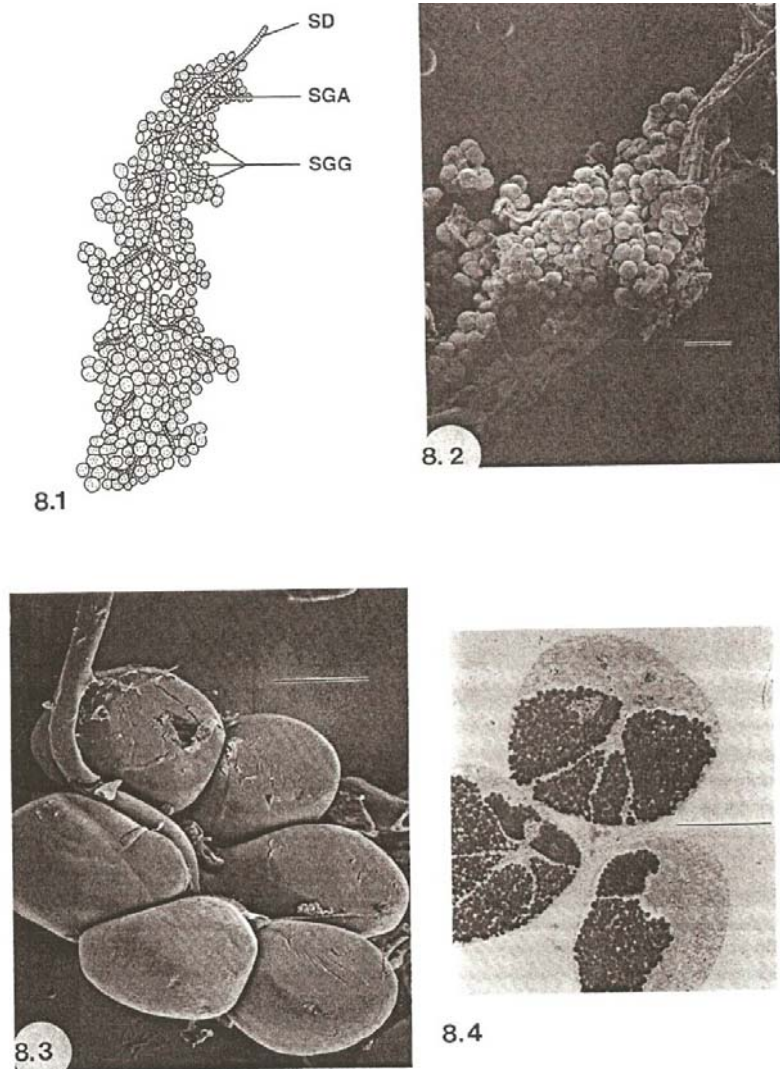


Fig. 6 – A glândula salivar de um carrapato iodide. Representação e fotos da estrutura geral da glândula salivar de uma fêmea no período de alimentação. 8.1 – Diagrama da glândula salivar. SD – duto salivar principal; SGA – ácino agranular tipo I; SGG - ácino granular tipo II e III. 8.2 – Microscopia eletrônica da glândula salivar em pequeno aumento mostrando vários ácinos, barra: 500 μm . 8.3 - Microscopia eletrônica da glândula salivar em grande aumento mostrando um grupo representativo de ácinos granulares, barra: 65 μm . 8.4 – Detalhe das células granulares mostrando os grânulos eletrondensos, barra: 50 μm .

1.3.3 Corpo Gorduroso

O corpo gorduroso em artrópodes é o órgão que estoca reservas alimentares, metaboliza hormônios e outras moléculas mensageiras, além de detoxificar compostos tóxicos ao organismo. Por seu valor funcional, o corpo gorduroso tem sido comparado ao fígado de mamíferos (Wigglesworth, 1967). Também constitui importante depósito de lipídeos, análogo ao tecido adiposo de mamíferos.

Diferentemente dos insetos, onde o corpo gorduroso é um órgão discreto concentrado na região abdominal, em carrapatos este é um órgão difuso composto de cordas e membranas de células aderidas às traqueas, em grupamentos logo abaixo da epiderme (corpo gorduroso periférico), ou ao redor do sistema reprodutivo e outros órgãos internos (corpo gorduroso central). Esta divisão também está relacionada com as funções do tecido, o corpo gorduroso periférico aparentemente é um tecido de reserva pois contém muito glicogênio, enquanto o corpo gorduroso central apresenta características de um tecido de síntese (Keeley, 1971).

As células primárias deste tecido são denominadas trofócitos. Outros grupos de células denominadas nefrócitos encontram-se presos aos cordões do tecido (Coons et al. 1990). De 3 - 4 dias após o acasalamento até a fase de postura, a ultraestrutura dos trofócitos é típica de células que fazem síntese proteica (Coons et al, 1990). Sabe-se que em carrapatos, o corpo gorduroso é o sítio primário de síntese de Vg (Chinzei e Yano, 1985). No entanto, o intestino serve como fonte secundária em fêmeas não virgens alimentadas (Coons et al., 1986; 1989). Outro papel do corpo gorduroso parece ser a síntese de ecdisteróides (Schriefer et. al., 1987). Em carrapatos foi observado que o transplante de singânglio de fêmeas vitelogênicas induz a síntese de Vg em fêmeas parcialmente alimentadas (Chinzei, 1986). Duas horas após a sua síntese, tempo em que ocorre lipidização, glicosilação e adição de grupamento heme, a Vg é detectada na hemolinfa e por fim no ovário (Chinzei, 1986).

1.3.4 Ovário

O sistema reprodutivo feminino é similar em carrapatos Ixodide e Argaside. É constituído pelo ovário em forma de U, ovidutos pareados, útero, vagina e o receptáculo seminal (ausente em Argaside) (fig. 7, A). Os órgãos de Gené estão separados dos órgãos do sistema reprodutivo e são responsáveis pela produção da cera que cobre os ovos. Duas glândulas bem pequenas estão pareadas junto ao poro foveal e secretam o hormônio sexual, que inicia o comportamento de acasalamento em vários carrapatos Ixodide.

O ovário de *R. microplus* foi recentemente caracterizado do ponto de vista fisiológico, histológico e ultraestrutural. O ovário desta espécie foi classificado como pertencente ao tipo painoístico (Saito et al., 2005). Neste tipo de ovário as células “nurse”, que são células acessórias responsáveis pelo fornecimento de nutrientes ao oócito, estão ausentes e os oócitos estão presos a parede do ovário pelas células do pedicelo. Balashov (1983) sugeriu que as células do pedicelo desenvolvem o papel das células “nurse”, presente no ovário do tipo meroístico. As células nurse atuam na captação do material que será incorporado pelos oócitos. Os oócitos durante o desenvolvimento são classificados em estágios (I a VI), no estágio V os oócitos estão completamente desenvolvidos, o corion está formado e grandes grânulos de vitelo estão presentes. Os oócitos no estágio VI degeneram e são reabsorvidos. Esta classificação já havia sido feita por Balashov em 1972 (veja o ítem 1.5, oogênese). Os oócitos de carrapato não se desenvolvem sincronicamente, e podem ser encontrados em diferentes estágios do desenvolvimento ao mesmo tempo no ovário (fig. 7, B). Como resultado, a vitelogênese e oviposição em carrapatos Ixodide são processos prolongados que duram semanas.

As células da parede do ovário e do pedicelo apresentam morfologia variada de oval a redondas, com uma camada fina de citoplasma. Na região de contato entre as células do pedicelo e a parede do óvário, a lâmina basal está ausente e ocorrem especializações da membrana na forma de interdigitação, aumentando a superfície de contato entre esses dois tipos de células. No início da vitelogênese em *R. microplus* ocorre produção de lipídeos e proteínas, seguida por captação de material exógeno da hemolinfa.

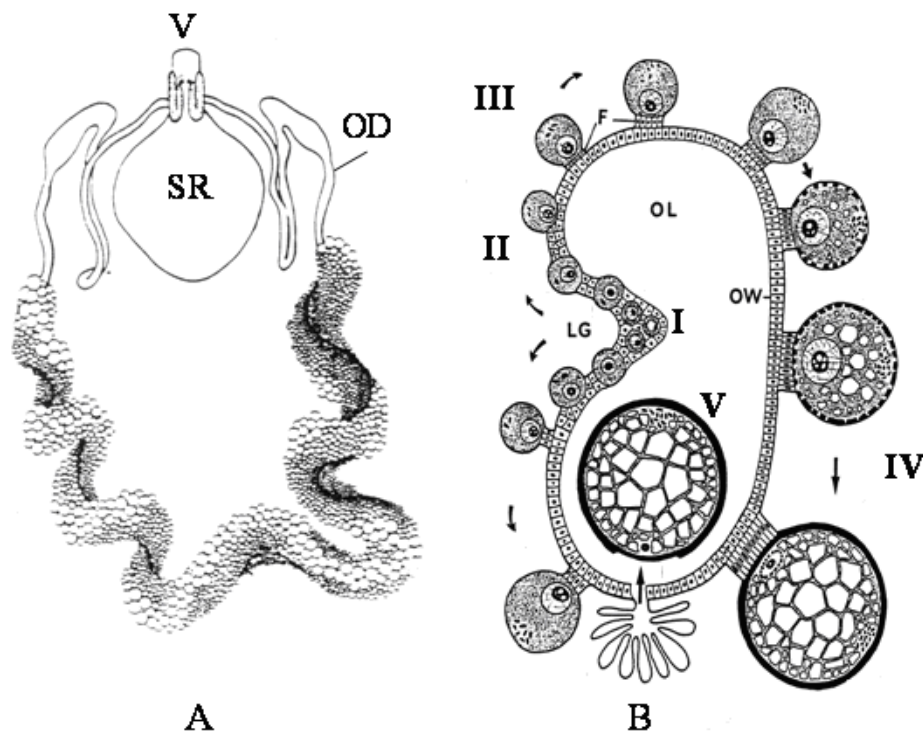


Fig. 7 - A) Órgãos reprodutivos de uma fêmea Ixodide Metastriata. B) Representação esquemática dos estágios da oogênese. (F) células do pedicelo, (LG) fenda longitudinal, (OD) oviduto, (OW) parede do ovário, (OL) lumem do ovário, (SR) receptáculo seminal, (V) vagina. As flechas indicam o desenvolvimento dos oócitos de acordo com os cinco estágios de Balashov (I-V). Figuras modificadas por Friesen a partir de Diehl et al. (1982).

1.3.5 Hemolinfa

Como outros artrópodes, os carrapatos possuem sistema circulatório aberto. Todos os órgãos e tecidos são banhados pela hemolinfa. A hemolinfa de carrapatos é composta por hemócitos, as células circulantes, e o plasma. O volume de hemolinfa varia de acordo com o estágio fisiológico do carrapato. Em fêmeas de *D. andersoni*, o volume de hemolinfa varia de 2-3 µl em fêmeas não alimentadas, até 150 µl em fêmeas ingurgitadas. Apesar deste grande aumento de volume durante a alimentação, se medida em percentagem do peso corporal ela permanece relativamente constante (23 %), mostrando um eficiente controle da eliminação de sal e água (Kaufman e Philips, 1973). Este valor é similar ao encontrado em insetos. Em larvas de *Heliothis*, a hemolinfa representa 33 % do peso corporal; em *Locusta migratoria* o volume médio de hemolinfa é 18 % do peso corporal (Jones, 1977).

As proteínas constituem (em peso) o principal componente solúvel do plasma. Em *D. variabilis* representam de 11,5 a 14,3 % do peso de hemolinfa bruta (Sonenshine, 1991). As proteínas desempenham papel na regulação da pressão osmótica dos carrapatos diferentemente de que ocorre em insetos onde aminoácidos são mais abundantes e fazem esta regulação. Em fêmeas alimentadas de *D. variabilis* a concentração de proteínas estimada é de 119 mg/ml (Sonenshine et al., 1989). Mais de 30 bandas protéicas foram identificadas por eletroforese (Sonenshine, 1991). Além das hemolipoglicoproteínas conhecidas como vitelogeninas, outras proteínas estão presentes e aumentam de concentração com o ingurgitamento. Em fêmeas de *H. dromedari*, as vitelogeninas representam 11% da proteína total, e a captação desta proteína pelos oócitos faz com que a concentração desta na hemolinfa se mantenha constante.

A hemolinfa também contém uma variedade de enzimas, hormônios, fatores humorais que atuam na defesa do parasita, e moléculas de origem externa (Sonenshine, 1991). No entanto, comparando com insetos e outros artrópodes, as proteínas da hemolinfa de carrapato têm sido pouco estudadas quanto à sua síntese, composição, distribuição e propriedades (Gudderra et. al., 2002). Algumas proteínas encontradas na hemolinfa também são encontradas na glândula salivar e na saliva de *R. appendiculatus* (Wang e Nuttall, 1994). Imunoglobulinas G provenientes do hospedeiro, primeiramente

encontradas no intestino do carrapato, também estão presentes na hemolinfa (Ben Yakir, 1989; da Silva Vaz Jr, 1996).

As α 2-macroglobulinas são inibidores contra diferentes classes de proteases. Um exemplo é nova proteína membro desta família denominada TAM, que foi identificada na hemolinfa de *O. moubata* (Kopacec et al., 2000). Esta proteína apresenta massa molecular de 500 kDa em gel filtração e duas bandas de 75 e 92 kDa em SDS-PAGE redutor. Lectinas também já foram identificadas na hemolinfa de *O. moubata* (Kovar et al., 2000) e *Ixodes ricinus* (Grubhoffer et al., 1991). Em artrópodes, as lectinas são produzidas e secretadas na hemolinfa pelos hemócitos e células do corpo gorduroso. Supõe-se que, em invertebrados, essas proteínas tenham papel na transmissão de patógenos e em respostas de defesa à patógenos (Gudderra et al., 2002).

Proteínas carreadoras de alta massa molecular são encontradas na hemolinfa de diversas espécies. Em *D. variabilis*, foi purificada e caracterizada uma “lipoglicoheme-carrier protein”, DvCP, com massa de 200 kDa (Gudderra et al., 2001). Essa proteína é a predominante na hemolinfa deste carrapato e parece ter papel como proteína de reserva. Em 2002, este mesmo autor descreveu em *O. parkeri* uma proteína similar denominada OpCP, de 668 kDa. Esta é uma lipoproteína, e diferentemente da DvCP, não contém heme. A principal proteína da hemolinfa de *R. microplus* é a HeLp, uma heme lipoproteína (Maya-Monteiro, 2000). HeLp tem a massa molecular nativa de 354 kDa e duas subunidades de (103 e 92 kDa). Essa proteína está presente na hemolinfa de machos e fêmeas e apesar de ser incorporada pelo ovário, não está presente nos ovos. Aparentemente HeLP tem papel no transporte e reciclagem de heme.

Proteínas ligadoras de imunoglobulinas são encontradas na hemolinfa de *R. appendiculatus* e parecem desempenhar papel na proteção do carrapato, transportando IgGs do intestino para a hemolinfa e por fim de volta ao hospedeiro através da saliva (Wang e Nuttall, 1999). Outras moléculas de defesa dos carrapatos que estão presentes na hemolinfa são as defensinas. Estas moléculas foram descritas em *O. moubata* e *D. variabilis* (Johns, et al., 2001). Mais recentemente, três moléculas foram isoladas da hemolinfa de *R. microplus* e caracterizadas, são a microplusina, defensina e ixodidina (Fogaça et al., 2004; Fogaça et al., 2006).

1.4 A vitelogênese

O termo vitelogênese é normalmente usado para descrever tanto a síntese de vitelogenina (Vg), como a captação desta proteína pelos oócitos. A Vg é a precursora da vitelina (Vt), a mais importante proteína de reserva dos ovos de artrópodes. Em carrapatos, como na maioria dos artrópodes, a síntese de Vg ocorre em maior parte fora do ovário. As células foliculares, que são responsáveis pela síntese ovariana de Vg, circundam os oócitos (Nijhout, 1994). Outros sítios de síntese de Vg são o corpo gorduroso em carrapatos Argasídeos (Chinzei and Yano, 1985), e também o intestino em carrapatos Ixodídeos (Rosell and Coons, 1990). Após sintetizada, a Vg é liberada na hemolinfa e acumulada em grânulos de vitelo. Uma vez incorporada nos grânulos, esta proteína é referida como Vt (Diehl et al., 1982).

1.5 As vitelinas de carrapato

Em carrapatos, vitelogenina ou vitelina foram parcialmente caracterizadas em *B. microplus*, *A. hebraeum*, *D. andersoni*, *O.s moubata*, *R. appendiculatus*, *A. hermanni*, *H. dromedarii*, *D. variabilis* e *I. scapularis* dentre outros (Tatchell, 1971; Friesen e Kaufman, 2002; Boctor e Kamel, 1976; Chinzei *et al.*, 1983; Canal *et al.*, 1995; Shanbaky *et al.*, 1990; Rosell e Coons, 1991b; James *et al.*, 1997). Em carrapato e na maioria dos insetos, a Vt representa de 80 a 90 % da proteína total presente nos grânulos de vitelo (Rosell e Coons, 1991b). Na maioria dos insetos, a Vt é estruturalmente, bioquimicamente e imunologicamente muito similar à Vg (Giorgi *et al.*, 1999). No entanto, as Vts podem ser diferentes das Vgs em composição e na quantidade total de lipídeos associados. Por exemplo, a composição de lipídeos da vitelina isolada de ovos de *Philosamia cynthia* é diferente daquela encontrada na vitelogenina isolada de hemolinfa desta mesma espécie. Também são observadas diferenças entre os fosfolipídeos associados com cada proteína (Chino *et al.*, 1977).

As Vts são lipoglicofosfoproteínas de origem materna que possuem alta massa molecular, sendo formadas de 6 a 9 subunidades variando de 35 a 160 kDa cada (Rosell e Coons, 1991a). Entre os açúcares que se encontram associados a esta proteína, os mais

comumente encontrados são manose e glicosamina. Fosfolipídeos, colesterol e outros lipídeos neutros também tem sido encontrados associados à Vt. Quanto ao conteúdo de aminoácidos das vitelinas, foi encontrada uma grande similaridade entre as Vts de *D. andersoni*, *D. variabilis* e *O. moubata*, todas elas possuem um alto conteúdo de ácido glutâmico e valina e baixo conteúdo de metionina. Outra similaridade entre as Vts de carrapatos de diferentes espécies é a presença de heme. Todas as Vts de carrapato até hoje examinadas contêm ferro na forma de derivados de heme provenientes do processamento da hemoglobina do hospedeiro durante a digestão. A presença de heme na Vt é responsável pela cor marrom escura característica dos ovos de carrapato (Rosell e Coons, 1991a).

Os lipídeos neutros e os fosfolipídeos das lipovitelinas de *D. andersoni*, *D. variabilis* são muito similares aos encontrados na Vt de *O. moubata*. Os carboidratos presentes nas vitelinas de *D. andersoni* são ácido siálico e glicosaminas (Boctor e Kamel, 1976), enquanto que somente manose foi encontrada em vitelinas de *D. variabilis* (Rosell e Coons, 1991b). Em *O. moubata*, estão presentes manose e N-acetilglicosamina (Chinzei *et al.*, 1983). As vitelinas de insetos são tipicamente lipoproteínas de alta densidade que podem ser separadas por ultracentrifugação (Giorgi *et al.*, 1999). As Vts e Vgs de insetos apresentam um perfil heterogêneo indicado por múltiplas bandas quando analisadas por eletroforese em condições não redutoras (Masuda e Oliveira, 1985). As vitelinas de *R. microplus* e *A. hebraeum* apresentam este mesmo comportamento (Canal *et al.*, 1995; Logullo *et al.*, 2002; Friesen e Kaumam, 2002).

No carrapato *R. microplus*, a vitelina atua como reservatório de heme (Logullo *et al.*, 2002). Isto porque este carrapato, diferentemente dos demais organismos multicelulares já estudados, é incapaz de sintetizar o anel de protoporfirina e obtém as quantidades de heme necessárias para sintetizar suas hemeproteínas através da digestão hematófaga (Braz *et al.*, 1999). Logo após a oviposição, a Vt do ovo de *R. microplus* é uma hemeproteína contendo 1 mol de heme por mol de proteína. Durante o desenvolvimento embrionário, um terço da vitelina presente nos ovos é degradada e o heme liberado liga-se às moléculas de Vt remanescentes. Cada molécula de Vt de *R. microplus* é capaz de ligar 30 moléculas de heme. Esta capacidade da Vt de *R. microplus* de ligar heme é um mecanismo antioxidante importante, que protege as células do

embrião de danos oxidativos, além de permitir que este animal hematófago estoque o heme obtido da dieta dentro dos ovos. Este é o único caso conhecido até agora na natureza de armazenamento de heme por um longo período (Logullo *et al.*, 2002).

Durante o período de embriogênese, o conteúdo de Vt nos ovos de *R. microplus* diminui. Nos primeiros dias após a postura ocorre uma queda de 20% no conteúdo de Vt nos ovos, permanecendo relativamente constante durante os 10 dias seguintes. Após 15 dias ocorre um segundo pico de degradação de Vt, e no momento da eclosão 40% do conteúdo total de Vt presente nos ovos já foi consumido (Logullo *et al.*, 2002). Diferentemente, em *Drosophila* spp., os peptídeos de vitelo são digeridos durante a embriogênese e não são mais encontrados no primeiro estágio larval (Bownes e Hames, 1977). Em *Bombyx mori*, a maior parte da Vt é utilizada no estágio final do desenvolvimento embrionário, mas uma pequena quantidade é mantida até a larva de primeiro estágio (Yamashita e Irie, 1980). No carrapato *O. moubata*, ao final da embriogênese a Vt ainda não está completamente degradada e permanece até o estágio de ninfa. Caso estes carrapatos fiquem sem alimentação, a Vt é consumida a uma taxa de 0,46 µg / dia até esgotar-se, aos 125 dias após a muda. Assim, além de reserva de nutrientes para desenvolvimento do embrião, a Vt atua como reserva para o período pós-embrionário e para a manutenção das larvas em situações de falta de alimento, causadas por demora em encontrar o hospedeiro (Chinzei e Yano, 1985).

A Vt de *A. hebraeum* foi parcialmente purificada a partir de ovários de fêmeas ingurgitadas de 10 dias e caracterizada por Friesen e Kaufman (2002). Esta Vt compreende 7 polipeptídeos majoritários e vários outros menores. Por sua vez, a Vg, precursora da Vt foi descrita como dois polipeptídeos de 211 e 148 kDa presentes na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas. Os fatores que caracterizaram estes polipeptídeos como Vg foram: 1) Polipeptídeos correspondentes, de massa molecular similar, estão presentes no ovário, 2) os títulos destes polipeptídeos na hemolinfa aumentam até o momento da oviposição, 3) os mesmos estão ausentes em machos e em fêmeas não vitelogênicas (ingurgitadas dia 0 e parcialmente ingurgitadas dia 10).

Foram desenvolvidos anticorpos contra cada polipeptídeo da Vg de *A. hebraeum* (fig. 8). Estes anticorpos reconhecem diferentes polipeptídeos na Vt parcialmente purificada, sugerindo que cada polipeptídeo de Vg dê origem a diferentes polipeptídeos

da Vt. Com os dois anticorpos juntos, 6 dos 7 polipeptídeos principais da Vt são reconhecidos. Usando estes anticorpos foi desenvolvido um ELISA indireto competitivo específico para detecção de Vg e Vt (Friesen e Kaufman, 2002; 2004).

Durante a vitelogênese de *Musca domestica*, certas proteases são transferidas por endocitose para os oócitos. Elas parecem ser enzimas sintetizadas fora do ovário como pró-proteases, entre essas pró-catepsinas inativas, que são depois processadas proteoliticamente (Ribolla e Bianchi, 1995). Estas proteases mostram-se associadas às esferas de vitelo (Fagotto, 1990a) e muito provavelmente, sejam as responsáveis pela disponibilização deste material de reserva para posterior utilização pelo embrião (Nordin *et al.*, 1990).

1.6 A Oôgenese

A oogênese de carrapatos está dividida em 5 estágios distintos segundo Balashov (1972). Oócitos primários, estágio I de Balashov, estão no período de pré-vitelogênese inicial (baixo crescimento do citoplasma). Este estágio ocorre em ninfas alimentadas. Neste período, o volume dos oócitos aumenta pouco. Após o início da alimentação hematófaga da fêmea adulta, os oócitos entram no estágio II, pré-vitelogênese tardia, fase de grande aumento do citoplasma e do núcleo, resultando na exposição dos oócitos na hemolinfa. No final deste estágio, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi estão bastante desenvolvidos e o oócito contém várias mitocôndrias. A membrana celular neste estágio possui microvilosidades.

O período de captação do vitelo compreende as fases III e IV da oogênese e, no final deste período, o oócito está pronto para ovulação. Durante a ovulação, estágio V de Balashov, o oócito passa pelo lumem do ovário e é movido por movimentos peristálticos para o oviduto e por fim para a vagina (fig. 7). As contrações peristálticas da vagina resultam na postura dos ovos. Os ovos passam do poro genital para o aparato bucal e então, entram em contato com o órgão de Gené que pode ser estendido através da abertura camerostomal, que é uma articulação flexível entre o corpo e as peças bucais. Neste momento, o órgão de Gené secreta a cera que reveste os ovos.

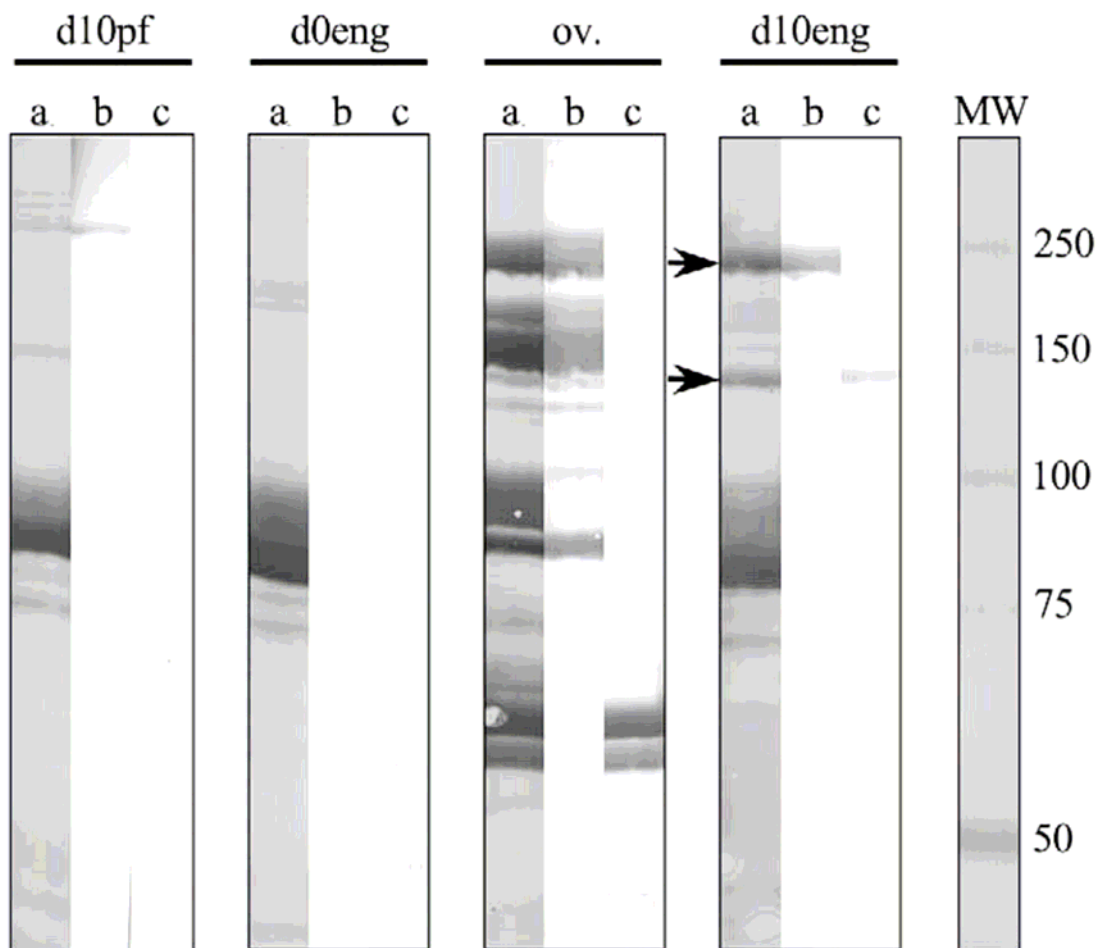


Fig.8 – Western blot mostrando a especificidade dos anti-Vgs para ovários de 10 dias (ov.), hemolinfa de fêmeas ingurgitadas após 0 e 10 dias (d0eng and d10eng), e hemolinfa de fêmeas parcialmente ingurgitadas 10 dias após a remoção do hospedeiro (d10pf). As linhas mostram os resultados com: a) comassie blue, b) anti-Vg211; c) antiVg-148. As flechas indicam os dois polipeptídeos (Vg211 and 148) que estão presentes em ovários de 10 dias e na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas. Figura retirada de Friesen e Kaufman, 2002.

A classificação segundo Balashov (1972) é muito referenciada até hoje para caracterizar o desenvolvimento de oócitos individuais. Entretanto, uma classificação mais abrangente, que se refira as características do ovário num todo, se faz necessária uma vez que, em ovários de carrapato, o desenvolvimento não é uniforme. Assim que a captação de Vg tem início, oócitos de diferentes estágios de desenvolvimento são processados simultaneamente e assincrônicamente, fazendo com que oócitos em todos os estágios de desenvolvimento sejam encontrados ao mesmo tempo no ovário. Por este motivo, no primeiro capítulo da tese nós desenvolvemos um novo sistema para classificar o desenvolvimento dos ovários, que está claramente baseado no sistema de Balashov, e denomina-se “Fase de Crescimento Ovariano” (ou “Ovarian Grow Phase – OGP”). Este sistema vai de OGP 1 à OGP 5, e leva em consideração tanto o grau de desenvolvimento dos oócitos, como o tamanho e características do ovário.

1.7 Controle hormonal da vitelogênese em artrópodes

Os sistemas hormonais de insetos e crustáceos são provavelmente os mais bem entendidos dentre os artrópodes (veja as revisões de Gilbert, Iatrou & Gill, 2004; Wainwright & Rees, 2001). Em outras classes de artrópodes, as informações sobre identificação e significância funcional dos hormônios são fragmentadas ou não existentes (Rees, 2004), situação que permanece até hoje.

Em insetos, a síntese de Vg é controlada por hormônios juvenis (JHs) e ecdiesteróides (Nijhout, 1994). JHs são terpenóides derivados de ácido farnesóico. Cinco formas estruturalmente relacionadas foram identificadas em insetos: JH-0, JH-I, JH-II, JH-III e 4-methyl JH-I (fig. 9). Os ecdiesteróides, por sua vez, são derivados de esteróis, 20-hidroxiecdisona (20E) e seu pro-hormônio, ecdisona, são as formas mais comuns em insetos e outros artrópodes, no entanto mais de 60 ecdiesteróides já foram identificados em artrópodes (Nijhout, 1994) (fig. 9). Em dípteras, 20E estimula síntese e liberação de Vg na hemolinfa (Nijhout, 1994). Na maioria dos outros insetos, o JH, liberado da corpora allata, é o responsável por este estímulo.

Outro papel importante do JH em insetos é estimular o processo de patência. Neste processo, o JH atua nas células foliculares que circundam os oócitos em desenvolvimento, estimulando enzimas do tipo Na/K-ATPase. Pela ação destas enzimas é gerada uma perda de fluido e conseqüente redução do tamanho destas células (Davey and Gordon, 1996; Kim et al., 1999). A redução de tamanho das células foliculares ocasiona a formação de espaços entre elas e possibilita que a Vg tenha acesso aos oócitos.

A exposição do ovário de mosquitos fêmeas que recém sofreram muda ao JH é necessária para o desenvolvimento de ovos normais. O JH faz com que os oócitos se tornem competentes para iniciar a captação do vitelo, estimulando os seguintes processos: 1- patência do epitélio folicular, 2- indução de um estado quiescente nos folículos primários, em preparação para a vitelogênese, 3- diferenciação da maquinaria celular relacionada a síntese protéica e endocitose (Klowden, 1997). Mas muito menos é conhecido sobre o controle da vitelogênese em outros artrópodes.

No entanto, comprovar a presença do hormônio JH em carrapatos tem sido um desafio. O produto de uma extração feita com hexano, do corpo inteiro do carrapato *R. microplus*, é capaz de inibir a muda do besouro *Tenebrio molitor* e a oviposição do carrapato *O. moubata*, sugerindo a presença de um composto similar ao JH (Connat, 1987). No entanto, a presença de JH ou moléculas relacionadas não foi detectada, mesmo por técnicas sensíveis como cromatografia gasosa e espectrometria de massas (Connat et al., 1987; Neese et al., 2000).

Por sua vez, administração exógena de ecdisteróide (o hormônio da muda) e a correlação das mudanças com títulos deste hormônio, de acordo com a ocorrência de eventos fisiológicos, trazem evidências de que a função dos ecdisteróides em carrapatos seja muito similar a já descrita para insetos e crustáceos. O papel fisiológico dos ecdisteróides em carrapatos tem sido revisado por alguns autores (Diehl, Connat & Dotson, 1986; Sonenshine, 1991; Lomas & Rees, 1998; Rees, 2004).

Existem evidências consistentes de que os hormônios ecdisteróides, principalmente a ecdisona, regulem a muda em carrapatos (Rees, 2004). Em todas as espécies de carrapato investigadas, em fases onde os títulos de ecdisteróides se encontravam altos, o principal hormônio encontrado foi 20-hidroxiecdisona (20E) acompanhado pela ecdisona (Dees, Sonenshine & Breidling, 1984a, Sonenshine, 1991).

Em carrapatos, assim como em insetos, a capacidade de transformar ecdisona em 20E é amplamente distribuída nos tecidos, incluindo o intestino (Diehl et al. 1986) e corpo gorduroso (Zhu, Oliver & Dotson, 1991).

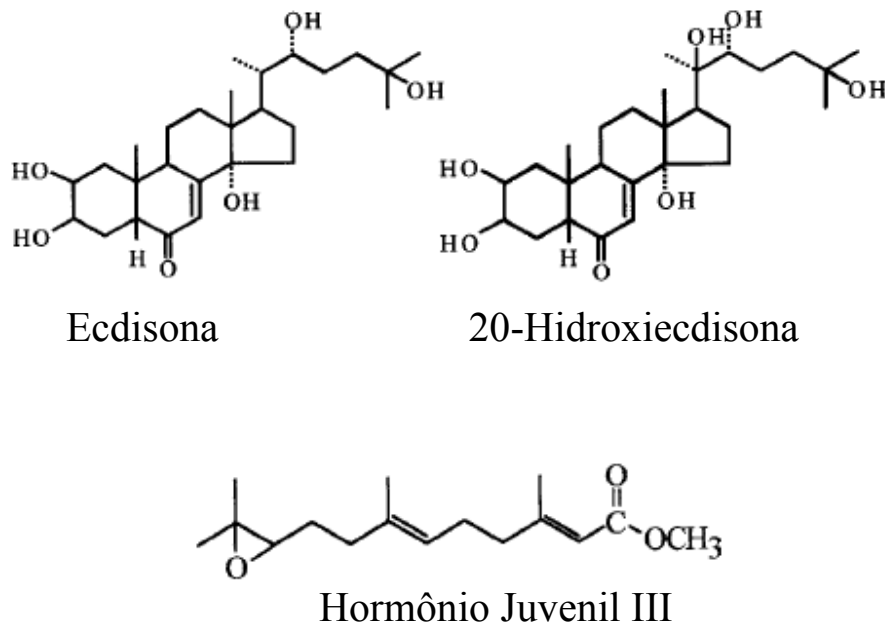


Fig. 9 - Estrutura química dos hormônios ecdiesteróides e do hormônio juvenil, hormônios que desempenham papel importante na fisiologia de insetos e carrapatos.

Injeções de 20-hidroxiecdisona (20E) em fêmeas parcialmente ingurgitadas estimulam o aumento do corpo gorduroso, um indicador indireto de estímulo da síntese de Vg (Lunke and Kaufman, 1993). Curiosamente, este aumento na síntese de Vg em *A. hebraeum* não resulta em um aumento na captação de Vg pelo ovário (Lunke & Kaufman, 1993; confirmado por Friesen e Kaufman, 2002, 2004). Esta incapacidade de captar Vg não é explicada pela falta de um receptor para a captação desta proteína (Friesen e Kaufman 2004). Assim, o processo pelo qual a captação de Vg nos ovários de carrapato é desencadeada ainda não é conhecido. A hipótese atualmente mais considerada é de que a captação de Vg em *A. hebraeum* necessite de um “fator de captação de Vg” em adição ao 20E (Friesen e Kaufman, 2004). Existem indícios de que este fator esteja presente na hemolinfa de fêmeas alimentadas, visto que ovários de fêmeas parcialmente alimentadas, quando transplantados para a hemocele de fêmeas ingurgitadas, acumularam uma grande quantidade de Vt, fato que demonstra que os ovários de fêmeas parcialmente alimentadas são competentes e capazes de se desenvolver quando colocados nas condições hormonais de uma fêmea vitelogênica (Lunke & Kaufman, 1993).

Thompson et al. (2005) desenvolveram uma técnica para injetar 20E em fêmeas virgens de *D. variabilis*, enquanto elas ainda estão fixadas no hospedeiro. Esta técnica tem a clara vantagem de que a alimentação do carrapato não é interrompida durante o tratamento com hormônio. Nestas condições, apesar dos carrapatos não terem ingurgitado completamente, em 4 dias as fêmeas apresentaram desenvolvimento do ovário com captação de Vt pelo oócitos. Neste estudo também foi mostrado que os níveis do mRNA de Vg estão aumentados durante o tratamento com 20E. Este trabalho mostra que nesta espécie somente o 20E é sinal suficiente para disparar tanto a síntese de vitelogenina como a captação desta proteína pelo ovário.

No primeiro capítulo desta tese foram testados os efeitos do 20E sobre a captação de Vg em fêmeas virgens de *A. hebraeum* usando tanto a técnica de Friesen e Kaufman (2004; fora do hospedeiro) como a de Thompson et al. (2005; no hospedeiro), para determinar o quanto a não demonstração de captação de Vg pelo ovário de *A. hebraeum* foi decorrente de diferenças entre as técnicas utilizadas ou diferenças entre o controle hormonal nas duas espécies de carrapato. Também foram testados os possíveis efeitos de

fatores presentes na hemolinfa na captação de Vg por fêmeas parcialmente alimentadas removidas do hospedeiro.

1.8 Fatores que regulam a reprodução de carrapatos

Em carrapatos, existem no mínimo quatro proteínas masculinas reprodutivas conhecidas como fatores de acasalamento (Kaufman, 2004):

(1) *Fator capacitador de esperma (SCF; Shepher, Oliver & Hall, 1982):*

presente em carrapatos Argasíde e Ixodíde, é responsável pela maturação do esperma. Este fator foi estudado em *D. variabilis* e *O. moubata* e em ambas as espécies se mostrou resistente à temperatura, mas susceptível à inativação por tripsina. A análise por gel filtração revelou uma massa molecular de 12,5 kDa para o fator de ambas as espécies, no entanto a molécula de uma espécie não apresenta atividade biológica sobre o pro-esperma da outra.

(2) *Fator estimulador de vitelogênese (VSF; Sahli et al., 1985):*

Estudado em *O. moubata*, é sintetizado e mantido no pro-esperma. Este é liberado no trato genital da fêmea durante a capacitação.

(3) *Fator masculino (MF; Harris and Kaufman, 1984, Lomas and Kaufman 1992a,b):*

Este fator é produzido no testículo e é capaz de influenciar degeneração das glândulas salivares e no desenvolvimento dos ovos na fêmea.

(4) *Fator de ingurgitamento (EF; Pappas and Oliver, 1972):*

Também produzido nos testículos, estimula a fêmea a se alimentar até o ingurgitamento completo. Existem boas razões para se acreditar que o MF e o EF sejam a mesma proteína, recentemente chamada de “voraxina” (Weiss & Kaufman, 2004).

Nas fêmeas de carrapato também foram descritos fatores que atuam na reprodução:

(1) *Fator indutor de vitelogênese (VIF; Chinzei and Taylor, 1990):*

Parece ser o iniciador do processo de vitelogênese, é um neuropeptídeo produzido pelo singânglio da fêmea, que parece iniciar a síntese de Vg agindo em tecidos ainda desconhecidos e induzindo a produção do FSF. Foi descrito no carrapato Argasídeo *O. moubata*.

(2) *Fator estimulador do corpo gorduroso (FSF; Chinzei & Taylor, 1994):*

Atua no corpo gorduroso induzindo a síntese de Vg. É conhecido como o hormônio vitelogênico (*Ogihara, 2003*). Presente em *O. moubata* e em vários carrapatos Ixodídeos (*James et al, 1997; Friesen & Kaufman, 2002, 2004*), provavelmente, é um hormônio ecdiesteróide.

1.9 Papel das prostaglandinas na reprodução de artrópodes

Prostaglandinas (PGs) e outros eicosanóides são metabólitos oxigenados do ácido araquidônico. Estes compostos são bem conhecidos por suas importantes ações na fisiologia e em disfunções de mamíferos. No entanto, trabalhos mais recentes revelam a presença e as funções biológicas dos eicosanóides em insetos e outros invertebrados (*Stanley, 2006*).

Em insetos, os eicosanóides são mediadores da imunidade celular, inclusive alguns microorganismos infecciosos secretam fatores capazes de inibir a biossíntese de eicosanóides. Os eicosanóides também agem na reprodução e hemostase de insetos, na fisiologia do transporte de íons, em resposta a infecções, assim como na exocitose de proteínas na glândula salivar. Outra função importante das prostaglandinas descrita para insetos é a capacidade de induzir a captação da proteína do vitelo de *Rhodinus prolixus* RHBP pelo ovário (*Medeiros et al., 2002; Medeiros et al, 2004*). Este trabalho mostra que os eicosanóides, além de agirem a nível comportamental, por exemplo, induzindo o

comportamento de postura, também agem a nível celular, influenciando a captação de proteínas pelo ovário.

A maioria dos estudos relacionados a prostaglandinas em carrapatos concentra-se no papel destas moléculas na interação parasita-hospedeiro (Bowman, Dillwith & Sauer, 1996; Aljamali et al. 2002). Isto devido as suas propriedades farmacológicas: anti-hemostática, vasodilatadora, imunossupressora, e anti-inflamatória. Sua síntese em carrapatos ocorre a partir do ácido araquidônico ingerido na alimentação hematófaga. As prostaglandinas são encontradas na saliva de carrapatos em concentrações que vão de 10 a 100 vezes a presente em exudatos inflamatórios de mamíferos (Bowman et al. 1996).

Aparentemente existe apenas um estudo descrevendo o papel das prostaglandinas em órgãos reprodutivos de carrapatos (Shemesh et al., 1979). Neste trabalho foram medidos os níveis endógenos de prostaglandina (PG) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em diferentes tecidos (testículos, ovários e glândula salivar de fêmeas e machos) de *H. anaticum excavatum*. Também foi verificado que estes tecidos são capazes de sintetizar PG e PGE₂ *in vitro*. A injeção de extrato de glândula salivar na hemocele de fêmeas virgens de *O. parkeri* estimula a oviposição e quando injetado na vagina, estimula maturação dos oócitos (Oliver, Pound & Andrews, 1984). Foi sugerido que devido ao seu alto teor de PG, a saliva do macho tenha papel no desenvolvimento dos oócitos (Oliver et al., 1984).

1.10 Efeitos da alimentação hematófaga nos carrapatos

Para todos os artrópodes hematófagos, a ingesta de sangue constitui um sinal para profundas mudanças fisiológicas e de desenvolvimento (Kaufman, 2004). O carrapato Agasídeo *O. moubata* se alimenta por aproximadamente 30-60 min (Kaufman & Phillips, 1981, 1982). Essa espécie de carrapato realiza a postura diversas vezes, cada uma dependente de um repasto sanguíneo. Por outro lado, os carrapatos Ixodídeo permanecem fixados ao hospedeiro de 5 a 15 dias, dependendo da espécie, estado fisiológico e outros fatores. Nestes casos o acasalamento causa mudanças fisiológicas importantes (revisado por Lomas & Kaufman, 1999).

O período de alimentação é dividido em 3 fases: (1) a fase preparatória – compreende de 1 a dois dias; é a fase em que a fêmea ancora no hospedeiro, libera o cimento e forma a lesão. (2) A fase lenta – ocorre nos próximos 4-8 dias; é quando a fêmea acasala e aumenta de tamanho cerca de 10 vezes. (3) A fase rápida – ocupa cerca de 24 horas; a fêmea aumenta de tamanho em mais de 10 vezes e então se solta do hospedeiro.

Esses processos fisiológicos estão bem descritos para o carrapato *A. hebraeum* pelos trabalhos de Kaufman e colaboradores. Cerca de 4 dias após o ingurgitamento, as glândulas salivares do carrapato *A. hebraeum* degeneram (Harris & Kaufman, 1981) por um processo controlado por 20E (Harris & Kaufman, 1985; Kaufman, 1991; Mao & Kaufman, 1999). Nesta espécie, a maturação dos oócitos ocorre durante o período de alimentação e a captação de vitelo ocorre no quarto dia após o ingurgitamento, e somente no décimo dia começa a oviposição que dura cerca de 3 semanas, e a fêmea morre (Friesen & Kaufman, 2002). Já em *R. microplus*, que é uma espécie de um único hospedeiro, a postura dos ovos tem início no terceiro dia após o ingurgitamento.

A transição entre as fases lenta e rápida de alimentação ocorre quando a fêmea atinge um aumento de 10 vezes no seu peso. Esse momento é bastante importante, pois marca o início das últimas 24 h de alimentação e é conhecido como peso crítico (“critical weight” (CW, fig. 9; Harris & Kaufman 1984). Esse momento é chamado de “crítico” porque as fêmeas que forem removidas do hospedeiro antes dele não realizam a postura, são capazes de se fixar novamente ao hospedeiro caso tenham oportunidade, e suas glândulas salivares não degeneram. Mas se a fêmea for removida acima do peso crítico, ela não volta a se fixar, realiza a postura e sofre degeneração das glândulas salivares (Kaufman & Lomas, 1996, revisado por Kaufman, 2004). Por fim, existem diferenças sutis entre o peso crítico para a refixação, degeneração das glândulas e desenvolvimento dos ovos (Weiss & Kaufman, 2001).

1.11 A utilização do vitelo na embriogênese

Os grânulos de vitelo são como lisossomos modificados, pois além de armazenarem as substâncias de reserva, possuem a maquinaria enzimática necessária para

a disponibilização destes nutrientes. Diferentemente dos lisossomos clássicos, que são organelas hidrolíticas vorazes, capazes de reduzir rapidamente praticamente toda e qualquer proteína, incluindo glicoproteínas a aminoácidos, açúcares e outros produtos menores, os grânulos de vitelo atuam na degradação do seu conteúdo interno de maneira controlada (Fagotto, 1995). Esta regulação na utilização do vitelo é essencial para que sejam providenciados nutrientes coordenadamente de acordo com o desenvolvimento do embrião, garantindo assim, a sua sobrevivência até se tornar um organismo apto a fazer uma refeição. Dois fatores têm se mostrado responsáveis pela regulação deste processo: pH e latência enzimática (Fagotto, 1995).

Já foram descritas muitas enzimas que atuam em pH ácido e muito provavelmente, estão envolvidas neste processo. Algumas estão resumidamente descritas nos próximos parágrafos. Em *Drosophila* sp. foi encontrada uma cisteíno proteinase tipo catépsina B que se apresenta fortemente associada às proteínas do vitelo. Nestas condições, esta enzima possui uma massa molecular de 1000 kDa, e durante o desenvolvimento ocorre uma dissociação mediada pela ação de uma serino proteinase neutra, também presente nos ovos, o que resulta na liberação da enzima livre com massa molecular de 39 kDa. Esta enzima é capaz de degradar as proteínas do vitelo em pH ácido 3,5 – 5,0 (Medina et al., 1988).

Foi purificada e parcialmente caracterizada a cisteíno proteinase de *Blatella germanica*, que inicia a degradação de Vt nos ovos. Esta protease contém três polipeptídeos de 27, 29 e 31 kDa gerados durante o desenvolvimento embrionário (Liu et al., 1996). Uma cisteíno proteinase, diferente das anteriores, foi purificada e caracterizada de ovos do bicho da seda (*Bombyx mori*) (Kageyama e Takahashi, 1990). Esta enzima também é ativada em pH ácido e hidrolisa vários substratos, como hemoglobina e lipoforina. A maior atividade detectada foi sobre Vg e Vt em pH 3,0 – 3,5. A cisteíno proteinase de *B. mori* é encontrada na hemolinfa das fêmeas e tem atividade máxima nos ovos maduros. A conversão da forma latente à forma ativa ocorre por auto-proteólise, reduzindo a massa molecular de 47 kDa para 39 kDa (Kageyama e Takahashi, 1990). *Musca domestica* é mais um inseto no qual foi identificada atividade cisteíno endopeptidásica, esta enzima é ativada por auto-proteólise em pH ácido e foi descrita por Ribolla e Bianchi (1995).



Fig. 10 – Esquema ilustrando a alimentação em *A. hebraeum* e o conceito de peso crítico definido por Harris & Kaufman (1984). Esta imagem foi adaptada de Friesen, 2003.

Em extrato bruto de ovos do carrapato *O. moubata* níveis máximos de degradação de Vt ocorrem em pH 3,0 – 3,5 e não é detectada proteólise em pH neutro. Esta atividade proteolítica é atribuída a uma cisteíno proteinase do tipo catepsina L de 37 a 39 kDa. Em pH neutro esta enzima é capaz de se ligar à vitelina (Fagotto, 1990a). No mosquito *Aedes aegypti* foram descritas duas proteinases acídicas funcionalmente diferentes, uma serino carboxipeptidase (Cho *et al.*, 1991a) sintetizada no corpo gorduroso e acumulada nos oócitos, e uma aspartico proteinase tipo catepsina D, cuja síntese também ocorre no corpo gorduroso, mas é restrita à fase de vitelogênese (Cho *et al.*, 1991b). O mRNA desta aspartico proteinase se acumula no corpo gorduroso 24 h após o início da síntese de Vg e precede, em 12h, o surgimento da atividade proteásica (Cho e Raikhel, 1992).

Como visto neste conjunto de dados, as pesquisas nesta área têm estabelecido quase conclusivamente que um sistema geral para degradação de vitelo durante o desenvolvimento embrionário, em uma ampla faixa de espécies de artrópodes, envolve a ativação de pró-cisteíno proteinases que se apresentam associadas a proteínas de reserva (Giorgi *et al.*, 1999). Um pouco menos conhecido é o mecanismo que leva a ativação destas enzimas. Além da ativação por acidificação, como citado anteriormente, existem outras hipóteses como o controle transcricional das enzimas responsáveis por esta hidrólise (Ikeda *et al.*, 1991); a proteólise limitada das pro-proteinases latentes; ou a remoção de inibidores específicos (Fagotto, 1995). A fosforilação da vitelina é um fator controlador de sua suscetibilidade à proteólise, tendo sido descrito para *B. mori*, onde a fosforilação da Vt aumenta sua degradação por cisteíno proteinase (Giorgi *et al.*, 1999).

Entretanto, a hipótese mais amplamente difundida e fundamentada ainda é a de que uma acidificação regulada dos grânulos de vitelo durante o desenvolvimento seja o principal fator responsável pela ativação das proteases durante a embriogênese. Esta ativação ocorreria por hidrólise do pró-peptídeo. Esta hipótese é corroborada por estudos realizados com quatro modelos, carrapato - *O. moubata* (Fagotto, 1991), barata - *Blattella germanica* (Nordin *et al.*, 1990), ouriço do mar - *Strongilocentrotus purpuratus* e *Lytechinus pictus* (Mallya *et al.*, 1992) e sapo - *Xenopus laevis* (Fagotto e Maxfield, 1994a; Fagotto e Maxfield, 1994b), onde foi constatado que, no início do desenvolvimento, o pH dos grânulos de vitelo é neutro ou ligeiramente ácido, e durante a

embriogênese ocorre uma acidificação regulada dos grânulos, que desencadeia a degradação do vitelo.

Esta ativação também poderia ocorrer pela separação da pró-enzima de um inibidor. Esta segunda hipótese está fundamentada no fato de que, como descrito acima, algumas destas enzimas apresentam-se associadas a uma grande proteína, normalmente uma proteína de vitelo (Fagotto, 1995) que poderia estar atuando como inibidor, já que é descrito que proteínas de vitelo possuem atividade inibitória de tripsina e quimiotripsina (Salisbury *et al.*, 1980; Ezquieta *et al.*, 1986). Mas ainda é necessário demonstrar que estas proteínas efetivamente inibem proteinases, como cisteíno proteinases, e desempenham papel determinante na regulação da degradação do vitelo (Fagotto, 1995).

No próximo item serão abordadas as enzimas envolvidas na degradação de VT em *R. microplus*, o carrapato bovino que é objeto de estudo desta tese. Efetivamente, estas enzimas encaixam-se perfeitamente neste modelo fisiológico proposto por diversos autores, tanto pela classe a que pertencem como pelas condições de ativação e preferência por substrato.

1.12 Enzimas de *R. microplus* envolvidas na degradação de Vt

Estão descritas quatro enzimas envolvidas na degradação de vitelina em *R. microplus*. Três delas em ovos, VTDCE (Vitellin Degrading Cysteine-Endopeptidase; Seixas *et al.*, 2003), BYC (Boophilus Yolk Pró-Catepsin; Logullo *et al.*, 1998) e THAP (Tick Heme Binding Aspartic Proteinase; Sorgine *et al.*, 2000); e uma em larvas, RmLCE (*R. microplus* larvae Cysteine-endopeptidase; Estrela *et al.*, 2006).

VTDCE

Foi purificada de ovos de 0 – 10 dias de *R. microplus*, na forma de um dímero contendo uma subunidade de 17 e outra de 22 kDa (Seixas *et al.*, 2003). Possui pH ótimo 4,0 e temperatura ótima de 50°C. É completamente inibida por E-64, pertencendo a classe das cisteíno endopeptidases. A VTDCE é uma protease associada ao vitelo, nenhum método testado foi capaz de separá-la da VT. Por este motivo foi incluído no protocolo de purificação uma etapa de autólise em pH ácido, em que a VT é completamente degradada

e a enzima é recuperada no sobrenadante da preparação. Neste mesmo protocolo fazem parte: uma cromatografia de troca aniônica em pH neutro, uma gel filtração, e outra cromatografia de troca aniônica, ambas em pH ácido. Após a etapa de autólise, a enzima torna-se instável e pode ser inativada irreversivelmente, caso volte a condições de pHs $\geq 7,5$. Por isso, ela deve ser mantida em pH ácido até a obtenção do preparado final. A VTDCE tem atividade proteolítica sobre hemoglobina e albumina, além da Vt. Quanto a preferência por substratos sintéticos, são melhor hidrolisados aqueles que contêm grupamentos hidrofóbicos em P1 ou em P2.

No segundo capítulo desta tese estão sendo abordados estudos funcionais e de caracterização da VTDCE, incluindo sua localização no intestino e ovário, e sua associação com a Vt.

RmLCE

A RmLCE foi parcialmente purificada de larvas de 0 – 12 dias de *R. microplus* e teve sua atividade caracterizada (Estrela et al., 2006). Esta enzima possui temperatura ótima 37°C e pH ótimo 5, e assim como a VTDCE torna-se instável em pHs $\geq 7,5$. Com o passar dos dias após a eclosão da larva, esta atividade proteolítica aumenta concomitantemente com o conteúdo de proteína total. Considerando que esta enzima apresenta a capacidade de degradar Vt, os autores sugerem que ela seja responsável pela nutrição da larva até o início da alimentação hematófaga.

BYC

BYC foi purificada de ovos de 1º dia de *R. microplus* na forma de uma pró-aspártico proteinase de 54 kDa, que é ativada em pH 3,5 por auto-proteólise, passando à forma madura da enzima, com 47 kDa, sensível à pepstatina A. Esta enzima é sintetizada no intestino e no corpo gorduroso do carrapato, é secretada na hemolinfa e capturada pelos oócitos. Foi verificado que a BYC tem ação proteolítica sobre Vt em extrato de ovos de *R. microplus*, através de um experimento em que o extrato foi incubado em pH 3,5 a 37°C por 24h, na presença e ausência de pepstatina A (Logullo *et al.*, 1998). Bovinos vacinados com BYC mostraram que esta proteína confere proteção parcial contra carrapatos (ver item 1.11; da Silva *et al.*, 1998; Leal et al., 2006).

THAP

THAP é uma aspártico proteinase tipo catepsina D de ~35 kDa. O pH ótimo de atuação é 3,5 e a atividade desta enzima, tanto sobre o peptídeo sintético Abz-AIAFFSRQ-EDDnp como sobre proteínas, é inibida por pepstatina A. Esta enzima possui um sítio de ligação a heme e se liga a esta molécula na proporção de 1:1, com uma constante de dissociação de 190 nM. Por reconhecimento do heme, a THAP é capaz de se ligar a Vt, que é uma hemeproteína. Esta aspártico proteinase esta presente nos grânulos de vitelo e apresenta atividade proteolítica sobre Vt. Esta atividade é modulada pela quantidade de heme. Um excesso de heme livre compete com o heme da Vt, fazendo com que a THAP deixe de se ligar a Vt e, conseqüentemente, hidrolisá-la. Quando a concentração de heme livre é baixa, a enzima volta a ficar ativa, hidrolisando Vt. Este dado sugere que esta enzima está envolvida na disponibilização de heme e no controle de danos oxidativos (Sorgine *et al.*, 2000).

1.13 A utilização destas enzimas como antígenos no controle do carrapato

As infestações por carrapatos são responsáveis por grande impacto econômico na pecuária das regiões tropicais e subtropicais do mundo. Infestações por *R. microplus* causam impactos por reduzir o ganho de peso e a produção de leite, devido a espoliação causada nos hospedeiros, e por transmitem os patógenos causadores de babesiose (*B. bigemia* e *B. bovis*) e anaplasmoze (*A. marginale*). A depreciação da qualidade do couro é mais um fator que agrava os prejuízos. O controle do carrapato é fundamentalmente realizado com base no uso de acaricidas químicos. Entretanto, problemas causados pela seleção de populações resistentes às drogas disponíveis, aliados a tendência dos consumidores de exigirem cada vez mais produtos de origem animal, não só isentos de resíduos de xenobióticos, mas também produzidos por métodos que excluam a possibilidade de contaminação, impõem a necessidade por novos métodos de controle.

Uma alternativa biológica para o controle de infestações por *R. microplus* é o uso de métodos imunológicos. Pesquisas nesta área têm sido feitas em diversas partes do mundo, principalmente Austrália, Cuba e Brasil, buscando uma alternativa para evitar as desvantagens do uso de produtos químicos. A resposta natural dos bovinos à infestações

por carrapatos geralmente é baixa, provavelmente por competição entre antígenos (Patarroyo *et al.*, 2002). Alguns antígenos, como os constituintes da saliva, são irrelevantes para induzir resistência, mas competem com os antígenos protetores. No entanto, o inóculo de antígenos purificados juntamente com adjuvantes adequados pode gerar uma resposta imune satisfatória.

A capacidade da aspartico proteinase BYC de induzir resposta imune protetora em bovinos contra *R. microplus* foi testada através de experimentos de vacinação. O efeito dos anticorpos também foi avaliado pelo inóculo de monoclonais anti-BYC em fêmeas ingurgitadas (da Silva, Jr. *et al.*, 1998; Leal *et al.*, 2006). O inóculo de anticorpos nas fêmeas causou, de forma dose-dependente, diminuição na oviposição e na sobrevivência dos parasitas, quando comparados com os controles. Nos experimentos de imunização, a análise de vários parâmetros biológicos como número de fêmeas ingurgitadas, capacidade de postura e fertilidade dos ovos, demonstraram uma proteção parcial entre 14 e 36%. Diferentemente da Bm86, o primeiro antígeno usado em vacina contra carrapato (Willadsen, 1995), a BYC quando usada para vacinação não provoca danos no trato digestivo (não foram encontradas teleóginas hemorrágicas), mas interfere no aparelho reprodutivo. Desta forma, afeta principalmente a eclosão das larvas, efeito que é consistente com o papel proposto para esta enzima na degradação de vitelo durante a embriogênese (Logullo *et al.*, 1998). O efeito imunoprotetor da BYC recombinante (rBYC) expressa em *E. coli* também foi avaliado (Leal *et al.*, 2006). O soro dos bovinos imunizados com rBYC reconheceu a proteína nativa com título entre 125 e 4000. Os bovinos imunizados quando desafiados com 20.000 larvas de *R. microplus* apresentaram uma proteção de 25,24% que é similar à alcançada com a proteína nativa. A outra aspartico proteinase, THAP, foi testada somente em um experimento preliminar de vacinação, no qual foi capaz de desenvolver certa resposta em bovinos contra carrapatos (dados não publicados).

O terceiro capítulo desta tese mostra a avaliação do potencial da VTDCE como antígeno em vacina contra carrapato e compara esta cisteíno endopeptidase, com as aspartico proteinases também envolvidas na degradação de Vt em ovos de *R. microplus*, BYC e THAP.

1.14 Os antígenos Bm86, Bm95 e Bm91

Cientistas australianos identificaram um antígeno de intestino de *R. microplus* denominado Bm86. A Bm86 é uma glicoproteína de membrana, de 89 kDa, presente nas microvilosidades das células digestivas e, aparentemente envolvida em endocitose. Esta proteína foi clonada e expressa em *Escherichia coli* e com base neste antígeno recombinante, foi produzida uma vacina anti-carrapato denominada TickGUARD™ (Willadsen *et al.*, 1989). Esta foi a primeira vacina disponibilizada que apresentou factibilidade tecnológica para uso no controle de *R. microplus*. Com a aplicação da Bm 86, uma proteína de intestino, foi inserido o conceito de antígeno oculto que refere-se aos antígenos do carrapato que naturalmente não entram em contato com o sistema imune do hospedeiro (Willadsen, 1995). Mais tarde pesquisadores cubanos, usando a seqüência publicada da Bm86, clonaram e expressaram, em *Pichia pastoris*, uma proteína recombinante semelhante. Usando esta nova proteína recombinante, foi desenvolvida uma nova vacina, GAVAC™, que passou a ser comercializada na América Latina (Rodriguez *et al.*, 1995a, Rodriguez *et al.*, 1995b).

A Bm86, clonada e expressa em *E. coli* para utilização em vacina, conferiu uma proteção de 77%. Por tratar-se de uma glicoproteína, a proteção é aumentada com o uso de proteína expressa em células de inseto, provavelmente porque com este sistema de expressão, a proteína obtida é glicosilada. Uma proposta de uso alternativo da Bm86 é a produção de uma vacina peptídica sintética, que tem como vantagens: um alto grau de pureza, caracterização química completa, ausência de contaminantes, facilidades para produção em larga escala, alta estabilidade por ser menos susceptível ou insensível a desnaturação térmica, baixo custo de produção em escala industrial (Patarroyo *et al.*, 2002). Resultados positivos foram obtidos com esta técnica. Três peptídeos sintéticos foram testados sendo que um deles apresentou melhor eficácia com relação aos demais, 81,05%. Carrapatos alimentados nos bovinos vacinados com este peptídeo demonstraram aumento na mortalidade, redução no peso e na capacidade de oviposição.

Variações na seqüência da Bm86 têm sido encontradas em isolados de *R. microplus*, tendo conseqüências sobre a eficiência da vacina. A eficácia de vacinações com Bm86 varia de 51% no Brasil até 91% em Cuba (de la Fuente *et al.*, 2000). Assim, imunizações com Bm86 possibilitam intervalos maiores entre aplicações de produtos químicos, mas não dispensam o uso associado dos acaricidas, que ainda são fundamentais para que os carrapatos sejam controlados eficientemente. Neste contexto, outro antígeno de intestino (Bm95), muito similar à Bm86, foi isolado de uma cepa argentina de *R. microplus*, resistente a Bm86. A Bm95 protegeu contra um amplo espectro de populações de *R. microplus* quando comparada à Bm86, afetando o ciclo de vida dos carrapatos nos bovinos vacinados e reduzindo a freqüência dos tratamentos com acaricidas, de maneira similar a primeira vacina (Garcia-Garcia *et al.*, 1999). Outro antígeno imunoprotetor encontrado foi a Bm 91, uma carboxipeptidase de 86 kDa, similar a enzima conversora de angiotensina de mamíferos. Esta enzima está presente em glândula salivar e intestino de *R. microplus* (Riding *et al.*, 1994; Jarney *et al.*, 1995) e também foi capaz de induzir proteção parcial contra este carrapato em experimentos de vacinação (Willadsen *et al.*, 1996).

Após os resultados obtidos com proteínas de intestino, esforços foram direcionados para a busca de outros antígenos do aparelho digestivo e da glândula salivar do carrapato, por se pensar que estes seriam os únicos alvos susceptíveis aos anticorpos presentes no sangue do hospedeiro vacinado. Entretanto, foi demonstrado que 2% dos anticorpos ingeridos por uma fêmea ingurgitada durante a refeição sanguínea em um hospedeiro vacinado estão viáveis na hemolinfa (da Silva Vaz Jr. *et al.*, 1996). A passagem de imunoglobulina G do intestino para a hemolinfa já havia sido previamente relatada por Ben Yakir (1989). Estes resultados mostram que os anticorpos presentes no sangue do hospedeiro são capazes de chegar, via hemolinfa, a outros órgãos internos do carrapato. A partir disto, proteínas de órgãos que não entram em contato com o hospedeiro passaram a ser considerados alvos para compor uma vacina. Para isto, pesquisadores têm-se dedicado ao estudo mais detalhado da fisiologia e da bioquímica do carrapato.

1.15 Uma avaliação dos dez anos do desenvolvimento da primeira vacina comercial contra carrapatos

Vacinas contra carrapatos contendo Bm86 como antígeno foram registradas em vários países da América Latina e na Austrália no período entre 1993-1997 (de La Fuente et. al., 2007). O uso dessas vacinas comerciais no campo tem sido reportado em Cuba, Austrália, México, Colômbia e Brasil. Vacinas comerciais baseadas na proteína de intestino de *R. microplus* Bm86 têm provado serem viáveis, oferecendo um método ambientalmente aceito e de baixo custo. Estas vacinas reduzem as infestações no rebanho bovino e, conseqüentemente, o uso de acaricidas, tendo como pontos positivos o aumento na produção animal e a redução na ocorrência de doenças transmitidas por carrapatos (de la fuente et al., 2007).

Dez anos depois do surgimento da primeira vacina, o uso de vacina anti-carrapato continua sendo documentado em Cuba (Gavac, distribuída por Heber Biotec S.A., Havana, Cuba: http://www.heber_biotec.com/Veterinarios.asp), México (Gavac, distribuída por Revetmex S.A. de C.V., Mexico City, Mexico: http://www.revetmex.com/rev_esp/cat/cat_07/cat_0707.html) e Austrália (TickGARD, atualmente distribuída por Queensland Dairy Farmers Organization em acordo com Intervet Australia Pty. Ltd., Bendigo, Australia: <http://www.abc.net.au/rural/qld/stories/s1084200.htm>). No entanto, a comercialização de novas vacinas anti-carrapato tem sido dificultada devido a problemas relacionados ao descobrimento de novos antígenos, aos custos de se testar vacinas em bovinos e a reestruturação de algumas companhias.

No Brasil, mais de 1000 bovinos foram vacinados em 1995 quando a vacina Gavac foi liberada para comercialização no país (Massard et al., 1995). Resultados preliminares documentaram uma redução média de 50% no uso de acaricidas, incluindo fazendas com diferentes condições de produção e diferentes raças bovinas. O uso desta vacina no Brasil foi descontinuado por problemas de aceitação no mercado, devido a eficácia insuficiente.

1.16 Na busca por novos antígenos

Até 2006, cerca de 20 proteínas haviam demonstrado propriedades antigênicas e, quando expressas na forma recombinante, capacidade de induzir uma proteção mensurável contra carrapatos (Willadsen, 2004). Estes dados mostram uma grande diversidade funcional nos antígenos propostos (revisado em Willadsen, 2004). Como exemplo, temos a variedade de antígenos recombinantes que vem sendo descritos em *Haemaphysalis longicornis*, que inclui uma proteína similar à troponina-I (You, 2005), serpinas (Sugino et al., 2003; Imamura et al., 2005), um antígeno de glândula salivar com similaridade a proteína de matrix extracelular (Mullenga et al., 1999), e uma proteína salivar de baixo peso (Tsuda et al., 2001).

A proteína recombinante 64-P de *R. appendiculatus*, similar à queratina e colágeno, conferiu significativa proteção, em testes com porquinho-da-índia, contra duas espécies *R. appendiculatus* e *I. ricinus* (Trimmel et al., 2005). Outra abordagem é o uso da “Voraxina” como antígeno (Weiss e Kaufman, 2004). Voraxina é uma proteína do macho capaz de induzir a fêmea a se alimentar até o ingurgitamento. Fêmeas alimentadas em coelhos imunizados com esta proteína tiveram uma redução no peso de 72% após duas semanas.

Proteinases, peptidases e inibidores têm sido muito estudados bioquimicamente e são considerados potenciais alvos como antígenos vacinais. São alguns exemplos, a vacinação com uma serpina de intestino de *H. longicornis* que resultou em 44% e 11% de mortalidade em ninfas e adultos respectivamente (Sugino et al., 2003). Mais recentemente, Imamura et al. (2005), realizaram experimento de vacinação em coelhos com a serpina-2 do mesmo carrapato, que resultou em 44.6 e 43% de mortalidade em ninfas e adultos. Outros dois inibidores de serino proteinase de *H. longicornis*, rRAS-1 e -2, foram avaliados em vacinação de bovinos, conferindo proteção significativa, 61.4% de redução no ingurgitamento das ninfas, e 28 e 43% de aumento na mortalidade de adultos fêmeas e machos, respectivamente. Este foi o primeiro estudo usando a combinação de duas diferentes serpinas de *R. appendiculatus* como antígeno e desafio, usando bovinos como hospedeiro natural (Imamura et al., 2006).

Em suma, algumas tentativas têm alcançado relativo sucesso no uso de proteinases e inibidores como antígenos vacinais contra carrapatos. Mas estes sofrem dos mesmos problemas que os demais antígenos: falta de consistência nos efeitos, e mais importante, insuficiente eficácia para garantirem a produção de uma vacina eficiente e prática contra carrapatos (Willadsen, 2006). Vários fatores são considerados possíveis responsáveis por estes problemas. Um deles é o grande número de genes codificando proteinases da mesma classe que estão presentes no genoma. Podemos considerar que nem todas sejam expressas e que quando expressas, somente uma parte é realmente importante para a interação parasita hospedeiro. Além disso, redundância nas funções é provável, fazendo seu uso como alvo imunológico problemático a menos que a reatividade cruzada seja alta. Nos casos de antígenos presentes em órgãos como intestino e ovário, por exemplo, a eficiência da vacina também dependerá da captação e retenção dos anticorpos.

Um ponto interessante também abordado por Willadsen (2004) é a vulnerabilidade dos anticorpos à degradação. A rápida degradação enzimática dos anticorpos pode prejudicar uma vacina. Presença de imunoglobulinas na hemolinfa de carrapatos é reportada, mas em baixas quantidades (Allingham et al., 1992; da Silva Vaz Jr., 1996). É sabido que a concentração de IgG no intestino de *H. irritans exigua* decai 50% uma hora após um único repasto sanguíneo, enquanto atividade específica do antígeno decai 70% no mesmo tempo (Allingham et al., 1998).

Contudo, encontrar antígenos que, separadamente ou em conjunto, possam ser usados no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra esses parasitas continua sendo um desafio e uma necessidade, devido à evolução das exigências dos mercados consumidores de produtos de origem bovina.

2. OBJETIVOS

O presente trabalho teve dois objetivos principais:

- a) estudar o processo reprodutivo em carrapatos;
- b) avaliar o uso como antígeno vacinal de uma molécula de importância nesse processo.

Para tanto, o trabalho teve como objetivos parciais:

- a) Confirmar o efeito de 20E na síntese de Vg em fêmeas virgens de *A. hebraeum*.
- b) Determinar se esse hormônio induz a captação de Vg pelos oócitos nesta espécie.
- c) Avaliar a possível presença de um fator indutor da captação de Vg na hemolinfa de fêmeas vitelogênicas.
- d) Investigar a distribuição e, o perfil das cisteíno endopeptidases, de acordo com o estágio de vida e os diferentes tecidos da fêmea de *R. microplus*.
- e) Caracterizar e investigar o papel fisiológico da VTDCE.
- f) Avaliar a eficácia da VTDCE em experimento de imunização de bovinos e desafio com *R. microplus*.

3. RESULTADOS

Este capítulo da tese apresenta as etapas concluídas do trabalho, que foram escritas na forma de artigos completos para serem publicados em revistas científicas internacionais. O capítulo está dividido em três subcapítulos (3.1, 3.2, 3.3), cada um composto de um artigo, sendo que o primeiro encontra-se submetido, o segundo está em forma de manuscrito e o terceiro está parcialmente aceito para publicação. Os artigos contêm introdução, materiais e métodos, descrição dos resultados, discussão e a bibliografia utilizada.

3.1 Efeito da 20-hidroxicdisona e da hemolinfa na oogênese do carrapato Ixodide *Amblyomma hebraeum*

Artigo I - Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*

Seixas, A., Friesen, K. J., Kaufman, R. W.

Journal of Insect Physiology

Trabalho realizado no Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alberta, Canadá, durante o estágio de Doutorado Sanduíche.

**Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid
tick *Amblyomma hebraeum***

Adriana Seixas^a, Kevin J. Friesen^b and W. Reuben Kaufman^{bd}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil, CEP 91501-970

^b Department of Biological Sciences, University of Alberta
Edmonton, Alberta, Canada T6G 2E9

^d Author for correspondence: Tel. 1-780-492-1279; Fax. 1-780-492-9234;

E-mail: reuben.kaufman@ualberta.ca

Abstract

Earlier work from our laboratory indicated that injection of 20E into small partially fed females (i.e., non-vitellogenic) stimulates synthesis of vitellogenin (Vg), but not yolk uptake, in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. In contrast, Thompson et al. (2005; *J. Insect Physiol.* **51**: 1105-1116.) demonstrated that injection of 20E into virgin female *Dermacentor variabilis* ticks stimulated both vitellogenesis and uptake of Vg by the oocyte. The two major differences between our work and that of Thompson et al. were the difference in tick species and the difference in method for injecting 20E. In our earlier work we removed partially fed female *A. hebraeum* from a host, injected them with 20E and then held them in the colony incubator until used for data collection ('off-host injection'). Thompson et al. injected the females while they remained attached to the host ('on-host injection'). In this study we repeated our earlier experiments on *A. hebraeum* using on-host injection. We also treated off-host ticks with exogenous 20E with or without haemolymph collected from engorged ticks (days 2 – 10 post engorgement), or from large partially fed mated ticks in the rapid phase of engorgement, to see whether we might detect a 'vitellogenin uptake factor' (VUF) in haemolymph. We demonstrated that exogenous haemolymph can potentiate the action of 20E on some measures of ovarian and oocyte development. However, the effect was small compared to the degree of ovarian/oocyte development observed in normal females, and small compared to the effect reported by Thompson et al. We conclude that at least some of the difference observed between the two laboratories relates to the species difference, and that the engorged haemolymph of *A. hebraeum* may contain a VUF.

Keywords: ixodid ticks, Amblyomma hebraeum, Dermacentor variabilis, ecdysteroids, 20-hydroxyecdysone, vitellogenesis.

1. Introduction

Synthesis of vitellogenin (Vg), and its uptake by oocytes are essential steps of egg maturation in all arthropods. Although the roles of 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone (JH) have been well characterized for vitellogenesis in insects (Raikhel et al., 2005), we know much less about the hormonal control of vitellogenesis in ticks. Although JH was initially hypothesized to be involved in Vg-synthesis (Pound and Oliver, 1979; Connat et al., 1983), more critical studies using gas chromatography/mass spectrometry uncovered no evidence for the occurrence of JH or JH-like molecules in several tick species (Connat, 1987; Neese et al., 2000).

A series of experiments by Chinzei et al. (1992) indicates that Vg-synthesis in the argasid tick *Ornithodoros moubata* is initiated by a neuropeptide from the synganglion ('vitellogenesis inducing factor'; VIF). VIF acts on some unknown tissue to cause the release of 'fat body stimulating factor' (FSF); FSF is assumed to be the vitellogenic hormone.

The weight of evidence is now in favor of an ecdysteroid as the vitellogenic hormone in ticks. In virgin *O. moubata*, topical application of ecdysteroids accelerates egg development and oviposition (Ogihara et al., 2007). Likewise, expression of the ecdysteroid receptor in whole tick extracts of *O. moubata* increases prior to and during vitellogenesis and ecdysis (Horigane et al., 2007).

In the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch, whole body ecdysteroid content (Connat et al., 1985) and haemolymph ecdysteroid-concentration (Kaufman, 1991) rises after engorgement and, coincident with vitellogenesis, peaks just before oviposition begins. Salivary gland degeneration, which occurs during the first 4-5 days after engorgement, is regulated by an ecdysteroid hormone in this tick (Kaufman, 1989; Lomas et al., 1998; Mao and Kaufman, 1998, 1999). However, the haemolymph ecdysteroid-concentration continues to rise thereafter, and ultimately peaks at a level far beyond that necessary to effect complete salivary gland degeneration (Kaufman, 1991); this suggested that an ecdysteroid hormone may also be involved in regulating other functions, perhaps including vitellogenesis.

In an attempt to establish the roles of ecdysteroids and JH during vitellogenesis, Lunke and Kaufman (1993) injected small, partially fed (i.e. non-vitellogenic), female *A. hebraeum* with

JH-III and/or 20E. Yolk uptake by the oocytes did not occur in response to JH-III, 20E or to combinations of the two. However, when they transplanted ovaries from partially fed females to the haemocoels of engorged females, numerous oocytes accumulated a large amount of Vt, thus demonstrating that the ovaries of partially-fed ticks are fully competent to develop when placed in the hormonal milieu of a vitellogenic female. Although the latter authors noted a marked swelling of the fat body following 20E treatment, haemolymph Vg was not quantified in their study. However, in *Ixodes scapularis*, a rise in Vg-synthesis was correlated with an increase in whole body ecdysteroid-content (James et al., 1997). The fat body, which is a site of Vg-synthesis in argasid and ixodid ticks (Chinzei and Yano, 1985; Rosell and Coons, 1990) releases Vg into the medium when exposed to 20E in organ culture (Sankhon et al., 1999).

To demonstrate a direct effect of 20E on vitellogenesis, Friesen and Kaufman (2004) used an ELISA to measure haemolymph Vg-concentration of partially fed *A. hebraeum* following multiple bolus injections of 20E. Although Vg was not taken up by the oocytes, 20E caused a substantial rise in haemolymph Vg-titre. These results suggested that a 'Vt-uptake factor' (VUF), distinct from 20E, may be required for accumulation of yolk in the eggs of *A. hebraeum*.

Thompson et al. (2005) developed a technique to inject virgin female *Dermacentor variabilis* with 20E while the ticks are still attached to the host ('on-host injection'). This technique offers the distinct advantage that tick feeding is not disrupted during hormone injection. Under these conditions, 20E-treated virgin females did not engorge within 4 days, but their oocytes accumulated a substantial amount of Vt, indicating that, in this species, 20E alone is a sufficient signal to trigger both Vg-synthesis and Vg-uptake into the oocytes.

In the present study, we tested the effects of 20E on Vg-uptake in virgin *A. hebraeum* using on-host injection, to determine whether our earlier failure to elicit Vg-uptake by 20E-treatment alone might have been due to the difference in technique (off-host vs on-host injection) rather than the difference in tick species. In parallel experiments we also tested the possible effects of haemolymph-borne factors on Vg-uptake in mated, small partially fed female ticks held off the host.

2. Materials and Methods

2.1 Ticks

Our *A. hebraeum* colony was kept in darkness, at 27°C and >85% humidity. Tick feeding occurred on rabbits as described by Kaufman and Phillips (1973). Depending on the experiment, ticks were allowed to engorge and detach spontaneously, or were forcibly removed from the host below the critical weight (CW) necessary to begin vitellogenesis (Kaufman and Lomas, 1996; Lomas and Kaufman, 1999). In this study, engorged weight ranged from 900 - 3500 mg, and partially fed females (below the CW) ranged from 100 - 220 mg. Ticks were rinsed with water, weighed, and used for off-host injection experiments or stored individually in gauze-covered glass vials until needed for dissection and collection of haemolymph (see section 2.2.1).

2.2 Experimental Protocols

2.2.1 Testing the effects of 20E and haemolymph on partially fed mated off-host ticks.

In this experiment, partially fed ticks below the CW were removed from the host and injected with 20E (Sigma), or 20E plus haemolymph, in order to test for a VUF. The vehicle for these off-host experiments was 0.63% ethanol in 1.2% NaCl.

Haemolymph for injection was collected as follows: Ticks were fixed, ventral side down, to disposable petri dishes with a cyanoacrylate glue, and chilled in a refrigerator for 15 min. The cuticle was slit in various places with a razor blade micro scalpel, and the exuding haemolymph was collected in volumetric capillary tubes, immediately diluted 1:2 (v/v) in saline, frozen on dry ice, and stored at -20°C until needed for injection. Haemolymph was collected from four stages of the feeding cycle: (1) from non-engorged females forcibly removed from the host during the rapid-phase of feeding (referred to here as ">CW"), (2) from engorged females on days 2 and 3 post engorgement (samples from these days were pooled together; referred to here as day "2.5"), (3)

from engorged females on day 5 post engorgement and (4) from engorged females on day 10 post engorgement. 20E was dissolved in 70% ethanol to make a 5 mg/ml solution that was diluted to a working concentration of 45 µg/ml in 1.2% NaCl. One microlitre of the 20E stock solution was combined with 4 or 9 µl of haemolymph, or with the same volume of vehicle, such that the injected concentration of 20E was 45 ng/100 mg body weight (bw). An initial experiment was performed using 4 µl of haemolymph/100mg bw (total injected volume being 5 µl/100 mg bw), but haemolymph volume was later increased to 9 µl/mg bw (total injected volume being 10 µl/100 mg bw) in an attempt to maximize the dose of a putative VUF. Ultimately, there were no apparent differences between ticks receiving 4 or 9 µl of haemolymph, so the 5 µl/100 mg bw data and 10 µl/100 mg bw data were pooled for statistical analysis. Control ticks were injected with the vehicle. All injected ticks were surface sterilized in 70% ethanol for 1 min, and injected through the camerostomal fold (the articulation between the capitulum and scutum) using a Hamilton[®] syringe fitted with a 30g needle. Injections were repeated on days 2 and 5 post-removal. Ticks were kept under colony conditions until their haemolymph and tissues were collected on day 10 (see section 2.3).

2.2.2 Testing the effect of 20E and haemolymph on partially fed virgin on-host ticks.

We injected 20E into virgin females on-host, following the method described by Thompson et al. (2005) as closely as possible. This technique avoids potential complications associated with interrupted feeding. Each tick was injected with 5 µl of the following treatment solution: 12.3 mg 20E per ml of 0.1% DMSO and 0.15% ethanol in saline, such that the injected concentrations were 0.6, 6, 31 or 154 µg/g bw, based on an estimated tick body weight of ~200 mg at the time of injection. The vehicle for these on-host injections was 0.05% DMSO plus 0.075% ethanol in 1.2% NaCl. Some females were also injected with the 20E-solution mixed 1:4 with haemolymph collected from engorged females 2 days post engorgement.

Injections into the tick haemocoel were performed using a Hamilton[®] syringe fitted with a 30 g needle. The needle was inserted with care at the posterior midline so as not to puncture the

midgut. Five microlitres of solution were injected, and the needle held in place for a further minute to minimize leakage of injected solution or haemolymph upon withdrawing the needle. Injected ticks were allowed to feed for 6 days following injection, and then removed from the host for data collection.

2.3 Collection of tissue and haemolymph samples

For analysis of haemolymph and ovaries for indices of vitellogenesis (Vg- concentration in haemolymph and ovary, ovary weight and oocyte size), ticks were immobilized as described in 2.2.1 above. A small incision was made in the cuticle and haemolymph was collected in a calibrated glass micropipette. Haemolymph used for the ELISA was diluted 1:4 (v/v) in phosphate-buffered-saline (PBS; 35 mM NaH₂PO₄, 60 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl, pH 7.0). Samples were stored at -70⁰C until assayed for Vg-concentration by an ELISA (see section 2.5).

After collection of haemolymph, ticks were flooded with a modified Hank's balanced saline (200 mM NaCl, 8.9 mM D-glucose, 5.4 mM KCl, 1.3 mM CaCl₂, 0.4 mM MgSO₄, 0.44 mM KH₂PO₄, 0.35 mM Na₂HPO₄, 27 µM phenol red, pH 7.2), and the dorsal cuticle was removed using a microscalpel. Salivary glands were excised and set aside for measuring salivary fluid secretory competence (see section 2.4). Ovaries were dissected out, and the length of the long axis of the eight apparently largest ovoid oocytes was measured using a calibrated ocular micrometer fitted to a compound microscope. The mean value for the eight oocytes was recorded for each tick, and ovary growth and oocyte development were scored according to the system described in section 2.6.2. The ovaries were then gently blotted, weighed to the nearest 10 µg, rinsed in PBS and stored whole in a micro-centrifuge tube at -20⁰C until further analysis for Vt by an ELISA or by a spectrophotometric assay (see sections 2.5 and 2.6.1).

2.4 Salivary fluid secretory competence.

Salivary gland degeneration in female ixodid ticks is triggered by an ecdysteroid hormone (Harris and Kaufman, 1985). To confirm the general efficacy of 20E-injections in this study, we measured salivary fluid secretory competence using the technique of Harris and Kaufman (1984). Briefly, paired salivary glands were excised from each tick, and the main ducts ligated with strands peeled from 8-0 Dermalon[®] silk thread (Davis and Geck). The glands were gently blotted with a small strip of filter paper and the wet weight was measured on a microbalance to the nearest 10 µg. The glands were incubated for 10 min in TC medium 199 (Gibco; supplemented with 36 mM NaCl, 10 mM MOPS (pH 7.3) and 10 µM dopamine; Sigma), blotted, and re-weighed. A reduction of fluid secretory competence compared to appropriate controls is a quantitative measure of salivary gland degeneration in this assay.

2.5 Preparation of Vt for the ELISA

Vt was partially purified from the ovaries of day 10 engorged ticks as previously described by Friesen and Kaufman (2002), with minor modifications. Briefly, an ovary homogenate (113 mg ovary in 2 ml PBS;) was centrifuged and the supernatant passed through a gel filtration column (Superose 6B, Pfizer-Pharmacia) at low pressure, and then pooled fractions of interest (50 ml) were concentrated to 1.5 ml using Centriprep (Amicon) centrifuge tubes and passed through a Sephacryl S-300 column (General Electric Healthcare). Because tick Vt contains a haem moiety (Sonenshine, 1991) the fractions containing large amounts of both haem and protein, as determined by spectrophotometry, were analyzed by immunoblot for the presence of Vt by using antibodies raised against the two Vg proteins, Vg 211 and Vg 148 as described by Friesen and Kaufman (2002). Protein concentration of all samples was measured using the Bradford reagent kit (Sigma). Haemolymph and ovary homogenates were assayed for the presence of Vg or Vt, respectively, using the indirect competitive ELISA described by Friesen and Kaufman (2002).

2.6 Other indices of ovarian development

2.6.1 Spectrophotometric assay

Vt-content in ovaries was also estimated using the spectrophotometric method described by Kaufman et al. (1986) with minor modifications. Briefly, the ovaries were homogenized in PBS and centrifuged at 8000 g for 10 min. Absorbance of the supernatant was measured at 400 nm (near the peak for the haem moiety of Vt) from which was subtracted the absorbance at 500 nm (non-specific to haem). Corrected absorbance was normalized for weight of ovary in the sample.

2.6.2 Determination of ovarian growth phases in whole mounts

To describe the stages of ovarian development in *A. hebraeum*, females were allowed to mate and feed to engorgement. Once detached, ticks were kept in vials under colony conditions until the desired day of dissection, following which the ovaries were photographed using a Nikon DXM1200 digital camera attached to a dissection microscope.

The classic scoring system developed by Balashov (1972) refers only to individual oocytes. Because oocyte development is asynchronous in ticks once yolk uptake begins, one can find all of Balashov oocyte stages throughout the period of ovarian development. The ovarian growth phase (OGP) system referred to in this study, though clearly based on the Balashov system, includes reference to both the degree of oocyte development and the size of the ovary. The phases described here begin on the day of engorgement (Fig. 1). [OGP 1]: Ovaries are very thin and translucent white in hue. Oocytes are primarily ovoid in shape and <150 µm in length with visible nuclei. In *A. hebraeum* this phase usually corresponds to day 0-2 post-engorgement ticks. [OGP 2]: Ovaries have become significantly longer and thicker. At least some oocytes have grown to about 250 µm in length, are opaque with no visible nuclei, but have not yet taken up a significant amount of yolk. This phase is usually seen between days 2 to 5 post-engorgement in *A. hebraeum*. [OGP 3]: Considerable growth of the ovary has occurred, due primarily to oocyte

development, although oocytes at all earlier stages of development are also present. Many oocytes are now as large as 400 μm and are reddish-brown, indicating the presence of yolk granules. This phase begins at approximately day 5 post-engorgement in *A. hebraeum*. [OGP 4]: pre-ovulation; the ovary is, apart from the midgut, the largest organ in the haemocoel and is completely covered with large, yolk-filled oocytes; distinct yolk spheres are visible. In *A. hebraeum* this phase begins at approximately day 6 or 7 post-engorgement and ends at the onset of oviposition on day 10. [OGP 5: ovulation]: The ovary appears similar to that of OGP 4, except that ovulated oocytes are now visible in the lumen of the ovary and the oviducts and oviposition may have begun.

2.7 Estimating tick body weight of on-host ticks

In order to measure feeding progress following injections, tick body size was measured in ticks remaining attached to the host as follows: Using digital electronic calipers, we measured (1) the dorso-ventral thickness of the body and (2) the width of the body at its apparently widest part, approximately at the level of the posterior coxae. All measurements were recorded to the nearest 10 μm . Because ticks tend to crowd very closely together during feeding, it was impractical to record accurate measurements of body length so as to calculate body volume directly. Therefore our measure of tick size was calculated as the product of body width and dorso-ventral thickness (WxT) in mm^2 .

Body weight of attached ticks was estimated as follows: Ticks were fed to a wide range of sizes, and their width and dorso-ventral thickness recorded as just described. The ticks were then removed from the host and weighed to the nearest 0.1 mg. A standard curve was drawn plotting WxT (mm^2) vs body weight, and body weights of attached ticks during subsequent experiments were estimated from this standard curve (see Fig. 5A).

2.8 Statistical analysis

Results are reported as mean \pm SEM (n). Statistical analysis was done with Stata 10.0 software (StataCorp, College Station, Texas, USA). The distribution of the means and variance of the data was tested using the Shapiro-Wilk normality test and Levene's robust equal variance test, respectively. Differences among treatments were then analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) for parametric data distributions, or the Kruskal-Wallis test for non-parametric data distributions.

3. Results

3.1 Effect of 20E and haemolymph on mated, partially-fed off-host ticks

Ticks were removed from the host below the CW, and injected with vehicle, 20E, or 20E plus haemolymph taken from >CW ticks or from ticks at various days post-engorgement (d 2.5, 5, or 10). Because the groups treated with engorged tick haemolymph were not significantly different from each other in any of the measured parameters, the data for engorged haemolymph injected off the host were pooled for statistical analysis.

3.1.1 Effect on ovary weight and oocyte development

Injection of 20E had no significant effect (ANOVA) on ovary weight compared to ticks injected with the vehicle alone ($p > 0.05$; Fig. 2A). The ovaries from females injected with 20E plus haemolymph from engorged ticks weighed significantly more (1.31 ± 0.05 % bw; 34) than ticks injected with either vehicle (1.04 ± 0.05 ; 23; $p = 0.004$) or 20E alone (1.03 ± 0.05 ; 25; $p = 0.002$). However, the mean ovary weight in ticks injected with 20E plus haemolymph from >CW ticks (1.30 ± 0.13 % bw; 9) was not significantly different from those of the vehicle-injected or

20E-injected ticks; this in spite of the fact that it was virtually identical to that of ticks injected with haemolymph from engorged ticks.

Likewise, 20E injections had no statistically significant effect (ANOVA) on ovary Vt-content (28.9 ± 2.8 ; 13, as assessed by the spectrophotometric assay; $400\Delta 500/\text{g}$ ovary) when compared with vehicle-injected ticks (23.3 ± 1.8 ; 11; Fig. 2B). But ovaries from ticks injected with 20E plus engorged haemolymph had accumulated significantly more Vg (46.8 ± 3.3 ; 21) compared to ovaries from both the vehicle-injected ticks ($p = 0.001$) and 20E-injected ticks ($p = 0.009$). Treatment of ticks with 20E plus >CW haemolymph (35.2 ± 8.5 ; 9) had no statistically significant effect on Vt-content relative to vehicle-injected controls or 20E-injected ticks (Fig. 2B).

Injection of 45 ng 20E/100 mg bw, or 20E plus haemolymph (either from >CW or engorged ticks) caused a significant increase (Kruskal-Wallis) in oocyte size compared to vehicle-injected controls: ($97 \pm 4 \mu\text{m}$; 25 for controls, $108 \pm 7 \mu\text{m}$; 24 for 20E, $p = 0.023$, $137 \pm 14 \mu\text{m}$; 9 for 20E plus >CW haemolymph, $p = 0.00009$, and $111 \pm 3 \mu\text{m}$; 31 for 20E plus engorged haemolymph, $p = 0.025$; Fig. 2C). In addition, ticks injected with 20E plus >CW haemolymph also had significantly larger oocytes compared to ticks injected with 20E alone (Kruskal-Wallis, $p = 0.012$).

3.1.2 Effect of 20E and haemolymph on Vg-synthesis by small partially fed mated ticks.

Vg-concentration was measured in haemolymph collected 5 days following the last bolus injection (i.e., day 10 following tick removal from the host). Haemolymph Vg-concentration increased in partially fed females treated with 20E ($3.9 \pm 0.5 \text{ mg/ml}$; 21) compared to vehicle-injected ticks ($0.76 \pm 0.14 \text{ mg/ml}$; 21; Kruskal-Wallis; $p = 0.00007$; Fig. 3). Ticks injected with 20E plus haemolymph also had significantly higher haemolymph Vg-concentrations than the vehicle-injected ticks with values of 4.4 ± 0.7 ; 8 for 20E plus >CW haemolymph, and $8.9 \pm 1.0 \text{ mg/ml}$; 34 for 20E plus engorged haemolymph; $p < 0.0004$. Injection of haemolymph from engorged ticks (but not from >CW ticks) also significantly potentiated the effect of 20E alone ($p = 0.0008$).

3.1.3 Effect of 20E and haemolymph on salivary fluid secretion.

Salivary fluid secretory competence was greatly reduced (Kruskal-Wallis) in ticks treated with 20E or 20E plus haemolymph compared to vehicle-injected controls (Fig. 4, $p < 0.0004$; 18 - 51). Salivary glands from vehicle-injected ticks secreted an average of 1.34 ± 0.11 mg/gland/10 min; 43 compared to 0.46 ± 0.08 mg/gland/10 min; 18, for glands from ticks injected with 20E plus >CW haemolymph (the group which elicited the highest fluid secretory rate among all of the 20E-treated groups). The latter group also secreted fluid at a significantly higher rate than both the 20E-alone injected ticks (0.26 ± 0.04 , 50, $p = 0.026$) and the 20E plus engorged haemolymph group (0.25 ± 0.03 , 51, $p = 0.027$).

3.2 Effect of 20E injections on partially-fed virgin on-host females

3.2.1 Effects of 20E and 20E plus haemolymph on body size

Partially fed virgin females were injected with several doses of 20E, day 2 engorged haemolymph, or 20E (6 and 31 $\mu\text{g/g}$ bw) plus day 2 engorged female haemolymph, while still attached to the host (see section 2.2.2). A linear relationship was observed between tick bw and WxT (Fig. 5A). For Fig. 5B, we used the formula derived from Fig. 5A to calculate the approximate pre-injected bw of the ticks. Only the 6 μg 20E/g bw plus d2 haemolymph and the 31 μg 20E/g bw plus d2 haemolymph were significantly different from each other (466 ± 64 mg, 5; and 202 ± 50 mg, 8 respectively; ANOVA, $p = 0.038$). An increase in body weight at 6 days post-injection was observed in all treatment groups except those treated with 31 $\mu\text{g/g}$ bw 20E plus d2 engorged haemolymph, whose bw decreased from 202 ± 32 mg, 8, to 177 ± 50 mg, 8. Only ticks treated with 6 $\mu\text{g/g}$ bw 20E plus d2 engorged haemolymph (685 ± 115 mg, 5) were significantly heavier than vehicle-injected ticks (303 ± 53 mg, 16; Kruskal-Wallis, $p = 0.0061$). The 6 $\mu\text{g/g}$ bw 20E plus d2 engorged haemolymph group (685 ± 115 mg, 5) was also significantly heavier than

ticks treated with 6 µg/g bw of 20E alone (277 ± 44 mg, 12; Kruskal-Wallis, $p = 0.0064$). The highest dose (154 µg 20E/g bw) was clearly toxic. Four of the eight treated ticks had died within 6 days of injection, one of these having detached spontaneously on the 5th day, the other three remaining attached to the host until removed on the 6th day. One of the ticks detached 1 day after injection and three of them detached 4 days later. The four ticks remaining alive for 6 days were dissected; they had accumulated large amounts of guanine in the Malpighian tubules and rectal sac, and the hypodermis had fallen away from the overlying cuticle.

3.2.2 Effect of 20E and 20E plus haemolymph on ovary development

Six days after injection of 20E, the ovaries of on-host virgin ticks were not significantly heavier (ANOVA) than the vehicle-injected controls (1.25 ± 0.19 % of bw; 11, for the 31 µg/g bw dose and 0.95 ± 0.10 % of bw; 14, for vehicle-injected ticks; Fig. 6A). Only ticks injected with 6 µg/g bw 20E plus day 2 haemolymph were significantly heavier than the vehicle-injected controls (1.74 ± 0.29 % bw; 5; $p = 0.042$; Fig. 6A). However, the ticks treated with the highest dose of 20E (154 µg/g bw) had the smallest ovaries among all the treatment groups (0.80 ± 0.10 % bw; 4), which might be a reflection of the toxicity of very high doses of 20E mentioned above.

Injection of 20E did not cause a statistically significant increase in oocyte length compared to vehicle-injected controls (Fig 6B). However, ticks treated with 6 µg 20E/g bw plus d 2 haemolymph also had significantly larger oocytes (261 ± 57 µm, 5) than vehicle-injected controls (132 ± 11 µm, 15; $p = 0.041$), as well as both 6 µg 20E/g bw (131 ± 12 µm, 13; $p = 0.047$) or haemolymph alone (124 ± 24 µm, 11; $p = 0.035$; Fig. 6B).

Egg development was also scored (Table 1) according to the OGP system described in section 2.6.2. By 6 days following treatment, none of the injected ticks had begun ovulation (OGP 5). Across all treatment groups, most tick ovaries remained in OGP 1 or 2, with no apparent uptake of yolk. Only ticks from the 20E plus haemolymph groups, as well as those injected with 31 µg 20E/g bw or haemolymph alone, contained ovaries in OGP 3 (Table 1). The greatest observed growth of the ovaries occurred in the 6 µg 20E/g bw plus haemolymph group; two of the

five ticks in this group had ovaries in OGP 4, which were covered in large oocytes containing distinct yolk bodies and were brown in colour.

3.2.3 Effect of 20E and 20E plus haemolymph on haemolymph Vg-concentration

The effect of low doses of 20E on haemolymph Vg-concentration (1.33 ± 0.15 mg/ml; 18, for ticks injected with 0.6 or 6 μ g 20E/g bw; data pooled) was just marginally not statistically significant (Kruskal-Wallis) compared to the vehicle-injected control (1.02 ± 0.33 mg/ml; 15, $p = 0.058$, Fig. 7), but there was a marked increase in haemolymph Vg-concentration in those ticks injected with 31 μ g/g bw (6.0 ± 1.5 mg/ml; 10 vs 1.02 ± 0.33 mg/ml; 15; $p = 0.00014$). Although 6 μ g 20E/g bw had no significant effect on haemolymph Vg-concentration, the inclusion of haemolymph had a marked synergistic effect (8.5 ± 2.4 mg/ml; 5 for 20E plus haemolymph vs 1.10 ± 0.12 ; 13, for 20E alone, $p = 0.00094$; Fig. 7).

3.2.4 Effect of 20E and 20E plus haemolymph on ovary Vg uptake.

The Vt-content of the ovaries was measured using both the spectrophotometric assay (Fig. 8A) and the ELISA (Fig. 8B), 6 days after the last injection. As with the off-host injections, 20E did not stimulate Vg-uptake by the oocytes according to the spectrophotometric assay. However, with the ELISA method, Vt-accumulation by ovaries was significantly greater (Kruskal-Wallis) in ticks treated with d2 haemolymph (11.7 ± 3.0 μ g Vt/mg ovary, 11) or 20E plus day 2 HL (55.9 ± 25.8 μ g Vt/mg ovary, 5 for 6 μ g 20E/g bw and 24.3 ± 7.0 μ g Vt/mg ovary, 5 for 31 μ g 20E/g bw) compared to vehicle-injected control groups (5.1 ± 1.5 μ g Vt/mg ovary, 14; $p = 0.035$). Injection of 6 μ g 20E/g bw plus haemolymph caused a significant increase over 6 μ g 20E/g bw alone (4.5 ± 1.8 μ g Vt/mg ovary, 12; $p = 0.0019$). The very high SEM in the ticks injected with 6 μ g 20E plus haemolymph (Fig. 8B) arose because two of the five ticks in this group had ovaries with large brown oocytes with yolk spheres (Table 1). These ticks had ovary Vt-contents of 112 and 123 μ g Vt/mg ovary — considerably greater than those seen in any of the other groups.

3.2.5 Effect of 20E and 20E plus haemolymph on salivary fluid secretory competence

Salivary fluid uptake was measured 6 days following injection (Fig. 9). Salivary glands from ticks treated with 31 and 154 $\mu\text{g/g}$ bw (1.52 ± 0.28 mg/gland/10 min; 20 and 1.32 ± 0.49 mg/gland/10 min; 9, respectively) took up markedly less fluid (Kruskal-Wallis) than vehicle-injected controls (6.09 ± 0.53 , 15; $p = 0.000053$). Although salivary fluid uptake in ticks injected with 0.6 and 6 μg 20E/g bw (6.59 ± 0.66 mg/gland/10 min; 7, and 6.96 ± 0.90 mg/gland/10 min; 18, respectively) was similar to that of the controls, co-injection with day 2 haemolymph significantly reduced salivary fluid uptake to 3.83 ± 1.04 mg/gland/10 min; 10; $p = 0.047$). There was no statistically significant synergistic effect of haemolymph on ticks injected with 31 μg 20E/g bw compared to ticks injected with 31 μg 20E alone (0.87 ± 0.22 mg/gland/10 min; 15, vs 1.52 ± 0.28 mg/gland/10 min; 20; $p = 0.153$). Injections of haemolymph alone also caused a statistically significant reduction in salivary fluid uptake (3.68 ± 0.72 mg/gland/10 min; 21) relative to vehicle-injected controls (6.09 ± 0.53 , 15; $p = 0.035$).

4. Discussion

In this study we attempted to reconcile the difference between the results of our earlier work and those of Thompson et al. (2005). Previously we determined, in off-host *A. hebraeum*, that exogenous 20E stimulated Vg-synthesis, but not oocyte development (Lunke and Kaufman, 1993; Friesen and Kaufman, 2002, 2004). Since then, Thompson et al. (2005) demonstrated in on-host virgin *D. variabilis*, that exogenous 20E stimulates both Vg-synthesis and yolk uptake. Although here we used the method of Thompson et al. in *A. hebraeum*, we were unable to induce a marked degree of yolk-uptake, even with 20E-doses five times greater than that tested by them (Figs. 6 and 7). However, we demonstrated the efficacy of our technique inasmuch as 20E-injections did stimulate Vg-synthesis relative to vehicle-injected ticks (Fig. 7) as demonstrated previously in off-host ticks.

The evidence presented here for a haemolymph-borne VUF, though suggestive, remains tentative. Ovary weight, oocyte size and Vt-content of off-host ticks were all significantly

augmented by injection of 20E plus engorged haemolymph (Fig. 2). Likewise, oocyte growth was significantly stimulated by 20E plus >CW haemolymph (Fig. 2C), although data for the other two parameters (ovary weight and Vg-uptake) did not quite reach statistical significance. Notwithstanding these somewhat encouraging results, it must be noted that the magnitudes of the increases shown here were small relative to the results of Thompson et al. (2005), and small relative to the increases normally observed in engorged ticks at OGP 5. For example, the maximum mean haemolymph Vg-titre we observed here in off-host ticks was about 9 mg/ml in ticks treated with 20E plus engorged haemolymph (Fig. 3) and 8.5 mg/ml in on-host ticks (Fig 7). Vg-titres in normal engorged *A. hebraeum* peak at about 40 mg/ml at the time of oviposition (Friesen and Kaufman, 2002). Similarly, the maximum mean ovary weight observed here for treated ticks was 1.3% bw for off-host ticks (Fig 2A) and 1.7% bw for on-host ticks (Fig. 6), compared to about 7% bw in normal engorged ticks around the time of oviposition (Friesen and Kaufman, 2002). Finally, the degree of oocyte growth stimulated by 20E plus >CW haemolymph was also much less (97 μ m in off-host ticks and 132 μ m in on-host ticks) than that occurring normally in ovaries at OGP 5 (mean of 425 μ m; Friesen and Kaufman 2003).

Engorged haemolymph markedly increased the effect of 20E alone in stimulating Vg-synthesis in off-host ticks (Fig. 3). This effect cannot be explained by the endogenous ecdysteroid content of day 2 engorged haemolymph. Friesen and Kaufman (2002) reported the haemolymph ecdysteroid concentration to be about 50-60 ng/ml on day 2 post engorgement; consequently, injecting 10 μ l of such haemolymph into a tick would have added only about 0.5 ng 20E on top of the injected load of 45 ng per 100 mg bw.

At least one possibility to explain the rather small effect of injected haemolymph in this study is that bolus injection of haemolymph could result in any putative VUF being diluted to only a near-threshold concentration. Haemolymph volume in partially fed *A. hebraeum* constitutes about 25% bw (Kaufman et al., 1980). The partially fed females used here for off-host injections (100-220 mg) are thus estimated to have haemolymph volumes in the range of 25-55 μ l. Injection of 4 μ l or 9 μ l of haemolymph into such ticks would result in a dilution of between 3.8 – 14.8 fold. We tried to mitigate this, and the possibility that VUF is labile, by applying three bolus injections in

the off-host experiments, but this was not considered for the on-host experiments because of significant damage to the cuticle that would result.

Salivary glands from the vehicle-injected off-host ticks accumulated only 1.34 ± 0.11 mg/gland/10 min (Fig. 4), whereas those from vehicle-injected on-host ticks accumulated 6.09 ± 0.53 mg/gland/10 min (Fig. 9). The reason for this discrepancy is that fluid secretory competence was measured in the off-host ticks 10 days following removal from the host (see Section 2.2.1). Salivary glands from small partially fed ticks lose about 75% of their fluid-secretory competence when removed and kept off the host for 4 days or more (Kaufman, 1983; Harris and Kaufman, 1984). In contrast, fluid secretory competence of salivary glands from the on-host ticks was measured on the day of removal from the host (see Section 2.2.2).

In conclusion, there seems to be a real difference between *A. hebraeum* and *D. variabilis* with respect to how they control yolk uptake. In the latter, injection of 20E alone appears to be sufficient to stimulate full egg development, whereas in the former, some factor in addition to 20E is required for this process. Our data here suggest that this putative VUF should be detectable in the haemolymph of engorged ticks, although we have not yet determined optimal experimental conditions for establishing this.

Acknowledgements

Research in this laboratory is generously funded by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC) of Canada. The visit of A.S. to the University of Alberta was generously supported by a grant from the *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)* of Brazil. We are grateful to Prof. Carlos Termignoni, Centro de Biotecnologia e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul for general advice and for reviewing the manuscript. We also thank Dr. M. Belosevic, University of Alberta, for allowing us the use of his microtitre plate reader.

References:

- Balashov, Y.S., 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 8, 161-376.
- Chinzei, Y., Taylor, D., Miura, K., Ando, K., 1992. Vitellogenesis induction by synganglion factor in adult female tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Journal of the Acarological Society of Japan* 1 (1), 15-26.
- Chinzei, Y., Yano, I., 1985. Fat body is the site of vitellogenin synthesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata*. *Journal of Comparative Physiology B* 155, 671-678.
- Connat, J.-L., 1987. Aspects Endocrinologiques de la Physiologie du Developement et de la Reproduction chez les Tiques. Thèse de doctorat D'Etat (87/DIJO/5005), Dijon, France.
- Connat, J.-L., Diehl, P.-A., Gfeller, H., Morici, M., 1985. Ecdysteroids in females and eggs of the Ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development* 8, 103-116.
- Connat, J.-L., Ducommun, J., Diehl, P.-A., 1983. Juvenile hormone-like substances can induce vitellogenesis in the tick *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae). *International Journal of Invertebrate Reproduction* 6, 285-294.
- Friesen, K.J., Kaufman, W.R., 2002. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology* 48, 773-782
- Friesen, K.J., Kaufman, W.R., 2003. Cypermethrin inhibits egg development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 76, 25-35.
- Friesen, K., Kaufman, W.R., 2004. Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology* 50, 519-529.

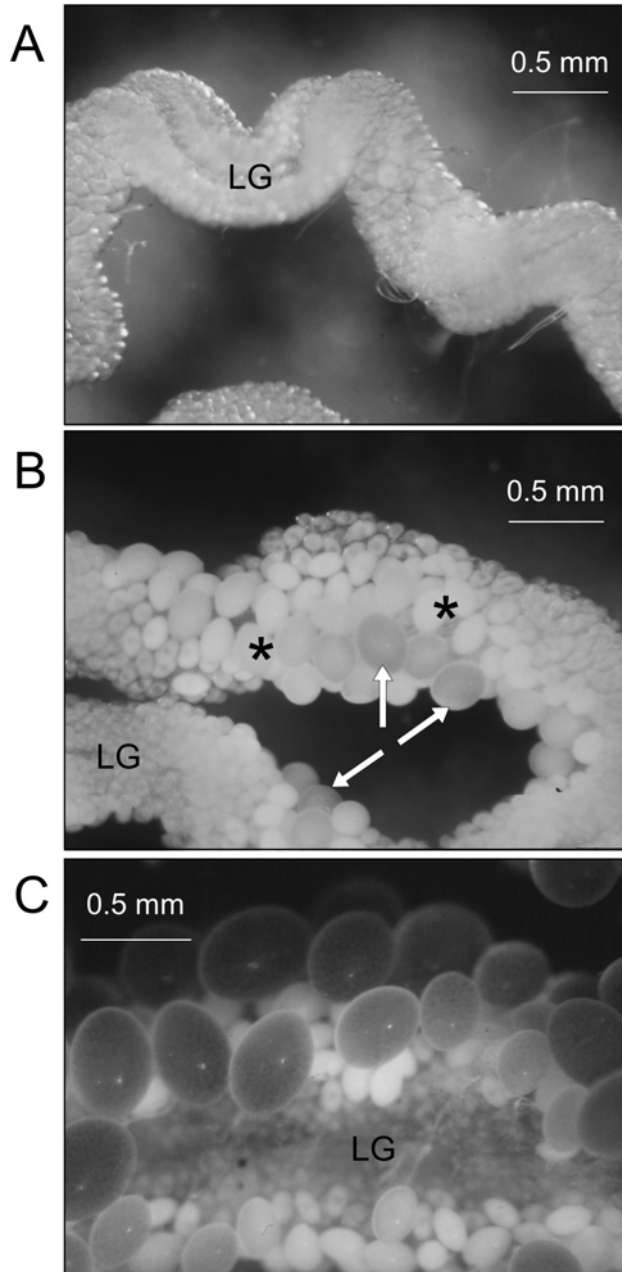
- Harris, R.A., Kaufman, W.R., 1984. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Experimental Biology* 109, 281-290.
- Harris, R.A., Kaufman, W.R., 1985. Ecdysteroids: possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 41, 740-742.
- Horigane, M., Ogihara, K., Nakajima, Y., Shinoda, T., Taylor, D., 2007. Cloning and expression of the ecdysteroid receptor during ecdysis and reproduction in females of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Insect Molecular Biology* 16, 601-612.
- James, A.M., Zhu, X.X., Oliver, J.H. Jr., 1997. Vitellogenin and ecdysteroid titers in *Ixodes scapularis* during vitellogenesis. *Journal of Parasitology* 83 (4), 559-563.
- Kaufman, W.R., 1983. The function of tick salivary glands. In: Harris, K.F. (Ed), *Current Topics in Vector Research*, Praeger Scientific, New York, pp 215-247.
- Kaufman, W.R., 1989. Tick-host interaction: a synthesis of current concepts. *Parasitology Today* 5 (2), 47-56.
- Kaufman, W.R., 1991. Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch. *Journal of Insect Physiology* 37, 95-99.
- Kaufman, W.R., Aeschlimann, A.A., Diehl, P.A., 1980. Regulation of body volume by salivation in a tick challenged with fluid loads. *American Journal of Physiology* 238, R102-R112.
- Kaufman, W.R., Lomas, L., 1996. "Male Factors" in ticks: their role in feeding and egg development. *Invertebrate Reproduction and Development* 30 (1-3), 191-198.
- Kaufman, W.R., Phillips, J.E., 1973. Ion and water balance in the ixodid tick, *Dermacentor andersoni*: I. Routes of ion and water excretion. *Journal of Experimental Biology* 58, 523-536.

- Kaufman, W.R., Ungarian, S.G., Noga, A.E., 1986. The effect of avermectins on feeding, salivary fluid secretion, and fecundity in some ixodid ticks. *Experimental and Applied Acarology* 2, 1-18.
- Lomas, L.O., Kaufman, W.R., 1999. What is the meaning of "critical weight" to female ixodid ticks?: A "grand unification theory"! In: Needham, G.R., Mitchell, R., Horn, D.J., Welbourn, W.C. (Eds.), *Acarology IX Symposia*, Vol. 2. The Ohio Biological Survey, Columbus Ohio, pp. 481-485.
- Lunke, M.D., Kaufman, W.R., 1993. Hormonal control of ovarian development in the tick *Amblyomma hebraeum* Koch (Acari: Ixodidae). *Invertebrate Reproduction and Development* 23 (1), 25-38.
- Mao, H., Kaufman, W.R., 1998. DNA binding properties of the ecdysteroid receptor in the salivary gland of the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 28 (12), 947-957.
- Mao, H., Kaufman, W.R., 1999. Profile of the ecdysteroid hormone and its receptor in the salivary gland of the adult female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 29 (1), 33-42.
- Neese, P.A., Sonenshine, D.E., Kallapur, V.L., Apperson, C.S., and Roe, R.M., 2000. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari: Argasidae). *Journal of Insect Physiology* 46, 477-490.
- Ogihara, K., Horigane, M., Nakajima, Y., Moribayashi, A., Taylor, D., 2007. Ecdysteroid hormone titer and its relationship to vitellogenesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Genetic Comparative Endocrinology* 150, 371-380.
- Pound, J.M., Oliver, Jr. J.H., 1979. Juvenile hormone: evidence of its role in the reproduction of ticks. *Science* 206, 355-357.

- Raikhel, A.S., Brown, M.R., Belles, X., 2005. Hormonal control of reproductive processes. In: Gilbert, L. I., Iatrou, K., Gill, S. S. (Eds.), *Comprehensive Molecular Insect Science*, Vol. 3. Elsevier, Boston, pp. 433-491.
- Rosell, R., Coons, L.B., 1990. Quantification of vitellogenin in the hemolymph and localization of vitellogenin in selected organs of adult female *Dermacentor variabilis*. *Advances in Invertebrate Reproduction* 5, 559-564.
- Sankhon, N., Lockey, T., Rosell, R.C., Rothschild, M., Coons, L., 1999. Effect of methoprene and 20-hydroxyecdysone on vitellogenin production in cultured fat bodies and backless explants from unfed female *Dermacentor variabilis*. *Journal of Insect Physiology* 45, 755-761.
- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*, Vol. 1, Oxford University Press, Oxford.
- Thompson, D.M., Khalil, S.M.S., Jeffers, L.A., Ananthapadmanaban, U, Sonenshine, D.E., Mitchell, R.D., Osgood, C.J., Apperson, C.S., Roe, M.R., 2005. In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Insect Physiology* 51, 1105-1116.

FIGURES AND CAPTIONS:

Fig. 1. Ovarian growth phases in *A. hebraeum*. See section 2.6.2 for the definition of each OGP. Photographs show three of the five stages. A) OGP 1; oocytes are small with visible nuclei; note the longitudinal groove (LG) which contains the least developed oocytes. B) Early OGP 3; many oocytes are opaque (asterisks) indicating the period of cytoplasmic growth seen in OGP 2, but some oocytes (arrows) have begun to accumulate Vg, apparent by the darker colour in the figure (characteristic of yolk granules). C) OGP 4; much of the ovary weight is made up of large, yolk-filled oocytes with distinct yolk spheres, but ovulation has not yet occurred; all earlier Balashov developmental stages of oocytes are still apparent.



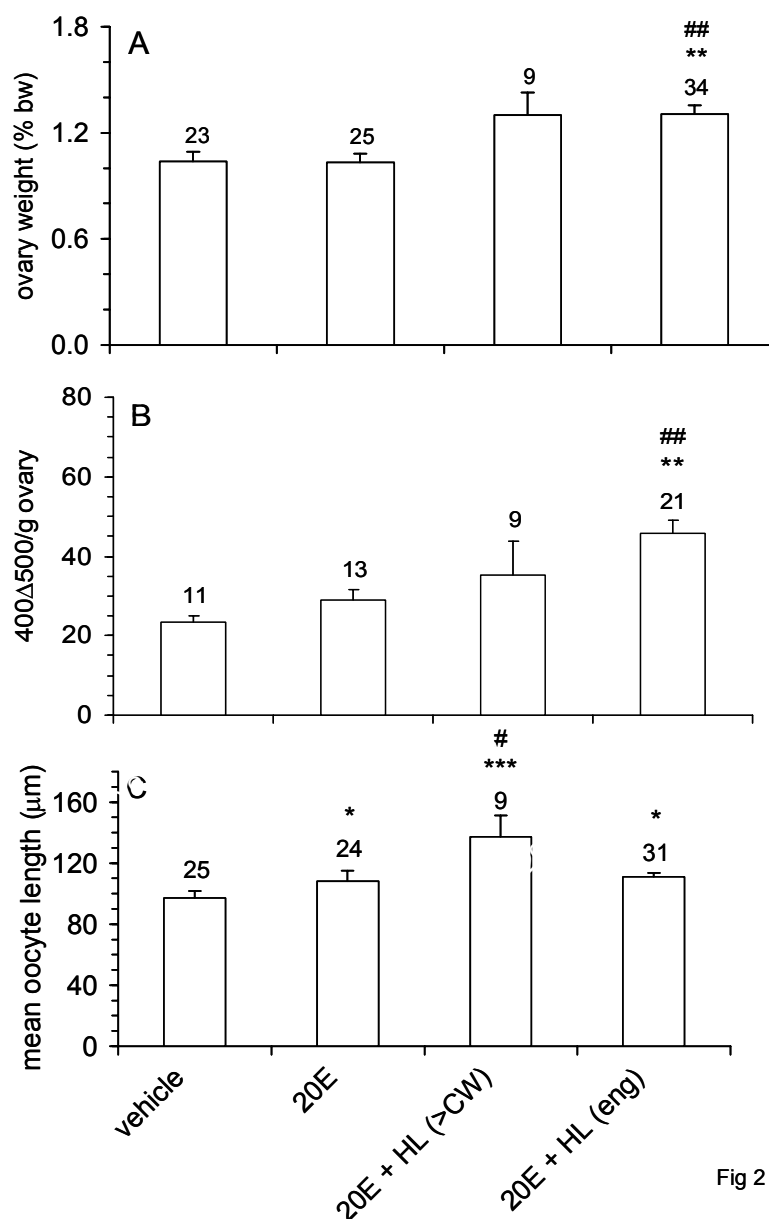


Fig 2

Fig. 2. Effect of 20E and 20E plus haemolymph on off-host partially fed ticks, 10 days post-treatment. A) ovary weight, B) Vt-content of ovary as determined by the spectrophotometric assay, C) oocyte length. Females received three injections of 20E alone (45 ng/100 mg bw; see section 2.2.1) or 20E plus haemolymph from the indicated feeding stage (>CW), engorged (d 2.5, d 5 and d 10 post-engorgement groups pooled). All data in this and subsequent figures are reported as mean \pm SEM. The number of ticks in each group is indicated above each bar. An asterisk (*) indicates significant difference from the vehicle-injected group; a number sign (#) indicates significant difference from the 20E-injected group. Single symbol represents $0.05 > p > 0.01$; double symbol represents $0.01 > p > 0.001$; triple symbol represents $p < 0.001$.

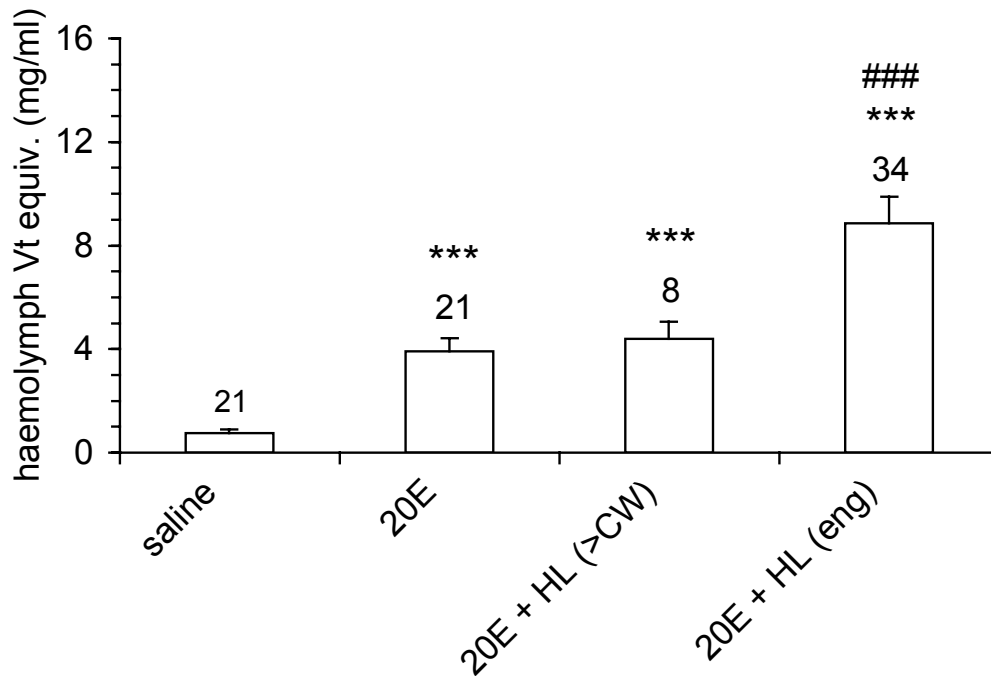


Fig. 3. Effect of 20E and 20E plus haemolymph on haemolymph Vg-concentration (measured by ELISA) in off-host partially fed ticks. 20E alone caused a marked increase in Vg-concentration compared to the vehicle ($p < 0.001$). Although the effect of 20E was not significantly enhanced by >CW haemolymph, injection of engorged tick haemolymph (data of days 2.5, 5 and 10 pooled) resulted in significantly higher Vg-concentrations than did 20E alone.

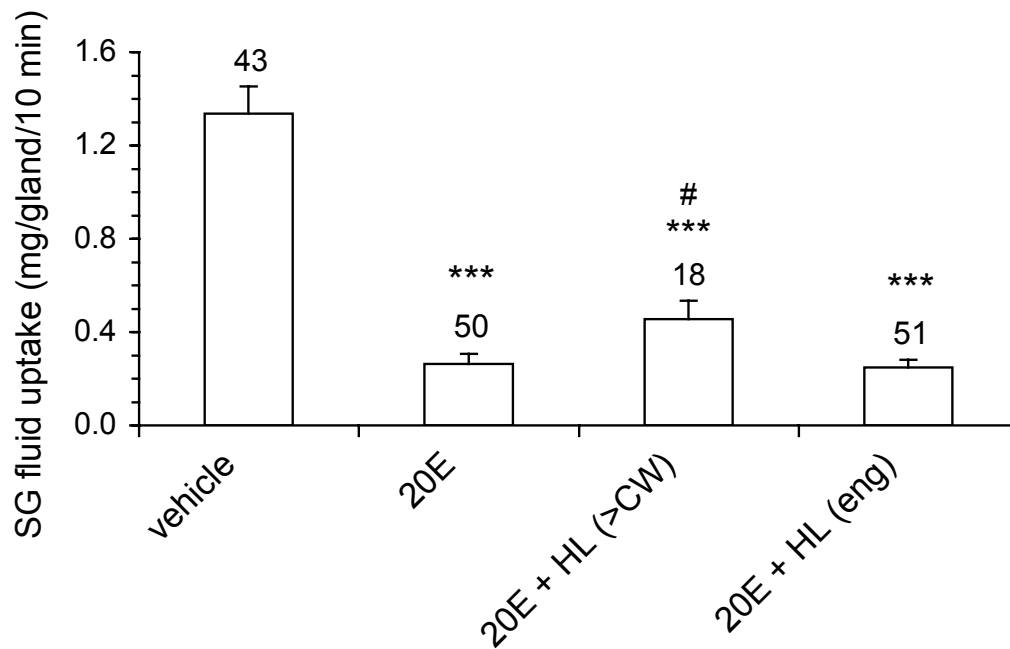


Fig. 4. Effect of 20E and 20E plus haemolymph on salivary gland (SG) fluid uptake by isolated salivary glands from off-host partially fed ticks, 10 days post-treatment. Females received three injections of 20E alone (45 ng/100 mg bw) or 20E plus haemolymph from the indicated feeding stage [>CW, engorged (days 2.5, 5 and 10 pooled)]. All treatment groups resulted in a marked inhibition of fluid secretory competence compared to the vehicle-injected controls.

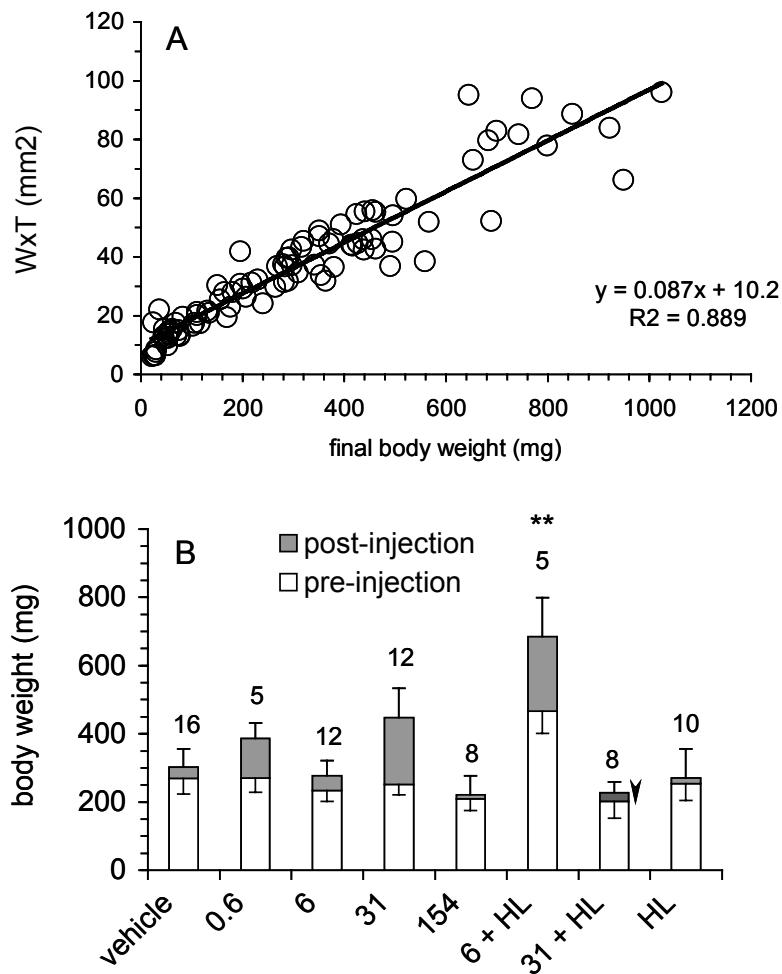


Fig. 5. Effect of 20E and haemolymph on feeding success by virgin females while still attached to the host. Ticks were treated with the indicated doses of 20E (0.6, 6, 31, or 154 $\mu\text{g/g}$ bw) or 20E plus d 2 haemolymph, or vehicle (see section 2.2.1). As indicated, some ticks were injected with d 2 haemolymph alone (HL). A) Standard curve generated using measured body weights and product of body width and dorso-ventral thickness (WxT) upon removal of the ticks from the host 6 days post-injection. The linear regression formula was calculated by Microsoft Excel software. B) Calculated pre-injection and post-injection body weights of ticks following treatment. Pre-injection weights in (B) were estimated using the standard curve shown in (A). It was not practical to mark individual ticks for this experiment, and thus not possible to rigorously control the pre-injection weights. Hatched bar with arrow indicates a weight loss from pre-injection weight to the weight recorded at tick removal.

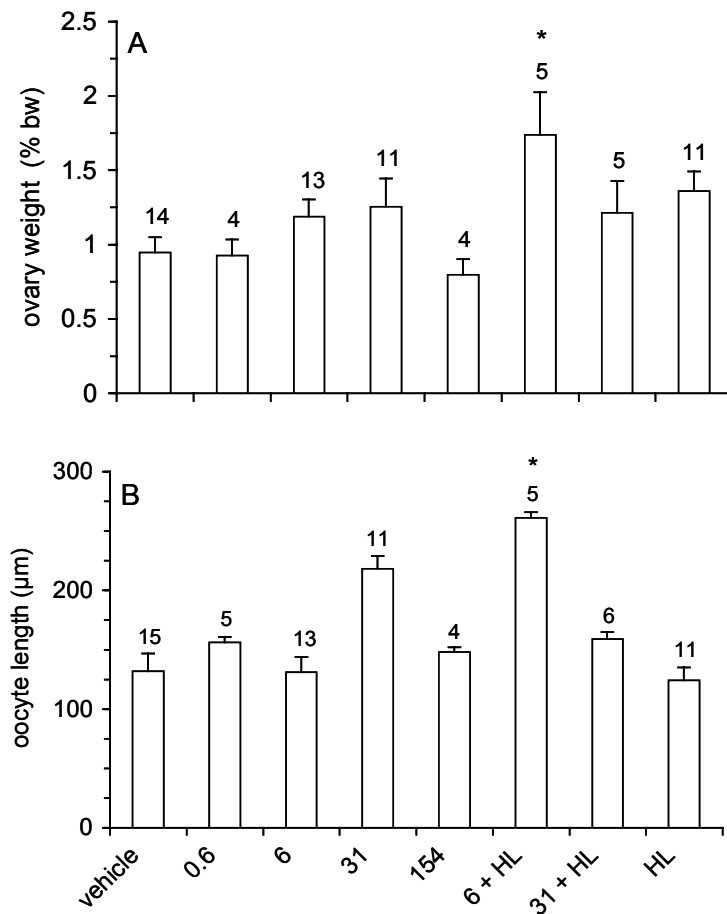


Fig. 6. Effect of 20E alone, 20E plus d 2 haemolymph, or d 2 haemolymph alone on ovarian development in on-host ticks. A) ovary weight as % body weight, B) oocyte length. Only ticks injected with 6 µg/g bw plus d 2 haemolymph had a statistically significantly greater ovary weight and oocyte length compared to the vehicle-injected group.

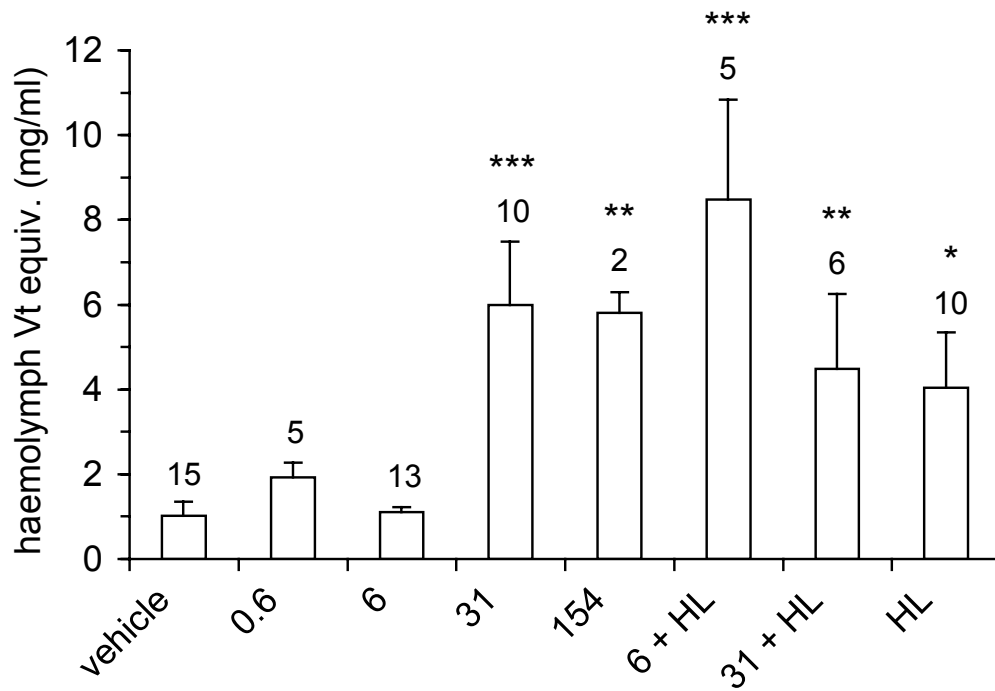


Fig. 7. Haemolymph Vg-concentration (measured by ELISA) of on-host partially fed virgin females, 6 days after the indicated treatment. Haemolymph alone and 20E at 31 μ g/g body weight with or without haemolymph caused a marked stimulation of Vg-synthesis.

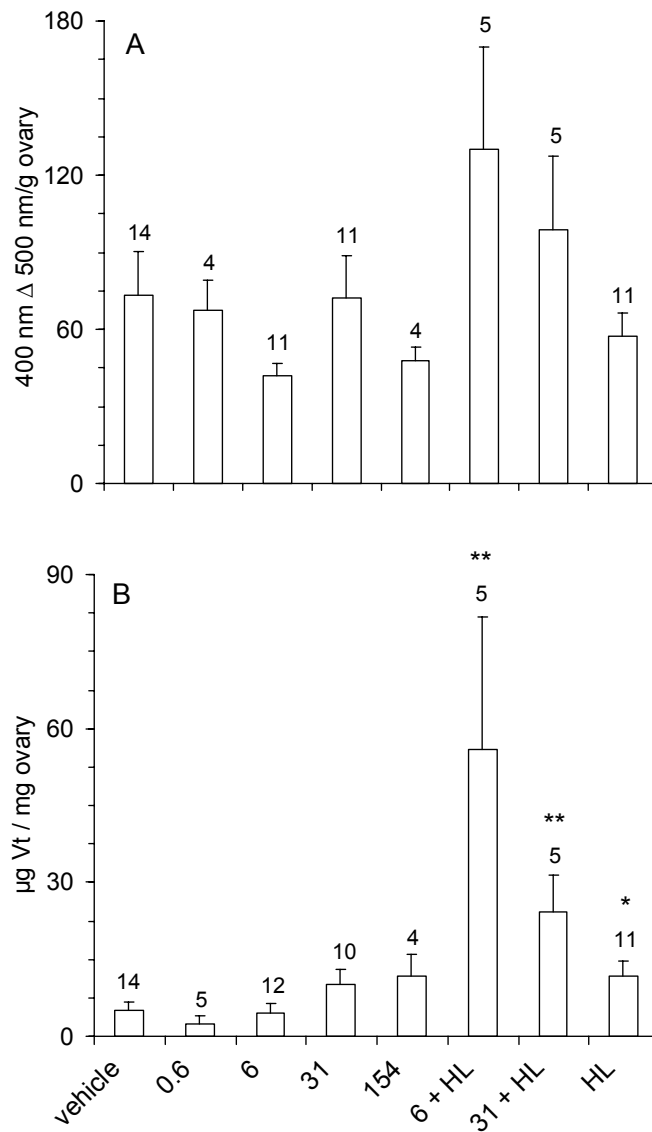


Fig. 8. Vt-content of the ovaries of on-host partially fed virgin females 6 days after treated as indicated. Vt-content was measured by (A) the spectrophotometric assay and (B) the ELISA. Although 20E alone did not significantly stimulate yolk uptake, haemolymph with or without 20E did so when measured by the ELISA.

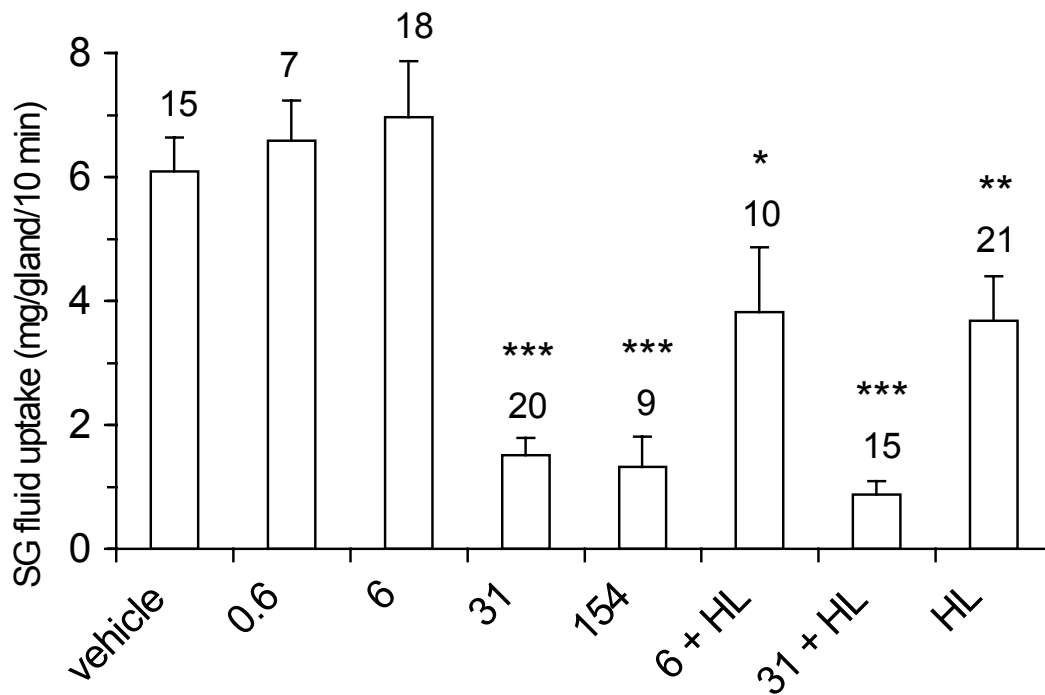


Fig. 9. Fluid secretory competence of isolated salivary glands (SG) from on-host partially fed virgin females, 6 days after the indicated treatment. Although low concentrations of 20E (0.6 and 6 μ g 20E/g bw) did not significantly reduce fluid uptake, the higher doses did with or without haemolymph.

Table 1. Oocyte development in virgin females injected while on the host with 20E or 20E plus haemolymph collected from day 2 engorged ticks.						
treatment group (n)	size of tick (WxT; mm ²) ± SEM ³	weight (mg) (see Fig. 5A) ³	Ovary Growth Phase ¹ (number ² of ticks and % at each stage)			
			1	2	3	4
Vehicle (15)	38.4 ± 5.8	303 ± 53	10 (67%)	5 (33%)	0	0
Haemolymph (12)	36.5 ± 6.2	271 ± 85	8 (67%)	2 (16.5%)	2 (16.5%)	0
20E (0.6 µg/g bw) (5)	39.3 ± 2.5	386 ± 46	2 (40%)	3 (60%)	0	0
20E (6 µg/g bw) (13)	33.6 ± 4.1	277 ± 44	7 (54%)	6 (46%)	0	0
20E (6 µg/g bw + HL) (5)	72.8 ± 9.2	685 ± 115	1 (20%)	1 (20%)	1 (20%)	2 (40%)
20E (31 µg/g bw) (11)	52.1 ± 7.8	447 ± 87	2 (18%)	6 (54%)	3 (27%)	0
20E (31 µg/g bw + HL) (7)	28.4 ± 5.5	177 ± 50	4 (57%)	1 (14%)	2 (28%)	0
20E (154 µg/g bw) (4)	32.6 ± 5.7	220 ± 56	1 (25%)	3 (75%)	0	0

¹ See Materials and Methods for definitions.

² Number of ticks. In each tick, the length of eight of the apparently largest oocytes were measured (see Materials and Methods).

³ Tick weight and size (WxT) were measured after 6 days after injections. See Materials and Methods for details.

3.2 Distribuição e estudos funcionais de uma cisteíno endopeptidase processadora de vitelina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Artigo II - Distribution and functional studies of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase

Seixas, A., Estrela, A., Ceolato, J.C., Pontes, E. G., Lara, F., Gondim, K., Termignoni, C.

International Journal for Parasitology

Trabalho realizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS e no Instituto de Bioquímica Médica de UFRJ.

Distribution and functional studies of a *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Vitellin-
Degrading Cysteine Endopeptidase

Adriana Seixas^{1*}, Andréia B. Estrela¹, Juliana C. Ceolato¹, Emerson G. Pontes², Flávio Lara^{2,3}, Katia C. Gondim², Carlos Termignoni¹.

¹ Centro de Biotecnologia e Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, Brazil.

² Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro – Rio de Janeiro, Brazil.

³ Pavilhão Hanseníase, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz – Rio de Janeiro, Brazil.

* Corresponding author: Avenida Bento Gonçalves 9500, Prédio 43431, Sala 217, Campus do Vale, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephone number: 555133086082; Fax number: 555133087309; e-mail:

adriana@cbiot.ufrgs.br

Abstract

The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a parasite of great challenges for cattle breeding in the southern hemisphere. A better understanding of essential mechanisms for its survival, such as vitellogenesis and embryo development, can help in the discovery of new antigens useful in vaccine strategies. In the present work, the cysteine endopeptidase VTDCE (Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase), previously described in *R. microplus* egg extracts was studied at the tissue and cellular levels. Soluble and insoluble fractions from egg, larva, and tissues from partially and fully engorged females were analyzed. The midgut and ovary represent the most abundant sources of enzymatic activity in partially and fully engorged females, respectively. Distribution of VTDCE during eggs, larva and adult ovary development, verified by Western blot, indicate an enzyme association with vitellin (Vt), which was confirmed by a binding assay using ^{125}I -VTDCE. VTDCE distribution in adult female midgut and ovary was confirmed by immunodetection. VTDCE inhibitory activity was found in hemolymph and saliva. Therefore, our results corroborate the hypothesis of VTDCE extraovarian synthesis and transport through hemolymph before internalization into oocytes.

Keywords: tick, VTDCE, cysteine endopeptidase, vitellin, hemolymph, cysteine endopeptidase inhibitor.

1. Introduction

The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a one host parasite that affects bovines, in tropical and subtropical regions, causing huge economical losses (Willadsen, 2006). Tick control methods are based on the application of chemical acaricides, which induce selection of drug-resistant populations, and present a potential risk of food and environmental contamination (Willadsen, 2004). Vaccines have been shown to be a feasible tick control method that offers a cost-effective, environmentally friendly alternative to chemical control. However, identifying tick-protective antigens remains a limiting step in the development of a vaccine able enough to substitute the use of chemical acaricides (de la Fuente et al., 2007). In this context, a better knowledge of tick physiological important mechanisms may be helpful in finding new vaccine targets.

The cysteine endopeptidases are a widely distributed group of enzymes, with a broad range of putative functions (McGrath, 1999, Sajid and McKerrow, 2002; Carnevali et al., 2006). Several cathepsins belong to the subclass of cysteine endopeptidases. The cathepsin-L like protease from the tick *Ornithodoros moubata* has a role in the digestion of vitellin (Vt), the major reserve protein in arthropod eggs, providing nutrients during embryogenesis (Fagotto, 1990). In the cattle tick *R. microplus*, two cysteine endopeptidases also involved in Vt hydrolysis have been studied: Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE; Seixas et al., 2003) and *Rhipicephalus microplus* Larval Cysteine Endopeptidase (RmLCE; Estrela et al., 2007). VTDCE was previously purified from *R. microplus* eggs by a purification protocol where an autolysis step to hydrolyze Vt was crucial (Seixas et al., 2003). The larval cysteine endopeptidase RmLCE

was partially purified by chromatographic procedures, and contrary to VTDC, eluted from an anionic resin free of association with Vt.

Vitellin, a polydisperse protein, is derived from a maternal protein vitellogenin (Vg), which is synthesized by the tick fat body and gut after adult females obtain their blood meal. In general, the carbohydrate, lipid and amino acid composition of tick Vg is similar to that of insect Vg, with the great exception that tick Vg contains heme from the digestion of host hemoglobin (Logullo et al., 2002). After synthesis, Vg is released into the hemolymph and internalized via receptor-mediated endocytosis by the ovary growing oocytes. It is partially processed in the endosomal compartment and then stored as Vt in specialized organelles, the yolk granules (Raikhel and Dhadialla, 1992; Fagotto, 1995; Mitchell et al., 2007).

The *R. microplus* ovary was recently characterized at the morphological, histological and ultrastructural level, and was classified as a parthenogenetic type ovary (Saito et al., 2005). In this type of ovary, nurse cells are absent and the oocytes are attached to the ovarian wall through a cellular pedicel. Balashov (1983) suggests that pedicel cells play the role of nurse cells, normally present in merogonic type ovaries, also aiding in the incorporation of material that subsequently incorporated by the oocytes. Pedicel cells present a fine layer of cytoplasm in which the presence of vacuoles is observed. The basal lamina that supports the more external cells of the ovary wall is absent at the point of contact between the oocyte and the pedicel cells and this contact membrane possesses interdigitations that increase the contact surface between these two types of cells. The vitellogenesis process in *R. microplus* occurs through endogenous production of lipids

and proteins until the oocytes reach developmental stage III, beyond which there is also incorporation of exogenous elements from the hemolymph (Saito *et al.*, 2005).

The present work sought to investigate the presence of cysteine endopeptidase activity in eggs, larvae, adult female tissues, saliva and hemolymph due its importance in Vt digestion. Also, the vitellin-degrading cysteine endopeptidase (VTDCE) was studied along tick embryogenesis, and its tissue distribution, as well as its association with Vt, were investigated.

2. Material and Methods

2.1. Ticks

Ticks from the Porto Alegre strain were reared in bovines, which were brought from a tick-free area and maintained in insulated individual boxes protected from any contact with other ticks and insects. Bovines were infested with 15 day-old (from hatching) *R. microplus* larva. Partially engorged tick females (20 days of life on the host) were forcibly removed from the host and fully engorged females (spontaneously detached from the host at the 22th day) were collected. These ticks were used for experiments or alternatively, fully engorged females were incubated at 28° C and 85% relative humidity for laying eggs. Eggs from different days after oviposition were collected and stored at -70° C until used or maintained in glass tubes closed with cotton plugs at the same conditions for larvae hatching. Larvae were separated, staged (5 or 20 days) after hatching and stored at -70°C until use.

2.2. Preparation of tissues, eggs and larvae extracts

Fully and partially engorged females were washed in 70% ethanol, immobilized with glue on Petri dishes and flooded in cold phosphate-buffered-saline [PBS; sodium phosphate (10 mM), NaCl (150 mM), pH 7.2]. The dorsal cuticle was removed using a microscalpel and the midgut, salivary glands, ovary, synganglio and fat body were dissected with forceps. Tissues were homogenized in a tube with a disposable grinder (GE Helthsciences, Uppsala, Sweden) in 300 μ l of PBS. The homogenates were centrifuged at 16000 x g / 10 min to pellet insoluble material. The supernatant constitutes the soluble proteins extract. After removing the soluble fraction, 300 μ l of PBS, containing 2.5 % deoxicolate were added and the insoluble material was again homogenized and centrifuged at 16000 x g / 10 min. This supernatant constitutes the insoluble proteins extract. Tissue extracts were stored at -20°C until use.

2.3. Collecting hemolymph and saliva

Hemolymph was collected from immobilized ticks, previously chilled for 15 min to avoid gut contractions and hemolymph contamination with blood. A small incision was made in the cuticle, and hemolymph was collected using a micropipette. Tick saliva was collected according to Horn *et al.* (2000). Briefly, adult engorged females recently detached from the host were rinsed, fixed to glass plates with adhesive tape and induced to salivate with injection of 5 μ l pilocarpine (2% w/v in PBS). Ticks were maintained in a humid chamber and saliva was collected for a period of 2 h with a small vacuum apparatus. Hemolymph and saliva were stored at -20°C until use.

2.4. Size exclusion chromatography

Samples (200 μ l) were applied onto a size exclusion column Superose 12 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) previously equilibrated in 10 mM sodium phosphate buffer pH 7.0 in FPLC System (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Fractions of 1 ml were collected and protein concentration of column eluates was monitored by absorbance at 280 nm. Column was previously calibrated in the same buffer using aprotinin (6.5 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), conalbumin (75 kDa), alcohol dehydrogenase (150 kDa), catalase (232 kDa) and ferritin (440 kDa) as standards.

2.5. Cysteine endopeptidase activity assay

Cysteine endopeptidase activity was tested according to Seixas et al. (2003). Briefly, 10 μ l-aliquots of column fractions, tissues extracts (soluble and insoluble fractions), hemolymph and saliva, or other samples, were incubated with 50 mM sodium citrate/sodium phosphate buffer pH 3.5 and 10 mM DTT at 37° C in presence or absence of cysteine endopeptidase inhibitor E-64 (10 μ M; L-trans-epoxysuccinyl-leucylamide-(4-guanido)-butane). After 10 min, a fluorogenic substrate for cathepsin L (N-Cbz-Phe-Arg-MCA; Cbz, carboxibenzoyl, MCA amido-4-methyl coumarin) was added to a final concentration of 1.4 μ M. Hydrolysis was monitored at 11-seconds intervals by fluorimetry in a M2e Microplate Reader (Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, U.S.A.). The wavelength pair for excitation and emission was 370 nm / 460 nm (Oliveira *et al.*, 1992). Enzyme activity is given by the enzyme initial velocity from kinetic measurements. One enzyme unity (U) corresponds to one relative fluorescence unit (RFU) per second.

2.6. Protein determination

Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid (BCA) method, according to Smith *et al.* (1985), using bovine serum albumin (BSA) as standard.

2.7. Polyclonal antibodies against VTDCE

Anti-VTDCE antiserum was obtained as described by Seixas *et al.* (2008; in press). Briefly, rabbit was inoculated subcutaneously with 100 µg of purified VTDCE emulsified in Freund's complete adjuvant followed of three boosters of VTDCE (100 µg) in Freund's incomplete adjuvant with an interval of 15 days between each dose.

2.8. Immunoblotting

Extracts were separated by SDS-PAGE using a Bio-Rad Mini-Protean Cell II unit. Resolving and stacking gels were 12.5 and 5% polyacrylamide, respectively. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 µm, Schleicher & Schuell, Germany) in a semi-dry system (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) using 25 mM Tris, 192 mM aminoacetic acid, 30% methanol, pH 8.4. Nitrocellulose sheets were blocked with blotto [5% cow non-fat dry milk in sodium phosphate (10 mM), NaCl (150 mM), pH 7.2] and probed with rabbit polyclonal antibodies against VTDCE (1:100). After 3 washes with blotto, anti-rabbit IgG alkaline phosphatase conjugate was used as secondary antibody. Development was performed with NBT/BCIP (nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt; USB Corporation, Cleveland, USA). Dot blot was performed in the same conditions. Monoclonal antibodies anti-VT was kindly supplied by Sandra E. Farias, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil.

2.9. Transmission Electron Microscopy immunohistochemistry

Fully engorged tick's ovaries were dissected as described in section 2.2. and fixed at 4° C during 12 h in 0.25% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 10 mM calcium chloride, 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.3. After that, the material was dehydrated in an ascending series of ethanol concentration, and embedded in LR-White resin (Electron Microscopy Sciences, Hatfield, PA) at 4° C. Ultrathin sections (70 nm) were caught in formvar cover cooper grids, blocked by incubation with blotto for 15 min, and then incubated with antiserum (anti-VTDCE) in the same buffer for 1h. Anti-rabbit IgG conjugated to 10 nm colloidal gold was used as secondary antibody. Finally, the grids were stained with saturated uranyl acetate and lead citrate (Glauert, 1974), and observed through a transmission electron microscope 900 Zeiss (Zeiss, Oberkochen, Germany) at 80 kV.

2.10. Immunofluorescence

Fully engorged females were dissected at third day after blood meal. Tissues were fixed as described above, embedded with PBS-sucrose 20% during 12hs / 4⁰C, O.C.T. polymer (TissueTek, Minnesota, USA) during 2hs and then frozen in liquid nitrogen. Thin sections of 5 µm were cut, exposed to rabbit polyclonal antibody anti-VTDCE (1:100) or pre-immune serum and then to a goat anti-rabbit antibody conjugated to fluorescein (1:500) (DAKO, Glostrup, Denmark). Samples were visualized under an Axioplan 2 fluorescence microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany).

2.11. Binding assay

Purified VTDCE (260 µg) was iodinated with ¹²⁵I-sodium iodide (17.4 Ci/mg, GE Healthcare, UK) using Iodo-gen (Pierce, Rockford, USA) as described elsewhere (Gondim and Wells, 2000). To remove the free iodide, the reaction mixture was extensively dialyzed against PBS, pH 7.4. Obtained ¹²⁵I-VTDCE specific activity was around 150,000 cpm/µg of protein. For binding assay, 20 µg of pure vitellin or BSA (as a control) were fixed in pieces of nitrocellulose membrane which were placed into the wells of a 96-well plate. The membranes were blocked with BSA (25 mg/ml), washed 2 times with PBS, incubated with 1 µg of ¹²⁵I-VTDCE in 100 µl of BSA 2.5 mg/ml in PBS for 2 h in presence or not of leupeptin and then washed several times with the same buffer. Assays were done in triplicates. Radioactivity associated with the filters was determined in a γ-counter. Radioactivity in control membranes was subtracted from values of experimental membranes, containing vitellin. Results were expressed as means ± S.D. Comparisons among groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's multiple comparison test. Significance level was 0.05, and *p*-values are indicated in figure legend.

3. Results

3.1. Cysteine endopeptidase activity in R. microplus female tissues, saliva and hemolymph

Cysteine endopeptidase activity was present in soluble and insoluble fractions of fat body, midgut, ovary and salivary glands from partially and fully engorged females (table 1). In partially engorged females, the midgut was the richest source of enzyme (921

U / mg tissue), followed by the ovary (18.6 U / mg tissue). In contrast, after full engorgement cysteine endopeptidase activity was higher in ovary (1180 U / mg tissue), followed by fat body (29.5 U / mg tissue), been lower in midgut (2.7 U / mg tissue). Salivary gland presented an activity of 6 U / mg tissue, in partially engorged females, and 22.6 U / mg of tissue in fully engorged females. In all tissues, most activity was found in soluble fraction (Table 1). Significantly, all activity was E-64 inhibited (data not shown), confirming that all endopeptidase activity detected, under our assay conditions, is due to cysteine endopeptidases.

Cysteine endopeptidase activity was also detected in hemolymph of partially and fully engorged *R. microplus* females (Table 1). In partially engorged females this activity was 278 ± 12 U / ml increasing to 589 ± 73 U / ml at the first day after full engorgement (host detachment day; Table 1). During the days preceding the beginning of oviposition, the activity in hemolymph gradually decreased (310 ± 24 U / ml at the second day and 250 ± 10 U / ml at third day post detachment; Table 1). Variation in total hemolymph protein content was also observed. Protein content in partially engorged female hemolymph was 7.97 ± 0.05 mg / ml, increasing to 10.93 ± 0.08 mg / ml in fully engorged females at the first day post detachment. At the second day post detachment, the high protein level was achieved ($31.03 \pm$ mg / ml), remaining almost constant until the third day (29.76 mg / ml). In contrast to all other samples tested, no activity was detected in saliva (Table 1).

3.2. Enzymatic and protein profiles

Gel filtration analysis was used to obtain protein and enzymatic profiles of soluble and insoluble tissue fractions of partially and fully engorged *R. microplus* females, as described in *Material and Methods* section.

3.2.1. Soluble fraction of partially engorged female tissues

Figure 1 shows the gel filtration profile of soluble protein extracted from partially engorged female fat body, midgut, ovary and salivary gland. Protein patterns differ according to the tissue analyzed but there is a major common peak (in 9 ml) in midgut, ovary and salivary gland extracts, cysteine endopeptidase patterns were more consistent. In fat body, salivary gland and ovary, cysteine endopeptidase activity eluted at ca. 11 ml and in midgut at 13.5 ml. In ovary, separation of two peaks of enzymatic activity is evident (10.5 and 11.5 ml; Figure 1D).

3.2.2. Insoluble fraction of partially engorged female tissues

Gel filtration analysis of insoluble proteins extracted from tissues by deoxycholate shows only one major peak of protein in 7.5-8.5 ml, contrary to the soluble fractions where protein distributed in several peaks. However, the enzymatic activity eluted later than the major protein peak in all tissues (Figure 2). Ovary activity eluted at 11.5 ml. In fat body and midgut extracts two peaks of enzymatic activity eluted at 9.5 and 11.5 ml (Figure 2, A and B). After gel filtration fractioning, no activity was detected in salivary gland. As the initial activity in this preparation was low (0.07 U/mg tissue) it is possible that upon chromatography it became too diluted to be detected (Figure 2C).

3.2.3. Soluble fraction of fully engorged female tissues

The protein profiles from fully engorged female tissues (Figure 3) were similar to those observed for partially engorged female soluble fraction (Figure 1). Major differences were observed between the midgut (Figure 3B) and ovary (Figure 3D) protein profiles. In midgut, three major groups of proteins eluted at 9, 11 and 16 ml. Only the first peak co-elutes with one from the earlier lifestage (partially engorged), the other two peaks being characteristic of the fully engorged female tissue (Figs. 3B and 2B). Fully engorged female ovary proteins that eluted between 14 and 18 ml (Figure 1D) almost disappear in the partially engorged female (Figure 3D). The fully engorged midgut cysteine endopeptidase activity elutes in two distinct peaks, one at the same volume observed in partially engorged female (13.5 ml) and a new peak eluting at 11.5 ml suggesting stage specific changes (Figure 3B). In fully engorged female ovaries, in addition to the same peak observed in partially engorged females (eluting in 10.5 ml), two new small peaks of activity appear, eluting at 18.5 and 24.5 ml (Figure 3D).

3.2.4. Insoluble fraction of fully engorged female tissues

Fully engorged female insoluble fraction protein profile (Figure 4) presents the same pattern as observed in partially engorged females (Figure 2). However, a few differences are observed in the enzymatic activity profile. The low activity peak eluting at 10.5 ml (Figure 2A) and the shoulder (Figure 2B) observed in chromatographic profiles of partially engorged female fat bodies and midgut, respectively, are not detected in the corresponding tissues of fully engorged females (Figure 4A and B). In contrast, the fully engorged female ovary presents a shoulder at 9.5 ml (Figure 4D). Contrary to the salivary

gland insoluble fraction of partially engorged female, the insoluble fraction from fully engorged female (Figure 4C) presents two peaks of activity (9.5 and 11.5 ml). It is important to observe that the insoluble fraction of the fully engorged female salivary gland has a higher cysteine endopeptidase activity (1.61 U / mg tissue) than the earlier stage (0.7 U / mg tissue) (Table 1).

3.3. Enzymatic activity profile in egg and larva

Egg cysteine endopeptidase elutes from gel filtration chromatography as a single major peak (at 9.5 ml) and a minor peak detectable in a single fraction at 12.5 ml (Figure 5A). Larval cysteine endopeptidase activity also elutes at one major and one minor peak but the major peak elutes at 12.5 ml and the minor at 9.5 ml (Figure 5B). Therefore, changes in enzymatic profile according to lifestage are observed again.

Gel filtration analysis of egg and larval extracts showed Vt eluting at the major peak of protein (9.5 ml; Figure 5). Although, in larva, Vt seems to be degraded and other proteins of lower molecular weight, or Vt fragments, are detected. Here, Vt identification was done based (i) on the tick Vt property of containing haem (Sonenshine, 1991) which confers to the sample a brownish color; (ii) by similarity with the standard of purified Vt (Figure 5C) and (iii) by qualitative dot-blot using anti-Vt antibodies .

3.4. VTDCE and Vt immunodetection

In order to verify if VTDCE is responsible by the cysteine endopeptidase activity detected at the different female tissues, gel filtration active fractions were probed by dot-blot using anti-VTDCE polyclonal serum. VTDCE was detected in all fractions tested

(data not shown). Moreover, Vt was also recognized in the same fractions (data not show).

3.5. VTDCE and Vt presence during tick development

VTDCE and Vt distribution over tick development were investigated by Western blot (Figure 6). The presence of VTDCE was verified (i) in ovaries of females recently detached from the host (Figure 6B, ovary 1); (ii) in ovaries of 3 days-post-detachment females (Figure 6B, ovary 3), (iii) during the embryonic development (1 day-egg , 3 days-egg, 7 days-egg, 12 days-egg, 20 days-egg); (iv) in young larvae (5 days-larvae), and (v) in old unfed larvae (20 days-larvae). In addition to the enzyme (arrow), proteins of high molecular weight were also recognized by anti-VTDCE (Figure 6B); suggesting VTDCE binds to several of the Vt different polypeptides.

Analysis with anti-Vt, showed that Vt is also present in all samples tested: ovaries, eggs of different days, in young and old larvae (data not shown). The high molecular weight proteins recognized by anti-VTDCE, prepared from a checked pure VTDCE preparation, are also recognized by anti-Vt, indicating association between VTDCE and Vt. So, this protein interaction was further investigated.

3.6. VTDCE-Vt association

The VTDCE capacity to bind Vt was verified using ¹²⁵I-VTDCE and membrane-fixed Vt in a radio-binding assay. Figure 7 shows that VTDCE binds to Vt in a dose- dependent manner (Figure 7A). The enzyme was able to bind Vt also in the presence of leupeptin (a cysteine endopeptidase inhibitor) (Figure 7B). This association was shown to be specific

since the binding to immobilized Vt was reduced by addition of an excess of soluble Vt (in the presence or absence of leupeptin; Figure 7B).

3.7. *VTDCE localization in fully engorged female midgut and ovary*

Immunofluorescence analysis of *R. microplus* female midgut sections showed VTDCE presence in basophilic cells (asterisk). The basal lamina showed a higher intensity of labeling (Figure 8, panel I). In the ovary, labeling was observed in the pedicel cells (PC), oocyte cytosol (Figure 8 panel II A, B and C), chorion (CO; Figure 8 panel II A), and basal lamina (Figure 8 panel II B and C). The region close to the germinal vesicle (gv) was also labeled (Figure 8 panel II A). No labeling was observed in yolk granules (asterisks) and at controls with non-immune serum (Fig 8 panel I, D and Figure 8 panel II, D)

Using gold-immunocytochemistry in electron microscopy, it is clear that, in *R. microplus* ovary, VTDCE is located in typical material-exchanging areas (Figure 9). The enzyme was immunolocalized at the membrane of vesicles present in the pedicel cells, which appear highly decorated with gold particles (Figure 9 A), and in the ovary basal region in close contact with haemocoel (Figure 9 B).

3.8. *A possible endogenous VTDCE inhibitor*

Surprisingly, a 90-fold increase in hemolymph cysteine endopeptidase activity was observed after gel filtration fractionation (Table 2 and Figure 10 A). This finding suggests that tick hemolymph contains a cysteine endopeptidase inhibitor. The presence of an inhibitor was investigated by incubating 10 µl of each gel filtration fraction with

purified egg VTDCe, before addition of substrate. An inhibitor activity eluted at 13 to 15 ml (Figure 10 A). These pooled fractions (Mw between 34 and 11 kDa) inhibited VTDCe in a dose dependent manner (Figure 10 B). Also, after incubating saliva (1 μ l) with purified egg VTDCe (3 μ g), an inhibition of 80% was observed (Data not shown).

4. Discussion

Previous studies showed the presence of an acidic peptidase activity in *R. microplus* ovaries, eggs and larva (Seixas *et al.*, 2003; Estrela *et al.*, 2007). The egg peptidase (vitellin degrading cysteine-endopeptidase; VTDCe) was purified and characterized as a cathepsin-L-like enzyme, active at acidic pH and totally inhibited by E-64 (Seixas *et al.*, 2003). Here, we present the distribution of VTDCe in tissues of the cattle tick *R. microplus* female as well as some functional studies.

Data showed that cysteine endopeptidase activity is widely distributed in the tick *R. microplus*, being present in soluble and insoluble forms of partially and fully engorged female fat body, ovary, midgut, salivary glands and hemolymph. Tissues differ in stage-specific protein patterns. Although, the enzymatic profile has constant characteristics in all tissues: i) a cysteine endopeptidase activity peak eluting in 11.5 ml (soluble and / or insoluble fraction; Figures 1, 2, 3 and 4); ii) an activity peak eluting in 9.5 ml, which is characteristic of the insoluble fraction (Figures 2 and 4). Peculiar profiles were observed in egg and larva. Most egg peptidase activity elutes in a peak at 9.5 ml (244 kDa) followed by a small activity peak eluting at 12.5 ml (\cong 45 kDa; Figure 5). In larva, on the other hand this 9.5 ml activity peak is reduced and most cysteine endopeptidase activity elutes at 12.5 ml (Figure 5B), evidencing stage specific changes. Active egg extract

fractions reacted positively with anti-VTDCE antibodies and co-eluted with Vt. In this context, variations in VTDCE gel filtration elution profile can be correlated with its association with multiple Vt subunits. A Vt-VTDCE association was already suggested (Seixas *et al.*, 2003), and is well observed in western blot analysis localizing VTDCE in ovary, eggs and larvae (Figure 6). During all embryogenesis, VTDCE is observed in two forms: a low molecular weight form corresponding to a free enzyme, and as high molecular weight forms, which are also recognized by anti-Vt antibodies and correspond to the VTDCE associated with different Vt subunits and/or Vt partial digestion products. This kind of association altering the apparent Mw was described for other arthropod enzymes and could be related to Vt-degradation control (Giorgi *et al.*, 1999).

The VTDCE purification protocol includes an autolysis step in acidic pH in which Vt is hydrolyzed by VTDCE and precipitates while the enzyme stays soluble (Seixas *et al.*, 2003). Actually, it is difficult to establish unambiguously the Mw of pure VTDCE. Earlier studies described the presence of a 22 and a 17 kDa protein (Seixas *et al.*, 2003). However, these characteristics may change as result of further protein processing during autolysis, and only one subunit, with molecular weight around 17 kDa remains, suggesting that the 22 kDa protein corresponded to a distinct processing stage. Indeed, difficulties in isolation, purification and characterization of cathepsin-L, due to autolysis, are frequently observed in final purifications steps (Cristofolletti *et al.*, 2005). In the case of VTDCE this problem is accentuated, since autolysis is an essential step in the purification, and the enzyme must subsequently be maintained in acid conditions to avoid eventual inactivation.

Experiments using ^{125}I -radiolabeled VTDCE confirm its association with Vt. In fact, results show that purified VTDCE is able to associate with Vt in a dose-dependent manner (Figure 7A). Since Vt is a substrate for VTDCE, it was interesting to note that this association also occurs in the presence of a cysteine endopeptidase inhibitor (leupeptin). This result suggests that VTDCE binding to Vt involves a site different from the active site. Therefore, the question is how protease and Vg/Vt can coexist and yet premature Vg/Vt polypeptide cleavage be avoided during vitellogenesis. Association between Vg and a cysteine endopeptidase was described in *Blatella germanica* (Yin et al, 2001). In this cockroach, the enzyme colocalizes with Vg in compound granules at the fat body, suggesting that the enzyme and Vt are secreted from this tissue together to be transported through hemolymph and incorporated into the oocytes. Our immunolocalization of VTDCE to virtually all ovary tissue and pedicel cell basal membranes corroborates the idea that the ovary takes up VTDCE from the haemocoel and stores it in the cytosol.

Some considerations are in order to aid in understanding the significance of the Vg-VTDCE relationship. First, Vg may act as a potential inhibitor, maintaining the enzyme as a zymogen throughout vitellogenesis (Kucera and Turner 1981, Yin et al., 2001). Second, enzyme activation may be delayed until pro-protease and Vg are fully dissociated from each other upon acidification of the yolk granules (Nordin *et al.*, 1990). Lastly, a physiological inhibitor may be part of this complex acting to control enzymatic activity (Kucera and Turner 1981). It is also important to consider that enzyme copackaging with Vg/Vt responds to the requirements of a general reproductive strategy, whereby the developing embryo is provided with a reserve of metabolites and an

associated enzyme able eventually to make the metabolites available (Fagotto, 1990; Giorgi *et al.*, 1999).

Enzyme cellular distribution studies help to clarify VTDCE biological functions. In midgut, the enzyme is present in the basophilic cells and at higher levels in the basal lamina. Gut basophilic cells in female ticks are derived from the basal remnants of type 2 secretory cells (Agbede & Kemp, 1987). The cytoplasm of these cells is filled with well organized rough endoplasmic reticula, Golgi complexes and secretory granules evidencing their synthetic capacity. Moreover, the contact of this cell with the underlying hemolymph is extended by infoldings of a basal labyrinth, which facilitates material exchange. During the final rapid phase of engorgement, basophilic cells seems to assume an active role in water transport across the gut wall, but subsequent to this phase, its rough endoplasmic reticulum cisternae are reorganized and resume a secretory role. After the fat body, the midgut epithelium is the second source of Vt synthesis in ticks (Coons *et al.*, 1982). Another enzyme involved in Vt digestion in eggs, the *Boophilus* aspartic pro-cathepsin (BYC), is also synthesized in gut and fat body cells (Logullo *et al.*, 1998). Thus, the distribution profile of VTDCE in midgut suggests it can have the same synthesis site as Vt and BYC, and is also secreted into hemolymph to be transported to ovary. The stronger signal in basal lamina, compared to basophilic cells, makes sense considering that analysis was done at the third day post-detachment, the stage of protein export.

In the ovary, VTDCE is located in the basal region and in the membranes of vesicles present in the ovarian pedicel cells. Pedicel is a structure resulting from the proliferation of the ovary wall epithelial cells, which attach the oocytes to the ovary (Till,

1961; Ricardo *et al.*, 2007). The *R. microplus* ovary is devoid of nurse cells, a characteristic of panoistic-type ovaries (Saito *et al.*, 2005). Thus, pedicel cells act producing and/or incorporating proteins from the hemolymph, which will then be transported to the oocytes. In *Amblyomma triste*, proteins are accumulated at the regions of contact among pedicel cells and at the pedicel cells/oocytes interface, showing that protein exchange among these cells in fact occurs (Ricardo *et al.*, 2007). Therefore, the pedicel participates as an active structure that supplies yolk components for oocytes in the tick *A. triste*. In oocytes, VTDCE is located at the basal lamina/chorium, in the cytoplasm and close to the germinal vesicle. No labeling was observed in the yolk granule similar to the *Aedes aegypti* yolk-degrading cysteine endopeptidase (Vitellin cathepsin B; VCB), which is present in a narrow layer between yolk and yolk body membrane in developing oocytes (Cho, *et al.* 1999). Therefore, immunolocalization results together with the presence of VTDCE in the hemolymph and other tissues, such as gut and fat body, indicate VTDCE has an extra-ovarian origin, and it is internalized into the oocytes through the pedicel cells. However, a concomitant ovarian synthesis can not be discarded.

As mentioned above, cysteine endopeptidase is present in female hemolymph and it reacts with anti-VTDCE antiserum. This activity was found in partially and in fully engorged females, at the first day post-detachment up to the third day, when oviposition starts. The highest activity occurs in recently detached fully engorged female hemolymph. Interestingly, cysteine endopeptidase activity decreases gradually in the two-day period before oviposition onset. The high activity in fully engorged female hemolymph at the first day after detachment can result from active synthesis by tissues

such the gut, which secretes the enzyme into hemolymph. In addition, the activity decrease in the following days can result from enzyme uptake by the ovary.

The hemolymph cysteine endopeptidase activity increases almost one hundred times after gel filtration chromatography, indicating the presence of a cysteine endopeptidase inhibitor. The existence of such inhibitor was confirmed by inhibition of cysteine endopeptidase activity by whole hemolymph, as well as fractions eluted in gel filtration. A partially purified inhibitor preparation (pooled gel-filtration fractions) inhibits egg-VTDCE in a dose-dependent manner. This inhibitor would prevent premature degradation of Vt during transport by hemolymph, as well as in oocytes. It was suggested that the latency of yolk granules is reinforced by other regulatory mechanisms (Fagotto, 1995). Actually, VTDCE and most lysosomal enzymes are active under mild acidic conditions and display residual activity even at pHs close to the neutrality, while digestion of Vt polypeptides only occurs at quite low pHs. Thus, controlling the luminal pH alone is probably not sufficient to prevent all premature yolk granule proteolysis during the long period of oogenesis (Fagotto, 1995). Indeed, a cystatin, Bmcystatin, was cloned from an *R. microplus* fat body cDNA library and the recombinant protein inhibited VTDCE (Lima et al., 2006). VTDCE inhibitory activity showed here eluted from gel filtration with a molecular mass between 34 kDa and 11 kDa, and the recombinant Bmcystatin presented a molecular mass of 11 kDa. It is possible that the cysteine endopeptidase inhibitory activity found in *R. microplus* hemolymph is the same Bmcystatin.

Cysteine endopeptidase activity was not detected in saliva, possibly because cysteine endopeptidase inhibitors hampered activity detection. Peptidase inhibitors

present in tick saliva are well known, and in *R. microplus* saliva two thrombin inhibitors were reported (Horn *et al.*, 2000; Ciprandi *et al.*, 2006). As a salivary cystatin had not yet been unequivocally demonstrated in *R. microplus*, assays were developed to evaluate this possibility. In fact, a dose-dependent inhibition of pure egg-VTDCE activity by crude *R. microplus* saliva was observed. Accordingly, salivary cystatins are described in other tick species playing a role in blood ingestion (Karim *et al.*, 2005; Kotsyfakis, 2006; Grunclova *et al.*, 2006; Zhou *et al.*, 2006; Kotsyfakis *et al.*, 2007). Besides this role of cystatins in haematophagy, the new data showing the presence of an active cysteine endopeptidase inhibitor in *R. microplus* hemolymph is the first functional study relating a cysteine endopeptidase inhibitor with control of vitellogenesis.

In conclusion, VTDCE is a vitellin-associated enzyme, present in *R. microplus* eggs, larvae, partially and fully engorged females with a clear role in embryogenesis. It is also suggested that VTDCE is a maternally derived endopeptidase involved in a route including extra-ovarian synthesis, transport, and ovary uptake, before internalization by tick oocytes. Moreover, as VTDCE is the most active of all vitellin-degrading enzymes so far described in *R. microplus* eggs (Seixas *et al.*, 2008 submitted) the strict regulation of its activity seems to have a key role in the control of yolk mobilization, ensuring nutrients providing at the right time to the developing embryo. Clearly, studies relating the activities of enzymes and inhibitors upon natural substrates and targets are essential to understand the physiological processes to which they are related, and they will validate bulk genomic data currently being generated.

Acknowledgments

We thank Dr. Ulysses Lins (Instituto de Microbiologia, UFRJ) for the use of the fluorescence microscope and Dr. Wanderley de Souza (Instituto de Biofísica, UFRJ) for the use of the transmission electron microscope. We are very grateful to Prof. Joseph C. Polacco for general advice and for reviewing the manuscript. This work was supported by grants from CNPq, FINEP, PRONEX, CAPES and FAPERGS.

References

- Agbede, R.I. & Kemp, D.H., 1987. *Boophilus microplus* (ixodid tick): fine structure of the midgut basophilic cell in relation to water and ion transport. *Exp. Appl. Acarol.* 3, 233-242.
- Balashov, Y.S., 1983. An atlas of ixodid tick ultrastructure: the female reproductive system. *Entomol. Soc. Am. Russ.*, 98–128.
- Carnevali, O., Cionna, C., Tosti, L., Lubzens, E., Maradonna, F., 2006. Role of cathepsins in ovarian follicle growth and maturation. *Gen. Comp. Endocrinol.* 146, 195–203.
- 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. *J. Biol. Chem.* 19, 13311–13321.
- Ciprandi, A., de Oliveira, S.K., Masuda, A., Horn, F., & Termignoni, C., 2006. *Boophilus microplus*: Its saliva contains microphilin, a small thrombin inhibitor. *Exp. Parasitol.*

- Coons, L.B., Tarnowski, B., Ourth, D.D., 1982. *Rhipicephalus sanguinius*: localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Exp. Parasitol.* 54, 331-339.
- Cristofolletti, P.T., Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midmidgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 35, 883-901.
- de la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., De la Lastra, J.M.P, Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Res. Rev.* 8, 23-28.
- Estrela, A., Seixas, A., Termignoni, C., 2007. A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comp Biochem. Physiol Part B* 148, 410 – 416.
- Fagotto, F., 1990. Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L- like acid proteinase in yolk spheres. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 14, 217-235.
- Fagotto, F., 1995. Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J. Cell Sci.* 108, 3645-3647.
- Giorgi F., Bradley J.T., Nordin, 1999. Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* 30, 579-596.

- Glauert, A.M., 1974. The right voltage electron microscope in biology. *J. Cell Biol.* 63(3), 717-748.
- Gondim, K.C., Wells, M., 2000. Characterization of lipophorin binding to the midgut of larval *Manduca sexta*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 30, 405-413.
- Grunclova, L., Horn, M., Vancova, M., Sojka, D., Franta, Z., Mares, M., Kopacek, P., 2006. Two secreted cystatins of the soft tick *Ornithodoros moubata*: differential expression pattern and inhibitory specificity. *J. Biol. Chem.* 387, 1635-1644.
- Horn, F., dos Santos, P., Termignoni, C., 2000. *Boophilus microplus* anticoagulant protein: an antithrombin inhibitor isolated from the cattle tick saliva. *Arch. Biochem. Biophys.* 384, 68-73.
- Karim, S., Miller, N.J., Valenzuela, J., Sauer, J.R., Mather, T.N., 2005. RNAi-mediated gene silencing to assess the role of synaptobrevin and cystatin in tick blood feeding. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1336-1342.
- Kotsyfakis, M., Sá-Nunes, A., Francischetti, I.M., Mather, T.N., Andersen, J.F., Ribeiro, J.M., 2006. Antiinflammatory and immunosuppressive activity of sialostatin L, a salivary cystatin from the tick *Ixodes scapularis*. *J Biol. Chem.* 281, 26298-26307.
- Kotsyfakis, M., Karim, S., Andersen, J.F., Mather, T.N., Ribeiro, J.M., 2007. Selective cysteine protease inhibition contributes to blood-feeding success of the tick *Ixodes scapularis*. *J. Biol. Chem.* 282, 29256-29263.

- Kucera, M., Turner, R.B., 1981. Purification and properties of protease inhibitors from developing embryos of *Hemileuca oliviae*. *Biochim. Biophys. Acta* 611, 379–383.
- Lima, C.A., Sasaki, S.D., Tanaka, A.S., 2006. Bmcystatin, a cysteine proteinase inhibitor characterized from the tick *Boophilus microplus*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18, 44-50.
- 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, 525-532.
- Logullo, C., Moraes, J., Dansa-Petretski, M., Vaz, I. S., 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 Biochem. Mol. Biol.* 32, 1805-1811.
- McGrath, M.E., 1999. The lysosomal cysteine proteases. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 28, 181-204.
- Mitchell RD 3rd, Ross E, Osgood C, Sonenshine DE, Donohue KV, Khalil SM, Thompson DM, Michael Roe R., 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochem Mol Biol.* 37, 375-388
- Nordin, J.H., Beaudoin, E.L., Liu, X.D., 1990. Proteolytic Processing of *Blattella germanica* Vitellin During Early Embryo Development. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 15, 119-135.

- Oliveira, M.C., Hirata, I.Y., Chagas, J.R., Boschov, P., Gomes, R.A., Figueiredo, A.F., Juliano, L., 1992. Intramolecularly quenched fluorogenic peptide substrates for human renin. *Anal. Biochem.* 203, 39-46.
- Raikhel, A.S., Dhadialla, T.S., 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomol.* 37, 217–251.
- Ricardo, A.J., de Oliveira, P.R., Bechara, G.H., Mathias, M.I., 2007. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari; Ixodidae) during the vitellogenesis process. *Tissue Cell.* 39, 203–215.
- Saito, K.C., Bechara, G.H., Nunes, E.T., de Oliveira, P.R., Denardi, S.E., Mathias, M.I., 2005. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 129, 299-311.
- Sajid, M. Mckerrow, J.H.. 2002. Cysteine proteases of parasit organisms. *Mol. Biochem. Parasitol.* 120, 1-21. Erratum in: *Mol. Biochem. Parasitol.* 2002. 30,121-159.
- Seixas, A., Dos Santos, P.C., Velloso, F.F., da Silva, V.I., Jr., Masuda, A., Horn, F., Termignoni, C., 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* 126, 155-163.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., Klenk, D.C., 1985. Measurement of protein using bicinchonic acid. *Anal. Biochem.* 150, 76–85.

- Sonenshine, D.E., 1991. *Biology of Ticks*, Vol. 1. Oxford University Press, Oxford, UK.
- Till, W.M. (Ed.), 1961. *A Contribution to the Anatomy and Histology of the Brown Ear Tick *Rhipicephalus appendiculatus**. Swets & Zeitlinger Publishers, Amsterdam., pp. 124.
- Willadsen, P., 2006. Vaccination against ectoparasites. *Parasitology*. 133, S9-S25.
- Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology*. 129, S367-387.
- Yin, L., Nordin, J.H., Lucches, P., Giorgi, F., 2001. Cysteine proprotease colocalizes with vitellogenin in compound granules of the cockroach fat body. *Cell. Tissue Res*. 304, 391–399.
- Zhou, J., Ueda, M., Umemiya, R., Battsetseg, B., Boldbaatar, D., Xuan, X., Fujisaki, K., 2006. A secreted cystatin from the tick *Haemaphysalis longicornis* and its distinct expression patterns in relation to innate immunity. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36, 527-535.

FIGURES AND CAPTIONS:

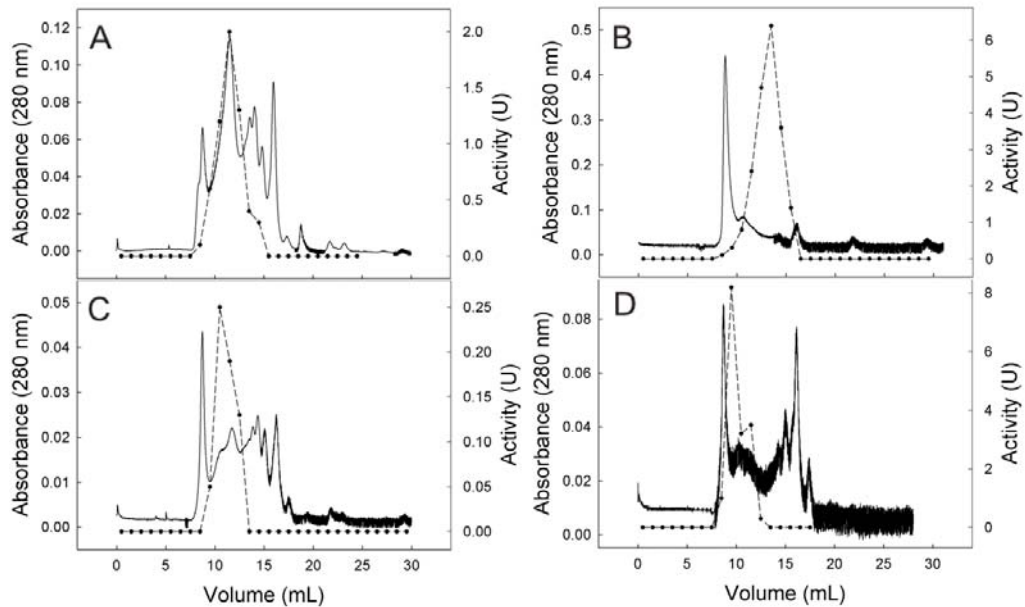


Figure 1 – Gel-filtration fractionation profile of soluble proteins from partially engorged female tissues. Extracts were applied onto Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Protein load from each tissue is presented as follows: A- fat body, 800 µg; B- midgut, 800 µg; C- salivary gland, 460 µg; D- ovary, 800 µg. Proteolytic activity of fractions was tested on a fluorogenic substrate (N-CBz-Phe-Arg-MCA) at 37 °C in sodium citrate/sodium phosphate buffer (pH 3.5) and 10 mM DTT. Protein elution (A 280 nm —); proteolytic activity (U ---●---).

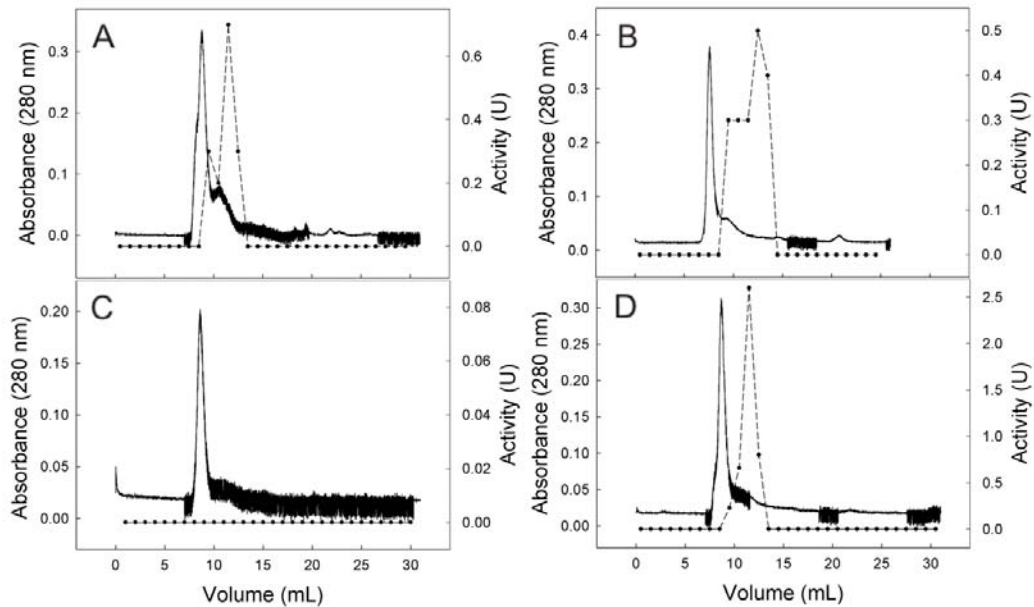


Figure 2 – Gel-filtration fractionation profile of insoluble proteins from partially engorged female tissues. Extracts were applied onto Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Protein load from each tissue is presented as follows: A- fat body, 830 µg; B- midgut, 900 µg; C- salivary gland, 575 µg; D- ovary, 825 µg. Proteolytic activity of fractions was tested on a fluorogenic substrate (N-CBz-Phe-Arg-MCA) at 37 °C in sodium citrate/sodium phosphate buffer (pH 3.5) and 10 mM DTT. Protein elution (A 280 nm —); proteolytic activity (U ---●---).

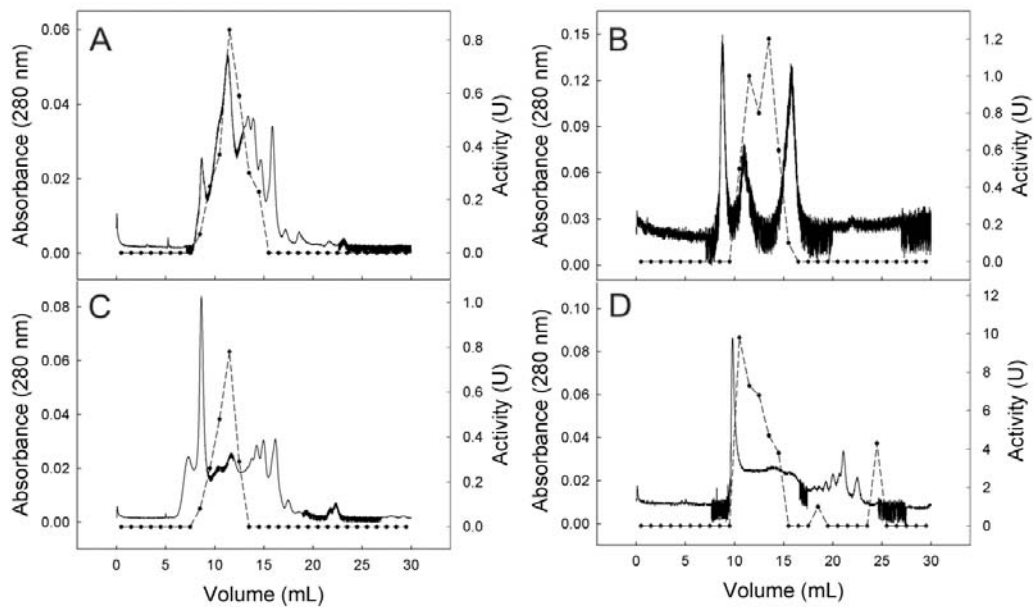


Figure 3 – Gel-filtration fractionation profile of soluble proteins from fully engorged female tissues. Extracts were applied onto Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Protein load from each tissue is presented as follows: A- fat body, 390 µg; B- midgut, 800 µg; C- salivary gland, 526 µg; D- ovary, 800 µg. Proteolytic activity of fractions was tested on a fluorogenic substrate (N-CBz-Phe-Arg-MCA) at 37 °C in sodium citrate/sodium phosphate buffer (pH 3.5) and 10 mM DTT. Protein elution (A 280 nm —); proteolytic activity (U ---●---).

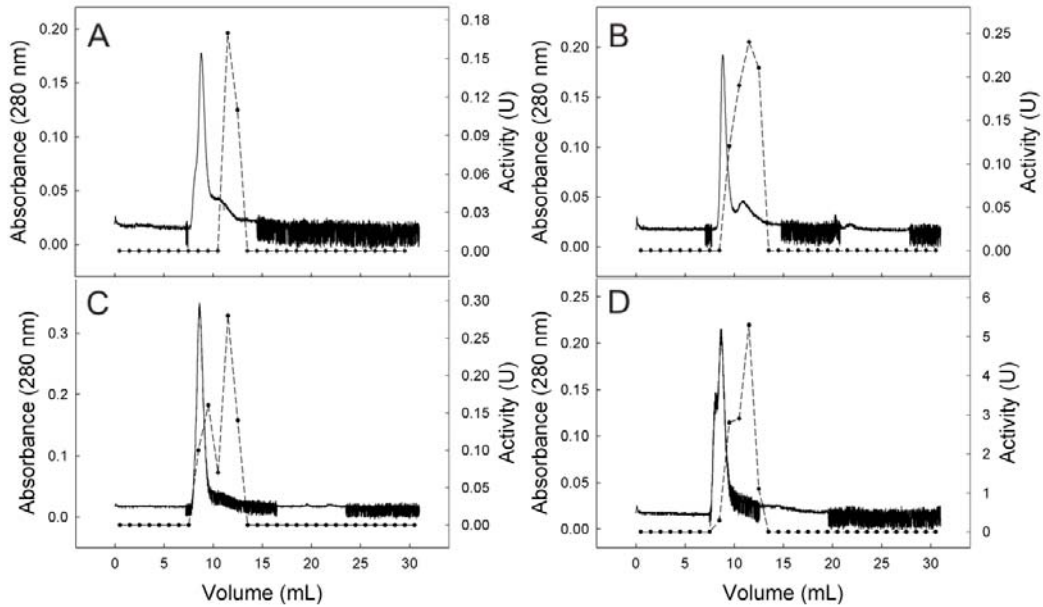


Figure 4 – Gel-filtration fractionation profile of insoluble proteins from fully engorged female tissues. Extracts were applied onto Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Protein load from each tissue is presented as follows: A- fat body, 520 µg; B- midgut, 700 µg; C- salivary gland, 735 µg; D- ovary, 2000 µg. Proteolytic activity of fractions was tested on a fluorogenic substrate (N-CBz-Phe-Arg-MCA) at 37 °C in sodium citrate/sodium phosphate buffer (pH 3.5) and 10 mM DTT. Protein elution (A 280 nm —); proteolytic activity (U ---●---).

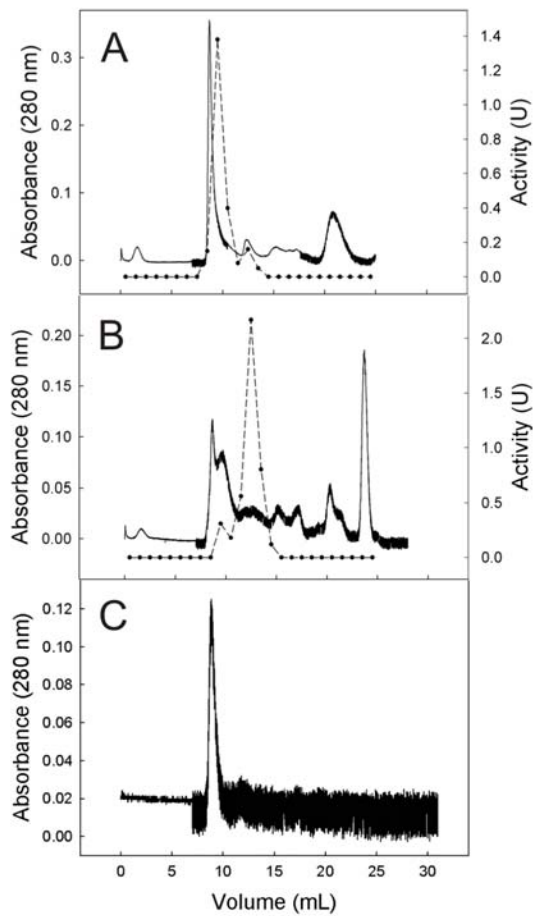


Figure 5 – Gel-filtration analysis of egg and larvae protein extracts and purified vitellin. Samples were applied onto Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Protein load from each sample is presented as follows: A- egg extract, 3.6 mg; B- larvae extract, 4.1 mg; C- purified Vt, 750 µg. For A and B, proteolytic activity of fractions was tested on a fluorogenic substrate (N-CBz-Phe-Arg-MCA) at 37 °C in sodium citrate/sodium phosphate buffer (pH 3.5) and 10 mM DTT. Protein elution (A 280 nm —); proteolytic activity (U ---●---).

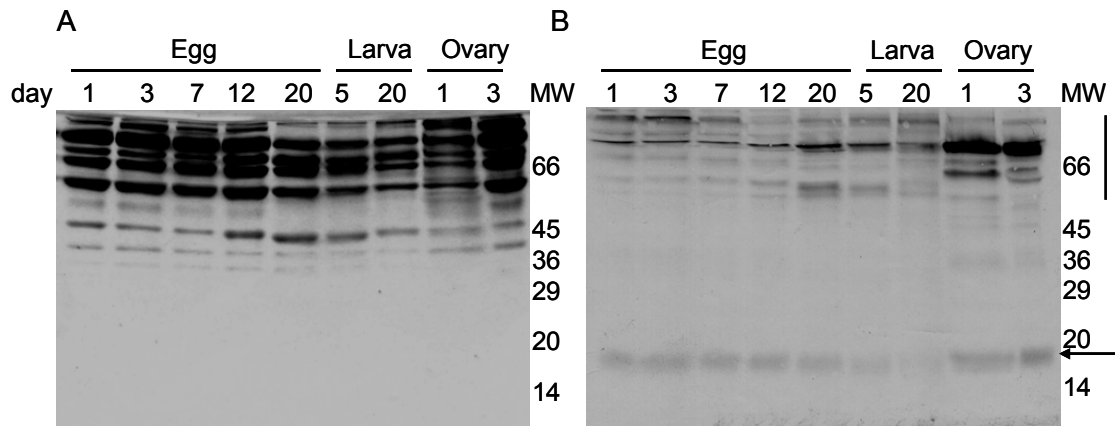


Figure 6 – VTDCCE immunolocalization in different developmental stages of *R. microplus*. Extracts of 1 day-egg (1), 3 days-egg (3), 7 days-egg (7), 12 days-egg (12), 20 days-egg (20), 5 days-larva (5), 20- days larva (20), ovary of fully engorged female 1 day post-detachment (1) and 3 days post-detachment (3) were separated by SDS-PAGE (A), transferred to nitrocellulose and probed with anti-VTDCE (B). Molecular weights in kDa are shown (MW). Replicate membranes probed with pre-immune serum showed no reactivity (data not shown).

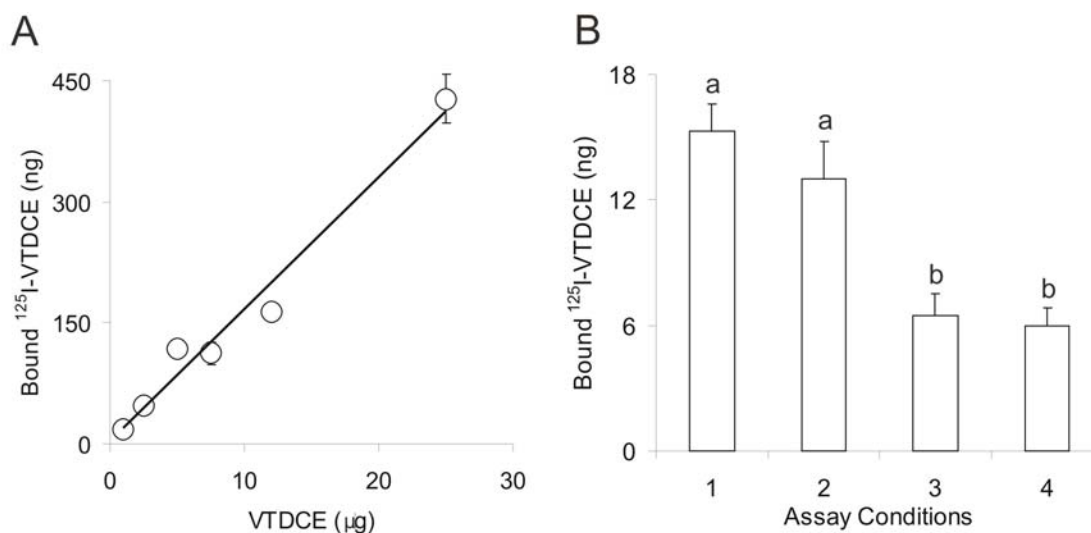


Figure 7 – VTDCE-vitellin binding. The association of soluble ^{125}I -VTDCE with Vt (20 μg), fixed on nitrocellulose membrane, was tested (see Materials and Methods). In (A), binding assay performed in the presence of different amounts of ^{125}I -VTDCE. In (B), Vt (20 μg , fixed on membrane) was incubated with: (1) 1 μg ^{125}I -VTDCE; (2) 1 μg ^{125}I -VTDCE + 100 μM leupeptin; (3) 1 μg ^{125}I -VTDCE + 1 mg Vt (in solution); (4) 1 μg ^{125}I -VTDCE + 1 mg Vt (in solution) + 100 μM leupeptin ; (5) 1 μg ^{125}I -VTDCE + 1 mg BSA (in solution) + 100 μM leupeptin. Results are expressed as total bound ^{125}I -VTDCE, in cpm.

Figure 8; Panel I and II

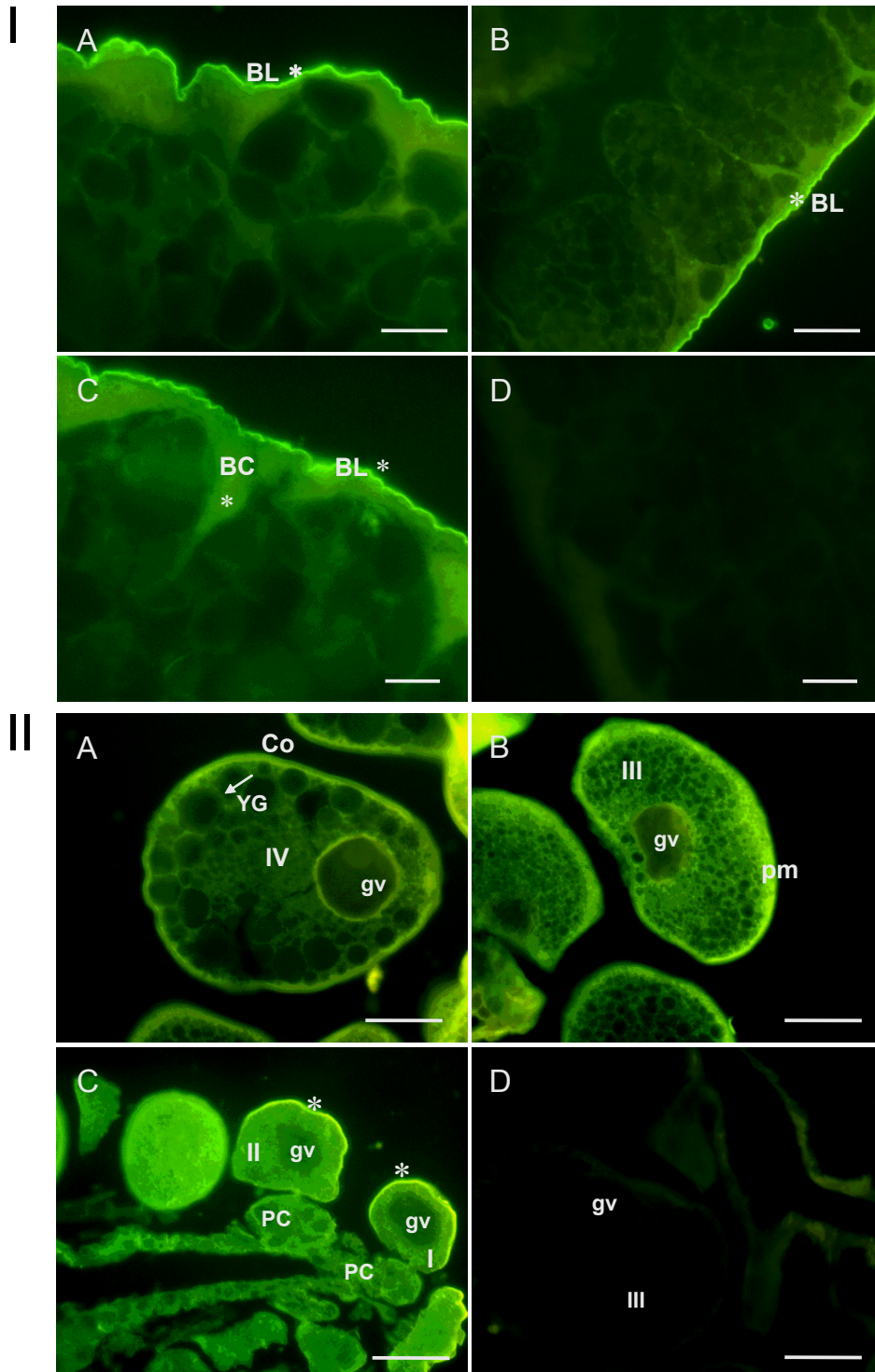


Figure 8 – VTDCE localization by immunofluorescence in *R. microplus* midgut and ovary. Fully engorged females were dissected at third day after blood meal and organs reacted with anti-VTDCE as described in material and methods. Midgut tissue showed a stronger signal in the basal lamina (BL; Panel I, A and B) contrasting with the signal in the basophilic cells (asterisk; Panel I, C). Scale bars represent 10 μm . Panel II, ovary thin sections presenting a strong labeling at the oocyte cytosol and basal lamina/chorium (CO) (Panel II, A and B), and also at the laminal region of the pedicel cells (PE) (Panel II, C); yolk granules (asterisk) does not present a significant VTDCE signal. Scale bars represent 20 μm . No labeling was observed in controls with non-immune serum (Panel I and II letter D). I, II, III, IV – oocyte developmental stage; gv – germinal vesicle.

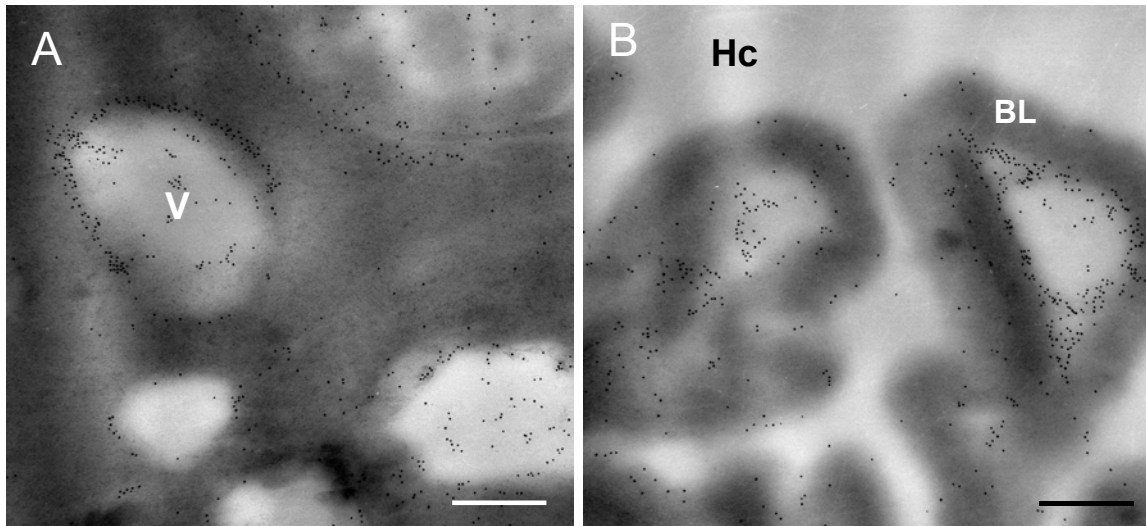


Figure 9 – Immuno-electron micrograph localization of VTDC in *R. microplus* ovary. Anti-VTDC was used as primary antibody and anti-rabbit IgG 10 nm-colloidal gold conjugated was used as secondary antibody. Grids were stained with 1% uranyl acetate, lead citrate and observed through transmission electron microscope. The enzyme was immunolocalized in the pedicel cells vesicles membrane (A) and in ovary basal region (B). Scale bars represent 1 μm in A and 0.8 μm in B. V – pedicel cell vesicle; Hc – haemocoel, BL – basal lamina.

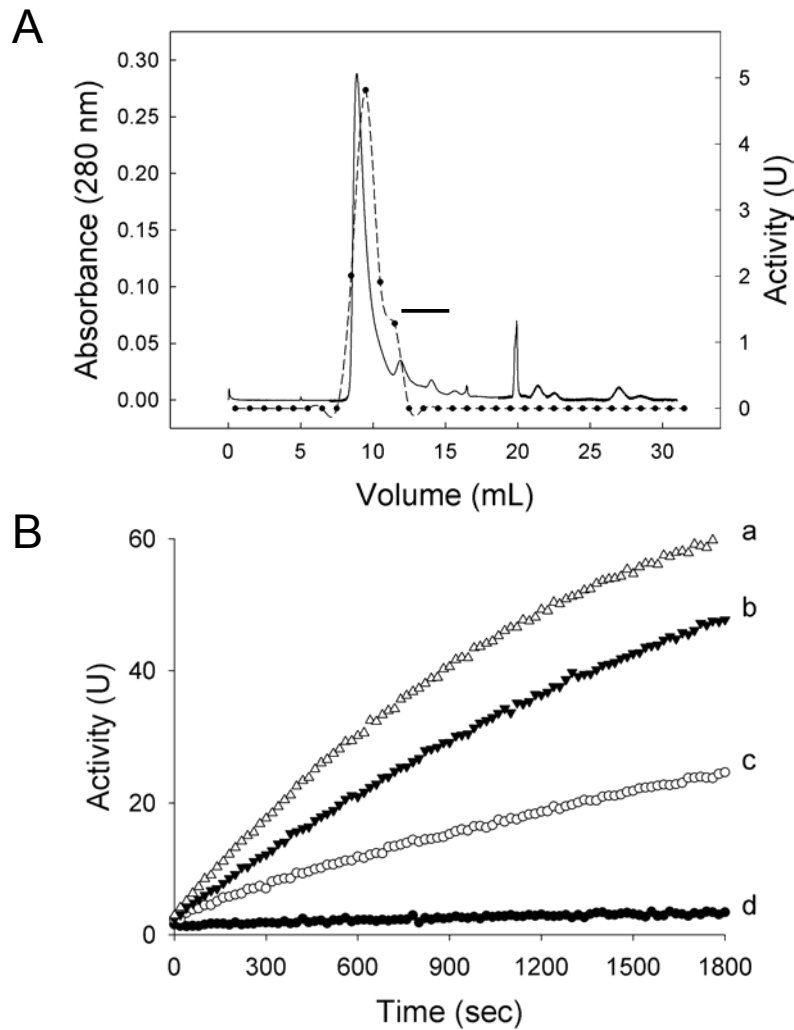


Figure 10 – A) Gel-filtration fractioning profile of engorged female hemolymph. Hemolymph (1:5 in PBS; 200 μl) was applied onto a Superose 12 column in sodium phosphate buffer (10 mM, pH 7.0) at 0.5 ml/min in FPLC system. Proteolytic activity of fractions tested upon the fluorogenic substrate N-CBz-Phe-Arg-MCA is shown as U ---●---; the black bar (—) shows the cysteine endopeptidase inhibitor activity. Protein elution (A 280 nm —). B) Dose dependent inhibition of VTDCE (1 μg) by the partially purified hemolymph cysteine endopeptidase inhibitor (gel filtration pool). Small letters indicate volumes of inhibitor fraction used: a- control, b – 2 μl, c – 5 μl, d - 8μl.

Table 1 - Cysteine endopeptidase activity in partially and fully engorged female tissues, saliva and hemolymph of *R. microplus*.

Tissue	Partially Engorged Female Activity*			Fully Engorged Female Activity*		
	Soluble	Insoluble	Total	Soluble	Insoluble	Total
Fatty body ^a	5.8 ± 0.16	2.2 ± 0.30	8	27 ± 0.8	2.5 ± 0.06	29.5
Midgut ^a	904 ± 100	17 ± 0.47	921	1.9 ± 0.1	0.8 ± 0.02	2.7
Ovary ^a	18 ± 1.38	0.6 ± 0.04	18.60	1063 ± 69	117 ± 3.6	1180
Salivary glands ^a	5.3 ± 0.11	0.7 ± 0.07	6.00	21 ± 0.2	1.6 ± 0.17	22.6
Saliva ^b	–	–	0	–	–	0
Haemolymph ^b	–	–	278	–	–	–
Haemolymph 1 ^b	–	–	–	–	–	589
Haemolymph 2 ^b	–	–	–	–	–	310
Haemolymph 3 ^b	–	–	–	–	–	250

* U = Relative fluorescence Units / sec.

^a = U / mg of tissue.

^b = U / ml.

Numbers 1, 2 and 3 in haemolymph indicate days after female engorgement.

Table 2 - Fractioning of *R. microplus* engorged female haemolymph by gel filtration chromatography and analysis of cysteine endopeptidase activity profile.

Sample	Volume (ml)	Protein (mg/ml)	Activity		Yield (%)	Purification Fold
			Total (U)	Specific (U/mg)		
Hemolymph	0.20	12.36	0.82	0.14	100	1
Superose 12	1.00	0.40	2.01	12.58	245	90

U = Relative Fluorescence Units / sec.

3.3 Potencial vacinal de uma enzima de carrapato processadora de vitelina (VTDCE)

Artigo III - Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE)

Seixas, A., Leal, A., Nascimento-Silva, M. C. L., Masuda, A., Termignoni, C., da Silva Vaz Jr, I.

Veterinary Immunology and Immunopathology

Trabalho realizado no Centro de Biotecnologia da UFRGS.

Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE)

Adriana Seixas ^{a,#}, Alexandre T. Leal ^{a,#}, Maria Clara L. Nascimento-Silva ^b, Aoi Masuda ^{a,c}, Carlos Termignoni ^{a,d}, Itabajara da Silva Vaz Jr ^{a,e,*}

^a Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43421, Porto Alegre – RS 91501-970, Brazil

^b Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ, Brazil

^c Departamento de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^d Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

^e Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre – RS, Brazil

These authors contributed equally to this work.

* Corresponding author. Tel.: +55 (51) 3308-6078, Fax: +55 (51) 3308-7309. *Email address:* ita@cbiot.ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr).

Abstract

VTDCE (Vitellin-degrading cysteine endopeptidase) is a peptidase with an active role in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* embryogenesis. *VTDCE* is found in the tick's eggs and was shown to be the most active protein in vitellin (VT) hydrolysis of the three peptidases already characterized in *R. microplus* eggs (*Boophilus* Yolk pro-cathepsin (BYC), Tick Heme Binding Aspartic Proteinase (THAP) and *VTDCE*). *VTDCE* activity was assessed *in vitro* using the natural substrate and a synthetic substrate (N-Cbz-Phe-Arg-MCA). The activity was inhibited by anti-*VTDCE* antibodies. In the present study, it was shown that *VTDCE* acts differently from BYC and THAP in VT hydrolysis and that the vaccination of bovines with *VTDCE* induces a partial protective immune response against *R. microplus* infestation. Immunized bovines challenged with *R. microplus* larvae presented an overall protection of 21%, and a reduction in the weight of fertile eggs of 17.6% was observed. The data obtained indicate that *VTDCE* seems to be important for tick physiology, and that it induces partial protective immune response when inoculated in bovines. This suggests that *VTDCE* can be useful to improve the protective capacity observed for other antigens.

Keywords: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; tick vaccine; *VTDCE*; cysteine endopeptidase; vitellin.

1. Introduction

Recently, all *Boophilus* species including *B. microplus* were reclassified under the genus *Rhipicephalus* (Murrell and Barker, 2003). Consensus says that this genus includes the major tick pests of cattle in tropical and subtropical regions of the world (Peter et al., 2005). Infestations with *R. microplus* cause economical impact to cattle production by impairing weight gain, reducing milk production, and by transmitting pathogens that cause babesiosis (*Babesia bovis* and *Babesia bigemia*) and anaplasmosis (*Anaplasma marginale*) (Willadsen, 2006a).

Current tick control methods are based on the use of acaricides (Graef et al., 2004). However, the use of acaricides is often accompanied by serious drawbacks, including environmental, milk, and meat contamination, apart from the worrisome selection of acaricide-resistant ticks (Willadsen, 2004; de la Fuente et al., 2007b). These drawbacks point to an urgent call for new tick control methods in order to reduce or replace the use of acaricides, especially in regions where extensive tick resistance has occurred (Martins and Furlong, 2001, de la Fuente and Kocan, 2006). Among the new approaches proposed to improve tick control are the use of pheromone-impregnated decoys for attracting and killing ticks, of biological control agents, and of vaccines (Samish et al., 2004; Sonenshine et al., 2006; Willadsen, 2006b). In this context, the development of vaccines against tick infestations offers a cost-effective and environmentally sound control strategy. In addition, multiantigenic vaccines could be used to target a broad range of species and prevent or reduce the transmission of pathogens (Nuttall et al., 2006; Labuda et al., 2006; de la Fuente et al., 2007a).

The feasibility of vaccination as a control method for ectoparasites was established over a decade ago with the commercialization of tick vaccine for cattle, based on the *R. microplus* gut Bm86 antigen (Willadsen et al., 1995; reviewed by de la Fuente et al., 2007b). Since then, research has continued in search of new antigens, which could increase the efficacy of tick vaccines. In recent years, a broad range of molecules of physiological importance, including peptidases and their inhibitors, are becoming gradually available, and such molecules are now considered putative targets for an anti-tick vaccine (reviewed by Willadsen, 2006a). Some of these molecules confer partial protection against tick infestations, showing that anti-tick vaccine antigens are not restricted to midgut or salivary glands proteins (da Silva Vaz et al., 1998; Tellan et al., 2002; Andreotti et al., 2002; Imamura et al., 2005).

In this context, we have been studying several physiologic processes in the cattle tick *R. microplus* in order to find molecules to be used as targets for an anti-tick vaccine. One of these processes is tick embryogenesis. Three enzymes involved in vitellin digestion in *R. microplus* eggs were characterized. Two aspartic-endopeptidases, the *Boophilus* Yolk pro-cathepsin (BYC) and the Tick Heme Binding Aspartic Proteinase (THAP) (Logullo et al., 1998; Sorgine et al., 2000), and a Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE; Seixas et al., 2003) have been tested as antigen to immunize bovines, conferring partial protection against *R. microplus* (da Silva Vaz et al., 1998; Leal et al., 2006).

VTDCE is a cysteine endopeptidase naturally associated to its putative physiological substrate VT. This enzyme was previously purified from *R. microplus* eggs (Seixas et al., 2003) and it is also present in maternal tissues, including ovary and gut

(Seixas et al., submitted). In the present study, we compare the *in vitro* activity of VTDCe, BYC and THAP upon the VT different-length peptides (Canal et al., 1995) and evaluate the use of VTDCe as antigen for bovine immunization against the cattle tick *R. microplus*.

2. Materials and methods

2.1 Antigen preparation

VTDCe was purified from *R. microplus* eggs according to the protocol established by Seixas et al. (2003) with modifications. Eggs from the 1st to the 10th day after oviposition were homogenized in a Potter-Elvehjem tissue grinder with 10 mM phosphate buffer, pH 7.2 (1 g of eggs/ml). The homogenate was centrifuged (16,000 g for 5 min) and the supernatant was filtered through a sequence of filters (AP glass fiber filter, 0.45 µm and 0.22 µm). The sample was then applied onto a 5 X 5 ml Hitrap Q HP (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) column previously equilibrated with 10 mM sodium phosphate buffer, pH 7.2 and eluted with a 0 – 0.8 M NaCl gradient in the same buffer system at room temperature with a flow rate of 0.5 ml/min. Activity containing fractions (6-7 ml) were pooled and submitted to autolysis. In this step, the pooled fractions were acidified to pH 4.0 with 1.0 M citric acid and incubated at 37°C for approximately 3 h, after which the sample was centrifuged at 3,000 g for 15 min.

The supernatant was concentrated in a Centricon-10 and applied onto a 1.0 cm X 30 cm Superdex 75 HR (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) column equilibrated with 10 mM acetate buffer, pH 4.0, using a Fast-Purification-Liquid Chromatography system

(FPLC) at room temperature with a flow rate of 0.5 ml/min. The pool of active fractions was then applied onto a Mono Q HR 5/5 column (0.5 cm X 5.0 cm), previously equilibrated with acetate buffer 10 mM, pH 4.0. The enzyme was eluted with a 0 – 0.8 M NaCl gradient in the same buffer.

2.2 Polyclonal antibodies against VTDCE

A rabbit was inoculated subcutaneously with 100 µg of purified VTDCE emulsified in Freund's complete adjuvant followed by three boosters of VTDCE (100 µg) in Freund's incomplete adjuvant at 15-day intervals. The VTDCE used to produce antibodies was previously tested with a monoclonal anti-VT antibody to check any VT contamination in the protein preparation (anti-VT was kindly supplied by Sandra E. Farias, Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul, Brazil).

2.3 Enzyme activity and vitellin hydrolysis

Enzyme activity present in chromatographic fractions was monitored with N-carboxibenzoyl-Phe-Arg-7-amido-4-methylcoumarin, 14 µM, (N-Cbz-Phe-Arg-MCA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) as substrate in 50 mM sodium citrate/sodium phosphate buffer, 10 mM dithiothreitol (DTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) in a microplate fluorimeter (M2e, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA) as described by Seixas *et al.* 2003. Anti-serum effect was tested using the same assay described above, except for the fact that the enzyme was pre-incubated with polyclonal anti-VTDCE or pre-immune serum (diluted 1:10) for 10 min before the addition of the substrate. The inhibition values were calculated by the initial velocity of the enzyme reaction, deducting

the effect caused by pre-immune serum. The same reaction without serum was developed as a control.

Vitellin hydrolysis was tested incubating vitellin purified from 1-day-old egg (60µg) and the *R. microplus* enzymes VTDCE (1 µg), BYC (10 µg) and THAP (10 µg) in acetate buffer pH 3.5, 1 h at 37°C. DTT (10 mM) was added to the VTDCE pool reaction, since this enzyme is a cysteine endopeptidase and requires reducing conditions for activity. BYC and THAP are aspartic-endopeptidases, so their enzymatic activity does not depend on reducing conditions. The hydrolysis products were analyzed by SDS-PAGE 10% stained with comassie brilliant blue G. VT and THAP were purified according to Sorgine et al. (2000) and BYC according to Logullo et al. (1998).

2.4 SDS-PAGE and Western blot

Samples were electrophoresed on sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels (SDS-PAGE) under non-denaturing conditions (Laemmli, 1970). Electrophoresis was performed using a Bio-Rad Mini-Protean Cell II unit. Resolving and stacking gels were 10 or 14 and 5% polyacrylamide, respectively. In Western blot, samples were separated by 14% SDS-PAGE (Laemmli, 1970) and transferred to a nitrocellulose membrane (0.45 µm, Schleicher & Schuell, Germany) at 0.8 mA/cm² for 1 h in a semi-dry system (GE-Healthcare, Uppsala, Sweden) using 25 mM Tris, 192 mM aminoacetic acid, 30% methanol, pH 8.4. Nitrocellulose sheets were blocked with blotto (5% non-fat cow dry milk in PBS [sodium phosphate (10 mM), NaCl (150 mM), pH 7.2] and probed with rabbit polyclonal antibodies against VTDCE, vaccinated and control bovine sera diluted in blotto. After 3 washes, anti-rabbit or anti-bovine IgG alkaline phosphatase conjugates

were used as secondary antibody. Development was performed with nitro blue tetrazolium / 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate *p*-toluidine salt (NBT/BCIP; USB Corporation, OH, USA) as previously described (Rosa de Lima et al., 2002).

2.5 Bovine immunization and challenge infestation

Hereford breed females (14-month-old) purchased from a tick-free area were used. The bovines were individually housed in tick-proof pens on slatted floors and fed twice a day with hay and concentrate, with water available *ad libitum*. The animals were divided into two groups: control group (bovines 1, 2, 3, 4) and treatment group (bovines 5, 6, 7, 8). The animals received 5 subcutaneous inoculations in the neck at 10-day intervals. After the challenger experiment they received 5 other boosters. Treatment group animals received an emulsion of 1 ml VTDCE (100 µg) plus 1 ml adjuvant (Marcol 52 and Montanide 888). The control group received emulsion composed of 1 ml PBS plus 1ml of adjuvant per dose. Ten days after the last inoculation, bovines were challenged with 20,000 10-day-old Porto Alegre strain larvae of *R. microplus*, *Babesia* spp and *Anaplasma* spp free. *R. microplus* eggs (1 g) were packed into 20 ml-syringes closed with a cotton plug and kept at colony conditions (27°C, 80% humidity) upon larvae hatching. At the challenge day the syringes were fixed, one per bovine, on the animal dorsum and the plug was removed to allow larvae to disperse.

2.6 Serological Analysis

Sera samples were collected before the first inoculation, 10 days after each subsequent inoculation, and after the infestation period. The humoral response was verified by

ELISA and Western blot using purified VTDCE as antigen. For Western blot, blood samples were collected 10 days after the fifth immunization. For ELISA analysis, microtitration plates were coated with 0.1 µg of VTDCE in 20 mM carbonate buffer (pH 9.6) by incubation at 4°C overnight, washed three times and incubated for 1 h at 37°C with blotto. The sera diluted 1:100 were considered positive when the reaction of post-inoculation samples showed a difference in optical density (O.D.) that was at least twice as high the O.D. value obtained with pre-inoculation serum (control). Then rabbit anti-IgG–peroxidase conjugate in 5% blotto was incubated for 1h at 37°C. *O*-phenylenediamine (OPD; Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) was used as chromogen and O.D. was determined at 492 nm (Harlow and Lane, 1988).

2.7 Ticks Analysis.

Ticks that detached spontaneously from the host were collected once a day, from the 17th post-challenge day until the end of the infestation period. Collected females were classified as fully or partially engorged, counted and weighed. Up to 5g of fully engorged females were incubated at 27°C, 80% humidity, for egg laying. Eggs were analyzed, weighed and incubated again for other 20 days until larvae hatched. Lastly, larvae were separated and weighed. Overall protection was calculated based on the number of fully engorged ticks, egg laying capacity and egg fertility using the formula (Willadsen et al., 1996; Canales et al., 1997; da Silva Vaz et al., 1998; Leal et al. 2006):

Overall protection ratio = 100 x [1- (NFE x WE x WL)]; where:

NFE – number of fully engorged ticks from VTDCE vaccinated bovines divided by number of fully engorged ticks from control bovines.

WE – egg laying capacity of ticks from VTDCE vaccinated bovines divided by egg laying capacity of ticks from control bovines.

WL – egg fertility of ticks from VTDCE vaccinated bovines divided by egg fertility of ticks from control bovines.

The statistical significance of the results shown in Table 1 was tested using *t*-test and ANOVA, as previously described (da Silva Vaz et al., 1998).

3. Results

3.1 VT hydrolysis by the R. microplus egg peptidases

SDS-PAGE analysis showed that after 1-h incubation at 37°C in acidic pH, VTDCE was able to completely hydrolyze all VT-related polypeptides. No molecular weight fragments in the range of 30-130 kDa were observed (fig. 1, line 3). The aspartic-endopeptidase THAP also exerted high activity upon VT at these conditions. However, the VT hydrolysis by THAP was only partial, not nearly as complete as the hydrolysis by VTDCE (fig. 1, line 5). After incubation, under the same conditions with BYC, another egg aspartic-endopeptidase, VT polypeptides were still intact (fig. 1, line 4). Moreover, it is important to note that, comparing with the other two peptidases, VTCDE activity is even higher than the visual observation suggests (fig. 1), because the molar concentration of VTCDE used was approximately 4 times lower than that of BYC and THAP, in this experiment.

3.2 Anti-VTDCE antibodies interfere in enzyme activity

Immunization of the rabbit with VTDCE induced specific antibody with an ELISA titer of 16,000. This immune serum was used for the enzyme inactivation experiment. The enzyme was pre-incubated with polyclonal serum anti-VTDCE (diluted 1:10) for 10 min before the addition of the substrate (N-cbz-Phe-Arg-MCA). Enzyme kinetics was monitored for 30 min and a dose-dependent inactivation was observed when compared to the control with no serum (fig. 2, closed cross). In comparison to the pre-immune serum, the specific reduction in the enzyme activity was 25 % \pm 3.8 with 1 μ l of serum, 61 % \pm 5.0 with 3 μ l and 71% \pm 1.6 with 4 μ l of serum. Some unspecific inactivation was observed when pre-immune serum was used as a control, though this effect was not as evident as when anti-VTDCE was used (fig. 2). This result shows that antibodies against VTDCE were able to block the enzyme catalytic activity.

3.3 Homogeneity of VTDCE preparation and reaction with rabbit polyclonal serum

The VTDCE preparation used for cattle immunization was analyzed by SDS-PAGE (14%), and shown to be homogeneous (fig 3). This preparation showed a 17-kDa protein in SDS-PAGE that corresponds to the lower molecular weight protein previously characterized by Seixas (2003), which can be the result of a distinct processing during autolysis. However, enzyme preparation has the same catalytic properties previously characterized (data not shown). VTDCE was found to be immunogenic when inoculated in a rabbit, and only one protein was observed in Western blot (fig. 3).

3.4 Serological analyses by ELISA and Western blot

The kinetics of the host humoral response during immunization and after the challenge with *R. microplus* larvae was monitored by ELISA (fig 4). Serum antibody reactivity to VTDCCE increased gradually during immunizations (fig. 4). A small drop in anti-VTDCE antibody concentration was observed 50 days after challenge, and after additional boosters the immune response increased, suggesting the development of immunological memory (figure 4). Western blot analyses confirmed that specific VTDCCE IgG was elicited in vaccinated bovines and no response was detected in control bovines (data not shown).

The antibody titer of the vaccinated bovine serum on the challenge day was determined as the dilution that achieved an O.D. value that was twice that of the pre-immune serum at the same dilution. Serum samples were diluted (1:200 – 1:3200) and tested by ELISA. IgG titers were 1:200 (bovine 7), 1:400 (bovine 5), 1:800 (bovine 8) and 1: 1,600 (bovine 6), showing individual variation among the animals. Bovine 7 had the lowest titer, since the pre-immune serum of this bovine presented high unspecific absorbance in ELISA.

3.5 Challenge and changes in tick biological parameters

Ticks that naturally detached in the period between the 17th and 30th day post-infestation were collected daily and some biological parameters were analyzed. The means of the results for each parameter and the differences between groups are presented in table 1.

The fully engorged females showing no macroscopic lesions were counted and weighed, and a sample of up to 5 g per day was incubated for egg laying and fertility analysis. The VTDCE vaccinated bovines presented a reduction of 14.6 % and 19.32 % in number and weight of engorged ticks respectively. Tick egg laying capacity and egg fertility were respectively reduced by 3.06% and 4.81% in vaccinated animals. These differences were not statistically significant due to variations in the responses of different animals. Also, the difference in weight of fertile eggs was not statistically significant ($p < 0.07$; Table 1). Despite this, the biological performance of ticks from bovines vaccinated with VTDCE tended to be lower than that of ticks from control animals. The overall efficacy of vaccine formulations against *R. microplus* considering the effect on tick infestations and oviposition was 21%.

4. Discussion

Different proteinases that are able to digest VT have been identified in *R. microplus* eggs. Our research group characterized two aspartic-endopeptidases, named BYC (Logullo et al., 1998) and THAP (Sorgine et al., 2000), and one cysteine endopeptidase (VTDCE) (Seixas et al., 2003) involved in VT hydrolysis during tick embryogenesis. More recently, another cysteine endopeptidase, RmLCE, was partially isolated and characterized from *R. microplus* larvae (Estrela et al., 2007). Also, the larvae cysteine endopeptidase seems to play an active role in VT digestion, by providing amino acids and energy for larval survival until a host is encountered and feeding starts (Estrela et al., 2007).

Among *R. microplus* egg protein-digesting enzymes, VTDCE seems to be the most active enzyme upon VT (fig. 1), reinforcing the hypothesis that VTDCE plays a key role in yolk protein degradation, an essential process for embryogenesis. In addition, different from the aspartic-endopeptidases, VTDCE is associated to its putative physiological substrate (VT). Dissociation was only achieved by an autolysis reaction in acidic pH, which was included in the purification protocol. Autolysis occurs in pH 4.0, and after that the enzyme must be maintained in acidic pH, otherwise it inactivates. Also, after this step VTDCE is susceptible to additional autolysis, which may cause variation in the protein size in the final preparation. It is well known that, for cathepsin L-like enzymes, autolysis is frequently observed in the final steps of purification (Cristofoletti et al., 2005). This may explain why the VTDCE preparation used here shows a different mass in comparison to values previously found (Seixas et al., 2003).

VTDCE activity was inhibited in a dose-dependent manner by a polyclonal anti-VTDCE serum, *in vitro*. This is of major importance, if one considers that bovine functional antibodies (anti-tick proteins) were detected in the hemolymph of ticks fed in animals immunized with a *R. microplus* egg protein (BYC) (da Silva Vaz et al., 1996). Moreover, this inhibition was observed in pH 4.0, showing that the antibodies are viable even under acidic conditions. Unspecific inhibition was observed in control assays using pre-immune serum (fig. 2). Nevertheless, albumin is a major protein in the serum, and it is known that this protein, as well as others, like hemoglobin and gelatin, is a substrate for VTDCE (Seixas et al., 2003). In this experiment, where the enzyme activity was measured using synthetic substrate, it is possible that albumin caused a substrate-competitive inhibition that resulted in enzymatic activity reduction. Obviously, this is

observed even in assays with pre-immune serum. As both sera came from the same animal, it does not impair experiment results since the specific VTDCE inhibition by anti-VTDCE antibodies was analyzed in the light of the difference between the inhibition caused by the immune and pre-immune serum. A control to check the enzyme preparation was done without serum.

In turn, BYC is very abundant in eggs and expresses preference for VT over other proteic substrates (Abreu et al., 2004). However, greater amounts of enzyme (milligrams) and long periods of incubation are necessary to detect *in vitro* VT hydrolysis by BYC (Abreu et al., 2004). Recently, the native and recombinant BYC activity upon synthetic and natural substrates was evaluated, and data clearly show that BYC digestion rate is in fact slow (Nascimento-Silva et al., in press). As it is known that enzyme activity is strongly decreased as a consequence of modifications in the active site, the same authors show that BYC action mechanism is affected by an important mutation, in comparison with typical aspartic-endopeptidases. These new data could explain our results that show that VTDCE is more active than BYC in VT hydrolysis (fig. 1).

THAP, the other *R. microplus* egg aspartic-endopeptidase, has its activity upon VT regulated in a specific manner. THAP uses heme bound to VT as a docking site to increase specificity and regulate VT degradation according to heme availability (Sorgine et al., 2000). These differences among VTDCE, BYC and THAP may be related to the control of VT degradation during *R. microplus* embryogenesis.

As these enzymes are involved in a such very important physiological process as reproduction, the study of their potential as targets in an anti-tick vaccine is impelling. With this objective, BYC was tested in native (da Silva Vaz et al., 1998) and recombinant

(Leal et al. 2006) forms as immunogen for bovine vaccination. Cattle immunized with BYC showed a partially protective immune response (between 14% and 36% for native and 25% for recombinant protein) against *R. microplus* infestations. This protection was mostly due to an increase in the number of sterile eggs (da Silva Vaz et al., 1998; Leal et al. 2006). These data support BYC as a candidate to a multiantigenic anti-tick vaccine.

The use of VTDCE as an antigen for bovine immunization was supported by the analysis of this enzyme's putative role in tick physiology (Seixas et al., 2003). Initially, its ability to induce an specific antibody was checked in rabbits. So, in this study, the characterization of bovine antibody responses provided by VTDCE immunization and the determination of the protection against experimental tick infestation was investigated. ELISA and Western blot analysis reveal that VTDCE elicited specific antibodies in vaccinated bovines, while sera from control animals remained negative during the experimental period. All experimental bovines responded to immunization with VTDCE and presented titers between 200 (bovine 7) and 1,600 (bovine 6). Individual variation in antibody titers observed is usual in vaccination of outbred animals. Immunization of 98 bovines with Bm86 produced variable antibody titers and 6% of the animals failed to respond to the vaccination, presenting very low antibody titers (Rodriguez et al., 1995).

Titers obtained for VTDCE were lower than those for bovines vaccinated with BYC, which presented titers between 1,000 and 6,400 (da Silva Vaz et al., 1998; Leal et al., 2006). The lowest titer was obtained for bovine 7 (200). Different from the others, this bovine showed an unspecific reactivity, which was already detected in the pre-immune serum. Moreover, a localized nonspecific granulomatous reaction was observed

at the inoculum's site. We do not know whether these findings are actually able to interfere with the development of specific immune responses against VTDCE.

In this study, ticks fed on cattle immunized with VTDCE display changes in biological parameters, resulting in an overall protection of 21% as compared with the control group. Considering individual biological parameters, vaccinated bovines presented a reduction of 14.6% and 19.32% in number and weight of engorged ticks, respectively, and a reduction in the weight of fertile eggs of 17.6% (table 1). Also, egg laying capacity and egg fertility were reduced (3.05% and 4.08%, respectively). Biological parameters like these are quite difficult to analyze, because outbred animals show a strong degree of individual variation. Apart from this, it is not feasible to perform experiments with a large number of bovines per group, as observed in other vaccination and tick challenge experiments (Riding et al, 1994; Andreotti, 2007; Biesenkamp-Uhe et al., 2007; Piercy et al., 2007).

Physiological and biochemical studies showed that VTDCE may play a role in tick survival by offering nutrients during embryogenesis (Seixas et al, 2003). So, it is likely that anti-VTDCE immune response can be modulated to improve its protective action by altering the adjuvant or inoculation protocols as dose and inoculum site. Patarroyo (2002) achieved a protection of 81% by vaccinating cattle with synthetic peptides derived from the *R. microplus* gut protein Bm86 using twenty times more immunogen (2.0 mg). A large quantity of VTDCE will be required to carry out experimental immunizations with higher numbers of animals; therefore, the production of the recombinant protein is impelling. Recombinant protein production is an important step, since the purification protocol of VTDCE and of other proteins used in tick

vaccination experiments is complex and unpractical for the high-scale production of an antigen to be used in a commercial vaccine (Rand et al., 1989; Riding et al., 1994; Andreotti et al., 2002). Accordingly, we already cloned and determined the nucleotide sequence of the VTDCE gene and have initiated the overexpression of VTDCE in heterologous expression system.

The overall protection afforded by VTDCE is not enough to allow its use as a sole vaccinal antigen. Indeed, all studies conducted so far have shown that there is not one single protein that achieves the protection level necessary for an efficient and practical vaccine (de la Fuente and Kocan, 2006). Therefore, a useful vaccine must be multiantigenic and the VTDCE protection level could be complementary to the protective action of other antigens.

Acknowledgments

This work was supported by grants from CNPq, FINEP, PRONEX, CAPES and FAPERGS.

References:

- Abreu, L.A., Valle, D., Manso, P.P.A., 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. Biochem. Mol. Biol.* 34, 443-449.
- Andreotti, R., 2007. A synthetic Bmti n-terminal as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp. Parasitol.* 116 (1), 66-70.

- Andreotti, R., Gomes, A., Malavazi-Piza, K.C., Sasaki, S.D., Sampaio, C.A., Tanaka, A.S., 2002. BmTI antigens induce a bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. *Internat. Immunopharm.* 2, 557-563.
- Biesenkamp-Uhe C., Li Y., Hehnen H-R., Sachse K., Kaltenboeck B., 2007. Therapeutic *Chlamydomonas abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently reduces bovine mastitis associated with *Chlamydomonas*. *Infection and Immunity* 75 (2), 870–877.
- Canal, C.W., Maia, H.M., Vaz Junior, I.S., Chies, J.M., Farias, N.A.R., Masuda, A., Gonzales, J.C., Ozaki, L.S. and Dewes, H., 1995. Changing patterns of vitellin-related peptides during development of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 19, 325-336.
- Canales, M., Enríquez, A., Ramos, E., Cabrera, D., Dandie, H., Soto, A., Falcón, V., Rodríguez, M., de la Fuente, J., 1997. Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac™ against cattle tick. *Vaccine* 15, 414-422.
- Cristofolletti, P.T, Ribeiro, A.F., Terra, W.R., 2005. The cathepsin L-like proteinases from the midgut of *Tenebrio molitor* larvae: sequence, properties, immunocytochemical localization and function. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 8, 883-901.
- da Silva Vaz., I. Jr, Martinez, R.H.M., Oliveira, A.T.D., Heck, A., Logullo, C., Gonzáles, J.C., Dewes, H., Masuda, A., 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* 62, 155-160.
- 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., 1998. Immunization of

- bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 66, 331-341.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28(7), 275-283.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., 2007a. Tick vaccines and the transmission of tick borne pathogens. *Vet. Res. Commun. Suppl.* 11, 85-90.
- de la Fuente, J., Almazan, C., Canales, M., De la Lastra, J.M.P, Kocan, K.M., Willadsen, P., 2007b. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Animal Health Res. Rev.* 8(1), 23-28.
- Estrela, A., Seixas, A., Termignoni, C., 2007. A cysteine endopeptidase from tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae with vitellin digestion activity. *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 148(4), 410-416.
- Graef J.F., Gongolewski, 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, S427-442.
- Harlow, E., Lane, D., 1988. *Antibodies: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Imamura, S., Da Silva Vaz Junior, I, Sugino, M., Ohashi, K., Onuma, M., 2005. A serineprotease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* 23(10), 301-331.
- Labuda, M., Trimnell, A.R., Lickova, M., Kazimirova, M., Davies, G.M., Lissina, O., Hails, R.S., Nuttall, P.A., 2006. An antivevector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* 2(4), e27.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Leal, A.T, Seixas, A., Pohl, P.C., 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. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 114(3-4), 341-355.
- Logullo, C., Da Silva Vaz, I., Sorgine, M., Paiva-Silva, G.O., Faria, F.S., Zingali, R., De Lima, M.F.R., Abreu, L., Fialho Oliveira, E., Alves, E.W., Masuda, H., Gonzáles, 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, 525-532.
- Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet. Rec.* 149(2), 64.
- Murrell, A., Barker, S.C., 2003. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst. Parasitol.* 56(3), 169-172.
- Nuttall, P.A., Trimnell, A.R., Kazimirova, M., Labuda, M., 2006. Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 28(4), 155-163.
- Patarroyo, J.H., Portela, R.W., De Castro, R.O., Pimentel, J.C., Guzman, F., Patarroyo, M.E., Vargas, M.I., Prates, A.A., Mendes, M.A., 2002. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet. Immunol. Immunopathol.* 88(3-4), 163-172.

- 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. *Vet. Parasitol.* 132(3-4), 205-215.
- Piercy J., Werling D., Coffey T.J., 2007. Differential responses of bovine macrophages to infection with bovine-specific and non bovine specific mycobacteria. *Tuberculosis* 87, 415–420.
- Rand, K.N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon G.S., 1989. Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 86(24), 9657-9661.
- Riding, G.A., Jarney, J., McKenna, R.V., Pearson, R., Cobon, G.S., Willadsen, P., 1994. A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J. Immunol.* 153(11), 5158-5166.
- Rodriguez, M., Penichet, M.L., Mouris, A.E., Labarta, V., Lorenzo Luaces, L., Rubiera, R., Cordovés, C., Sánchez, P.A., Ramos, E., Soto, A., Canales, M., Palenzuela, D., Triguero, A., Leonart, R., Herrera, L., De la Fuente, J., 1995. Control of *Boophilus microplus* population in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339-349.
- Rosa de Lima, M.F., Ferreira, C.A.S., Freitas, D.R.J., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Ins. Biochem. Mol. Biol.* 32, 747-754.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* 2004 129, S389–403.

- 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(Pt 2), 155-163.
- Sonenshine, D.E., Kocan, K.M., de la Fuente, J. 2006. Tick control: further thoughts on a research agenda. *Trends Parasitol.* 12, 550-551.
- 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 the hard tick *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275(37), 28659-28665.
- Tellam, R.L., Kemp, D., Riding, G., Briscoe, S., Smith, D., Sharp, P., Irving, D., Willadsen, P. 2002. Reduced oviposition of *Boophilus microplus* feeding on sheep vaccinated with vitellin. *Vet. Parasitol.* 103 (1-2), 141-156.
- Willadsen, P., 2004. Anti-tick vaccines. *Parasitology.* 129, S367-387.
- Willadsen, P., 2006a. Vaccination against ectoparasites. *Parasitology.* 133, S9-S25.
- Willadsen P., 2006b. Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet. Parasitol.* 138(1-2), 161-168.
- Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G.S., Hungerford, J., 1995. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, S43-S50.
- Willadsen, P., Smith, D., Cobon, G., Mckenna, R.V., 1996. Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* 18, 241-246.

FIGURES AND CAPTIONS:

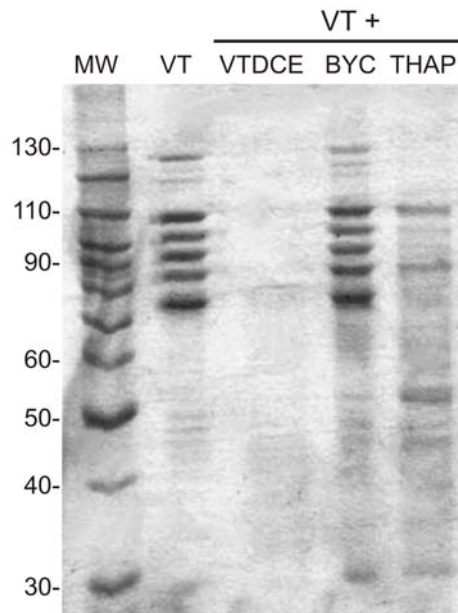


Fig. 1. Vitellin hydrolysis by the three known *R. microplus* egg enzymes with VT digestion activity VTDCE, BYC and THAP. VT (60 μ g) was incubated with VTDCE (1 μ g), BYC (10 μ g), THAP (10 μ g) in acetate buffer pH 4.0, 1 h at 37°C (see material and methods). The hydrolysis products were analyzed by SDS-PAGE 10% stained with Coomassie brilliant blue G. Molecular weigh markers were run at lane 1 (kDa); lane 2 shows VT (60 μ g) used as a control.

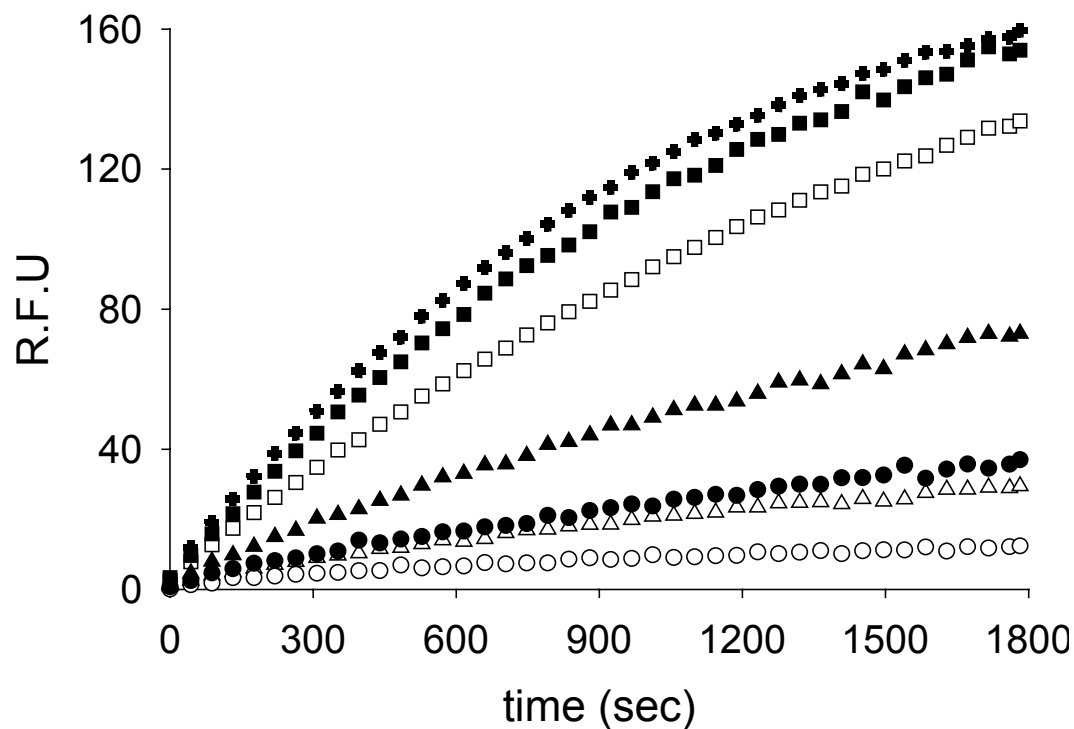


Fig. 2. Effect of anti-VTDCE on the VTDCe activity. Rabbit polyclonal serum anti-VTDCE (opened) or rabbit pre-immune serum (closed) diluted 1:10 were incubated with VTDCe (10 min) in 100 μ l sodium citrate/sodium phosphate buffer 50 mM, 10 mM DTT, before adding the substrate N-cbz-Phe-Arg-MCA (1.4 μ M). Enzyme kinetics was monitored every 30 min, and a dose-dependent inactivation was observed by comparison to the control without serum (closed cross). Doses of serum are identified by symbols: squares (1 μ l), triangles (3 μ l) and circles (4 μ l). Enzymatic activity is shown in relative fluorescence units (R.F.U.).

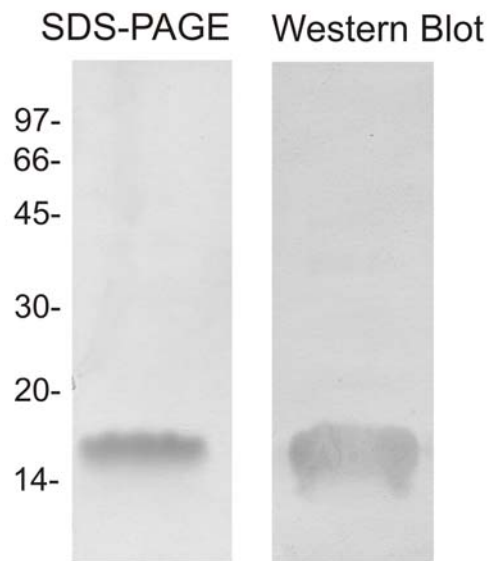


Fig. 3. SDS-PAGE (14%) of the purified VTDCE (30 μ g) used for bovine immunization and Western blot using rabbit polyclonal serum anti-VTDCE (1:300). Molecular weight markers are in kDa.

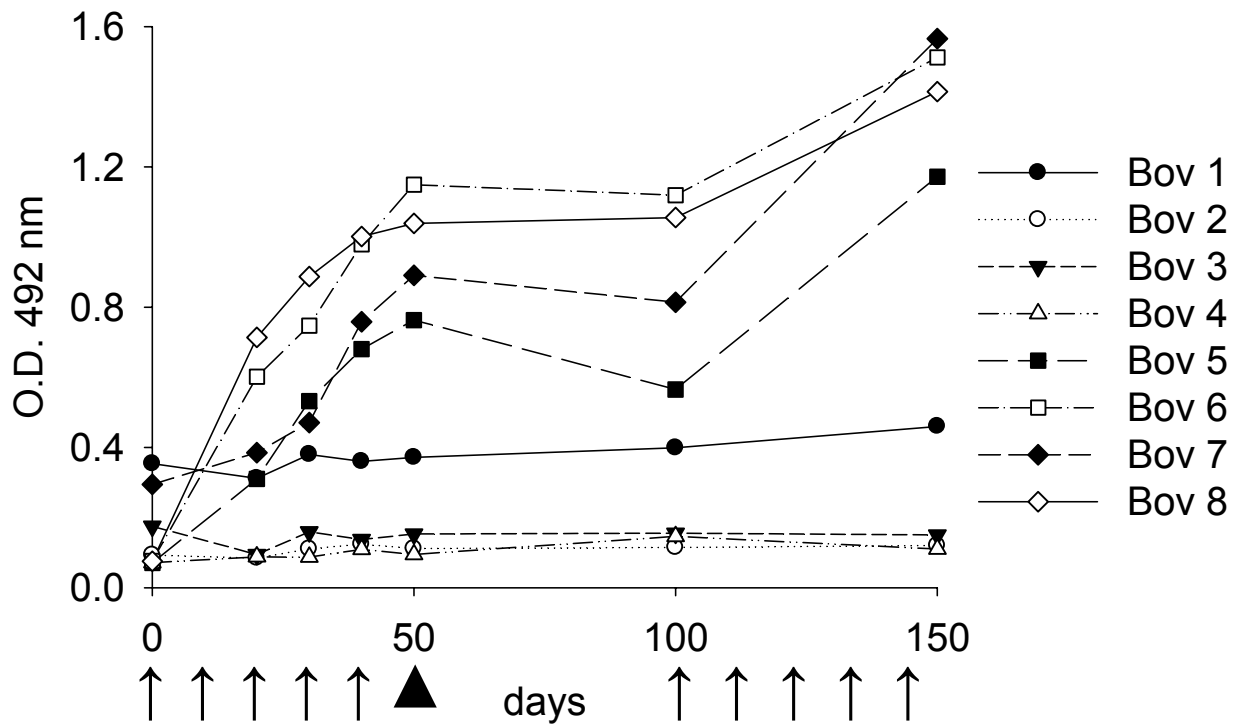


Fig. 4. Dynamics of the humoral immune response of bovines immunized with *R. microplus* VTDCE determined by ELISA (sera diluted 1:100). Arrows indicate the day of immunization, and the triangle shows the day of infestation.

Table 1 - Biological parameters of detached *R. microplus* from cattle immunized with VTDCE and control group.

Group	Bovine	Fully engorged ^b			Index	
		Number	Weight (g)	Fertile Eggs (g)	Egg laying capacity ^c	Egg Fertility ^d
Control	1	2,415	700	6.81	0.415	0.330
	2	1,915	494	5.64	0.399	0.320
	3	1,198	309	4.36	0.433	0.286
	4	3,245	916	6.89	0.402	0.309
	Total	8,773	2,419	23.70	1.650	1.245
	Mean	2,193	605	5.92	0.412	0.311
	SD	861	262	1.19	0.015	0.019
VTDCE	5	2,019	557	5.50	0.400	0.294
	6	1,584	414	4.98	0.407	0.357
	7	1,303	326	4.43	0.404	0.276
	8	2,586	654	4.61	0.388	0.258
	Total	7,492	1,952	19.53	1.599	1.186
	Mean	1,873	488	4.88	0.400	0.296
	SD	559	146	0.47	0.008	0.043
Difference (%) ^a		14.60	19.32	17.60	3.05	4.80

^a Difference (%)= 100 x (1 – (total value of vaccinated group/control group)).

^b Collected during 14 days in the course of the infestation period.

^c The weight of eggs laid by samples of fully engorged ticks, collected daily during 14 days in the course of the infestation period, was used to calculate the proportion of the weight of ticks that was converted into eggs.

^d Proportion between weight of fertile eggs and weight of eggs laid.

4. CONCLUSÃO

A presente tese teve como tema, o estudo da reprodução em carrapatos e a investigação de uma proteína de importância fisiológica com potencial para ser usada como antígeno em vacinas contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, o principal parasita em várias das mais importantes regiões exportadoras de carne bovina. Na primeira parte do trabalho, foi investigado o papel da 20-hidroxicidisona (20E) e de outros possíveis fatores envolvidos na vitelogênese de carrapatos. O fato de o *R. microplus* ser um carrapato que apenas parasita bovinos e permanece fixo ao seu hospedeiro único durante toda a fase de vida parasitária acarreta uma série de dificuldades para a realização de vários estudos, de modo que, é importante dispor de um modelo apropriado. Para os estudos apresentados na primeira parte da tese, utilizou-se o carrapato *Amblyomma hebraeum*, por ser uma espécie que se alimenta sucessivamente em três hospedeiros e, pode ser mantida em coelhos. O fato de o carrapato se desprender e voltar a se fixar no hospedeiro a cada muda possibilita que amostras sejam coletadas em diferentes estágios de vida, e permite que os carrapatos recebam tratamento experimental nos intervalos entre os repastos sanguíneos. Outra vantagem que faz com que esta espécie seja um bom modelo de trabalho é o seu tamanho. Uma fêmea ingurgitada de *A. hebraeum* é cerca 10 vezes maior que uma fêmea de *R. microplus*, facilitando a dissecação e possibilitando que, em relação a outras espécies de carrapato, uma maior quantidade de material biológico seja obtido.

A síntese da vitelogenina e sua captação pelos oócitos são etapas de extrema importância para o sucesso da reprodução de artrópodes, e outros ovíparos. Para os

insetos, os papéis do 20E e do hormônio juvenil (JH) na vitelogênese já estão bem estabelecidos, mas sabe-se muito menos sobre esse processo em ácaros. Foi sugerido que o JH seja o hormônio vitelogênico em carrapatos (Pound and Oliver, 1979; Connat et al., 1983). No entanto, estudos mais aprofundados não foram capazes de detectar a presença de JH, ou molécula similar, nesses artrópodes (Connat, 1987; Neese et al., 2000).

Em *Dermacentor variabilis*, o hormônio 20E é capaz de induzir a síntese e captação de Vg pelos oócitos, levando ao completo desenvolvimento do ovário de fêmeas virgens (Thompson et al., 2005). Ao contrário, em *A. hebraeum* foi demonstrado que o 20E induz apenas a síntese de Vg pelo corpo gorduroso, mas não a captura desta proteína pelos oócitos (Friesen e Kaufman, 2002; 2004). Como foram utilizadas técnicas diferentes para realização destes experimentos que levaram a estes resultados contraditórios, permanecia a dúvida se o 20E é incapaz de induzir a captação de Vg pelos oócitos de *A. hebraeum*, ou se a metodologia utilizada não permitiu a demonstração deste efeito.

Para esclarecer esta controvérsia, utilizamos duas metodologias, uma em que os carrapatos foram tratados após serem removidos do hospedeiro (Friesen et al., 2002); e outra na qual o tratamento foi feito com carrapatos fixados ao hospedeiro (Thompson et al., 2005). Deste modo, mostramos que o 20E não é capaz de induzir a captação de Vt pelos oócitos de *A. hebraeum*. É importante considerar que, dentre as doses de 20E usadas, foi alcançada uma dosagem tóxica (154 µg/g peso corporal), a qual causou morte nos carrapatos, o que evidencia que a falta de captação não foi devido a uma subdosagem hormonal nos tratamentos. Estes novos resultados mostram que existem

diferentes estratégias de controle da captação de Vg, pelo ovário, dentro do grupo dos carrapatos Ixodide.

Para explicar nossos achados, foi levantada a hipótese de que a captação de Vg nos oócitos de *A. hebraeum* é desencadeada por um fator adicional ao 20E, o qual denominamos fator de captação de vitelogenina (“Vitellogenin Uptake Factor”, VUF); molécula que estaria presente na hemolinfa de fêmeas desta espécie. Esta hipótese é corroborada por achados anteriores, demonstrando que, ovários de fêmeas virgens transplantados para a hemocele de fêmeas vitelogênicas são capazes de captar Vg (Lunke e Kaufman, 1993). Adicionalmente, Friesen e Kaufman (2004) demonstraram a presença de uma proteína ligadora de Vg em ovários de fêmeas virgens, parcialmente alimentadas de *A. hebraeum*, mostrando que estes estão aptos a captar Vg e, que a falta de um receptor não seria o motivo da não captação das proteínas do vitelo. Sendo assim, para investigar esta hipótese foram estudando os efeitos da administração, em fêmeas virgens, de 20E ou de 20E associado à hemolinfa de fêmeas vitelogênicas.

Os resultados obtidos indicam a existência do VUF. Esta conclusão foi evidenciada por aumento no tamanho do ovário, dos óocitos e do conteúdo de Vt no ovário de fêmeas que receberam 20E associado com hemolinfa. Entretanto, o desenvolvimento completo do ovário, ao contrário do que ocorre em *D. variabilis*, não foi alcançado. A concentração muito baixa deste fator na hemolinfa das fêmeas tratadas, ou a susceptibilidade desta molécula à inativação durante o manuseio fora do carrapato, podem explicar porque o desenvolvimento do ovário foi incompleto. No caso de espécies em que o 20E é a molécula efetora da captação de Vg, esta dificuldade em demonstrar seus efeitos são minimizadas, pois este hormônio é uma molécula resistente às condições

do ensaio e, pode ser administrado em pequenos volumes na dose desejada, ao contrário do que ocorre para a hemolinfa devido à possibilidade de inativação durante etapas de concentração. Uma vez identificada e purificada uma molécula indutora da captação de Vg em *A. hebraeum* (VUF), seu mecanismo de ação poderá ser melhor estudado. Adicionalmente, esta molécula poderá ser uma ferramenta para auxiliar nos estudos com *R. microplus*, permitindo investigar se nesta espécie o efeito do 20E em induzir a captação de Vg pelos óocitos depende deste fator.

Após a captação da Vg pelos oócitos, ela é processada e estocada na forma de vitelina (Vt) em estruturas denominadas grânulos de vitelo. Os grânulos de vitelo são como lisossomos modificados, que além de armazenar as substâncias de reserva possuem a maquinaria enzimática necessária para a disponibilização destes nutrientes. No entanto, diferentemente dos lisossomos clássicos, não são organelas hidrolíticas vorazes, e sim, atuam na degradação do seu conteúdo interno de maneira controlada (Fagotto et al., 1995). As enzimas envolvidas na disponibilização deste conteúdo de reserva, assim como o modo como estas são controladas, são alvos de estudo em diferentes espécies (revisado por Giorgi et al., 1999). Em ovos de *R. microplus* três enzimas atuantes neste processo já foram descritas, duas aspártico proteinases: *Boophilus* Yolk pro-cathepsin (BYC; Logullo et al., 1998) e Tick Heme Binding Aspartic Proteinase (THAP; Sorgine et al., 2000) e uma Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE; Seixas et al., 2003). Recentemente foi caracterizada outra cisteíno endopeptidase, *R. microplus* larvae cysteine endopeptidase, que provavelmente esteja envolvida na nutrição das larvas, disponibilizando as reservas remanescentes até que o hospedeiro seja encontrado e o repasto sanguíneo tenha início (RmLCE; Estrela et al., 2006).

As enzimas pertencentes ao grupo das cisteíno endopeptidases são amplamente distribuídas e possuem um amplo espectro de funções, estando envolvidas em diferentes processos biológicos. As cisteíno endopeptidases do tipo catepsina B e L são as mais estudadas em organismos inferiores e, podem ser exemplificadas pela catepsina-L de esponjas, que é responsável pela digestão nestes poríferos (Krasko *et al.*, 1997); cruzáina, uma enzima essencial para a replicação do protozoário *Tripanossoma cruzi* (Meirelles *et al.*, 1992); e a catepsina-L de *leishmania*, que atua na invasão de macrófagos (Frame *et al.*, 2000). Em ovíparos, estas enzimas têm a função de disponibilizar nutrientes para o desenvolvimento do embrião como descrito em *Drosophila* (Medina *et al.*, 1988), *Blatella germânica* (Liu *et al.*, 1997), *Bombix mori* (Kageyama e Takahashi, 1990) e carrapatos como *Ornithodoros moubata* (Fagotto, 1990 a,b).

Para compreender a distribuição, e possíveis funções das cisteíno endopeptidases em *R. microplus*, esta atividade foi estudada em diferentes tecidos, hemolinfa e saliva de fêmeas partenóginas e teleóginas. Vimos que esta classe de enzimas está amplamente distribuída nas fêmeas dessa espécie, encontrando-se principalmente na forma solúvel. Interessantemente, em partenóginas a maior atividade foi observada no intestino, o que está coerente com o fato de que digestão é o processo mais ativo no organismo da fêmea nesta fase do ciclo de vida. Após o ingurgitamento completo e desprendimento do hospedeiro, ocorre redução da atividade no intestino e um grande aumento da atividade no ovário, seguida pela atividade do corpo gorduroso. Esta é uma fase em que os processos de vitelogênese, síntese de outras proteínas e oogênese estão em alta, e órgãos como o corpo gorduroso e o ovário estão muito ativos.

O fracionamento por gel filtração, dos extratos de diferentes tecidos, mostrou o perfil geral de proteínas e das atividades cisteíno endopeptidásicas detectadas anteriormente. Mudanças no perfil proteico mostraram que ocorre degradação de algumas proteínas, assim como síntese de outras, de acordo com o estágio em que a fêmea se encontra. A atividade cisteíno endopeptidásica também sofre mudanças relacionadas ao estágio de vida do carrapato, no entanto, mantém algumas características constantes, sugerindo que uma mesma enzima majoritária, ou um mesmo grupo de enzimas, esteja presente nos diversos tecidos. Uma atividade, que elui da coluna de gel filtração em 9,5 ml, mostrou-se característica da fração insolúvel. Entretanto, o pico de atividade eluído em 11,5 ml mostrou-se predominante, sendo detectado nos diferentes tecidos tanto na fração solúvel como insolúvel. Extratos de ovos e larvas também foram analisados e mostraram características interessantes. Visualizam-se claramente dois picos de atividade cisteíno endopeptidásica nos cromatogramas de ovos e larvas, sendo um pico majoritário no ovo, e outro na larva. É possível que uma mudança, processamento ou dissociação, esteja ocorrendo e resulte nesta variação, ou então, que estas enzimas sejam estágio-específicas estando, a enzima de larva em pequenas quantidades no ovo, e a do ovo sendo degradada na larva.

Em estudos visando esclarecer o papel da VTDCE no carrapato, vimos que esta, dentre todas as enzimas envolvidas na embriogênese de *R. microplus*, é a mais ativa na degradação de Vt, e até o momento a única associada ao vitelo; por isso sua atividade parece ser controlada por diferentes maneiras. A VTDCE está presente durante todo o desenvolvimento do carrapato, em ovos de 1 até 12 dias, em larvas jovens e desenvolvidas, na hemolinfa, e em tecidos de fêmeas adultas. A VTDCE é uma proteína

associada ao vitelo, e sua propriedade ligar-se diretamente à Vt foi evidenciada de diferentes maneiras: i) esta enzima elui juntamente com a Vt em procedimentos cromatográficos; ii) existe a necessidade de uma etapa de autólise no processo de purificação; iii) ensaios usando VTDCCE purificada, marcada com iodo radioativo, mostraram a associação dose dependente entre VTDCCE e Vt. As evidências relatadas na literatura têm estabelecido de maneira conclusiva que, em diferentes espécies, existe um esquema geral de degradação do vitelo durante o desenvolvimento do embrião, o qual envolve ativação de cisteíno endopeptidases associadas ao vitelo, a partir de proteases precursoras (Giorgi et al., 1999). Nossos resultados indicam que a VTDCCE se encaixa perfeitamente neste esquema, mostrando que este mecanismo se aplica também ao *R. microplus*.

A associação da VTDCCE com a vitelina não pôde ser desfeita por nenhuma técnica cromatográfica empregada. Em cromatografia de gel filtração usando tampão com 1 M de glicose ou 1 M de NaCl, condições que normalmente são eficazes para romper associações entre proteínas, a atividade majoritária elui juntamente com a Vt. O uso de uma etapa de autólise em pH ácido, na qual a Vt é degradada, precipita, e a enzima permanece solúvel, foi eficiente como estratégia de purificação. A dificuldade em estabelecer com precisão a massa molecular da VTDCCE deriva desta associação com a Vt. Nos primeiros estudos, descrevemos dois peptídeos de 22 e 17 kDa (Seixas et al., 2003). No entanto, alterações no processamento da enzima podem mudar suas características, e somente uma subunidade, com massa molecular em torno de 17-14 kDa, permanece, sugerindo que a proteína de 22 kDa observada anteriormente corresponde a um estágio anterior de processamento. De fato, dificuldades no isolamento, purificação e

caracterização de enzimas tipo catepsina L, devido a autoproteólise, ocorrem com frequência (Cristofolletti *et al.*, 2005). Esses problemas estão acentuados no caso da VTDCE, pois a etapa de autólise é essencial para obter uma preparação pura.

A seqüência amino terminal da VTDCE foi determinada pelo método de Edman, adicionalmente, seqüências internas foram obtidas após reação de tripsinização e análise por separação dos peptídeos em cromatografia líquida, seguida por espectrometria de massas em tandem (dados não mostrados nesta tese de doutorado). Esses dados apontam para uma seqüência já depositada em bancos de dados (<http://tigrblast.tigr.org/tgi/>) de uma proteína de *R. microplus* apresentando um pI teórico de 5,30, e uma massa molecular média predita de 10.657, que aproxima-se da proteína nativa se considerarmos as variações de massa descritas. A comparação com seqüências homólogas indica que esta seqüência está relacionada à de uma enzima peptidil-prolil *cis-trans* isomerase.

Interessantemente, a seqüência da VTDCE também apresenta certa similaridade com peptídeos antimicrobianos de carrapatos que possuem um perfil característico de cisteínas, como a hebraina de *Amblyomma hebraeum*, a microplusina pré-proteína de *R. microplus* e, outro peptídeo de *Ixodes escapularis* similar a pré-proteína da microplusina. Deste modo, surge a questão se esta seria mais uma função da VTDCE em ovos de *R. microplus*, problema que merece ser investigado.

Dando continuidade aos estudos de caracterização da VTDCE e a investigação do seu papel fisiológico, foram realizados experimento de imunolocalização em intestino e ovário de *R. microplus*. A VTDCE parece ser uma enzima cuja síntese é extraovariana. Ela está presente nas células basofílicas do intestino de fêmeas, as quais são conhecidas por realizar síntese proteica (Agbede and Kemp, 1987). Os dados mostraram que, em

ovário, a VTDCCE está presente na lâmina basal, nas células do pedicelo, e no citoplasma dos oócitos. Além disso, imunolocalização utilizando microscopia eletrônica de transmissão mostrou que a VTDCCE situa-se na membrana de vesículas das células do pedicelo, assim como nas interdigitações. Conectando estes achados, a presença de VTDCCE na hemolinfa foi confirmada por ensaios de atividade e western blot. Sendo assim, sugerimos que a VTDCCE é sintetizada no intestino, secretada na hemolinfa, e por fim transferida aos oócitos com o auxílio das células do pedicelo, sendo estocada para posterior atuação na hidrólise da Vt.

A primeira enzima descrita estando envolvida na degradação embrionária das proteínas de vitelo, sendo sintetizada extraovariamente (no corpo gorduroso) e internalizada pelos oócitos, foi a enzima de mosquito Vitellogenic Cathepsin B (VCB; Cho et al., 1999). A VCB está presente na hemolinfa de mosquito, em uma forma de alta massa molecular, e ao ser internalizada pelos oócitos diminui de tamanho. Outra característica interessante desta enzima é o fato de sua síntese ser controlada por hormônio ecdisteróides, do mesmo modo que mostramos para a Vg na primeira parte dos resultados desta tese. É possível que a cisteíno endopeptidase que estamos estudando, além de se associar à Vt, possa apresentar um comportamento semelhante ao da catepsina B de mosquito.

As características mostradas acima levam a questão de como a protease e a Vt, ou Vg, podem coexistir e mesmo assim uma hidrólise prematura dos polipeptídeos da Vt não ocorrer durante a vitelogênese. Conforme mencionado anteriormente, o mecanismo mais aceito para o controle da latência nos grânulos de vitelo é o controle por pH (Giorgi et al. 1999). A VTDCCE se encaixa perfeitamente neste modelo. Entretanto, a VTDCCE e outras

catepsinas ainda apresentam atividade em pHs mais próximos ao neutro. Com relação ao controle da atividade das enzimas degradadoras de vitelo, foi sugerido que elas possam ser ativadas por proteólise limitada ou por remoção de inibidores específicos (Kucera and Turner, 1981). Inibidores específicos de cisteíno endopeptidase, conhecidos como cistatinas, vem sendo descritos em carrapatos e parecem participar na interação parasita hospedeiro, e na alimentação hematófaga. Entretanto, só agora com nosso estudo, foi descrita uma atividade de cistatina presente na hemolinfa de *R. microplus* capaz de inibir a cisteíno endopeptidase degradadora de Vt, VTDCE, portanto estando envolvida no processo de vitelogênese. Na hemolinfa bruta de *R. microplus*, mesmo em condições ácidas, a atividade da VTDCE está bastante reduzida e aumenta cerca de 90 vezes após fracionamento por cromatografia, indicando que o pH não é a única forma de controle da atividade.

Os resultados apresentados deixam claro que a VTDCE é uma enzima envolvida na embriogênese de *R. microplus*. Uma vez que, este é um processo fisiológico de extrema importância para o parasita, suas moléculas chave podem ser um alvo adequado para vacinas. Assim, na terceira parte da tese, estudamos a possível aplicação da VTDCE como antígeno no desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato. A pouco mais de uma década, foi desenvolvida a primeira vacina contra carrapato (Willadsen, 1995). Em comemoração a este marco, alguns trabalhos de avaliação da situação das vacinas anti-carrapato foram publicados (Willadsen, 2006a; 2006b; de la Fuente et al., 2007). Estas discussões mostram a existência de um consenso de que o uso de vacinas contra carrapatos é um método viável e promissor, o qual representa uma boa alternativa ao uso de acaricidas químicos (de la Fuente et al., 2007). No entanto, também é consensual o

fato de que nenhum antígeno descrito até o momento atinge o nível de proteção necessário para uso individual em uma vacina efetiva (de la Fuente e Kocan, 2006a). Deste modo, a identificação de novos antígenos permanece como fator limitante no desenvolvimento de uma vacina anti-carrapato eficaz.

Devido à importância do processo fisiológico no qual VTDCE está envolvida, a possibilidade de que a inibição de sua atividade perturbe o desenvolvimento dos carrapatos é evidente. Para avaliar esta hipótese, foi realizado um experimento de vacinação com VTDCE, e desafio com larvas de *R. microplus*. Neste experimento, a VTDCE se mostrou imunogênica para bovinos. Todos os animais reponderam contra as imunizações e desenvolveram memória imunológica. O parâmetro mais afetado foi o peso das teleóginas, que apresentou uma redução de 19,32 %, seguido por uma redução de 17,32% no peso de ovos férteis. A proteção final, calculada com base nas diferenças no número de fêmeas, índices de postura, e de viabilidade dos ovos, entre bovinos vacinados e controles foi de 21%. Experimentos de vacinação e desafio, tendo bovinos como hospedeiro, são experimentos de alto custo, dificultando o uso de um maior número de animais por grupo. Por consequência, experimentos deste tipo são muito susceptíveis a variações individuais dos animais, o que resulta na falta de significância estatística de muitos dos resultados obtidos, como aconteceu neste caso e em outros trabalhos similares (Riding et al, 1994; Andreotti, 2007; Biesenkamp-Uhe et al., 2007; Piercy et al., 2007).

Boa parte dos artigos de vacinação, recentemente publicados, tem abordado o uso de proteinases e seus inibidores como antígenos vacinais (revisado por Willadsen, 2004; 2006). Resumidamente podemos abordar alguns trabalhos de vacinação contra carrapato usando proteinases como antígeno. A aspártico proteinase de ovos de *R. microplus* BYC,

foi avaliada tanto na forma nativa, como recombinante, conferindo proteção parcial aos bovinos (da Silva Vaz Jr. et al., 1998 e Leal et al., 2006). Em experimentos de imunização, com proteínas obtidas em uma biblioteca de expressão usando cDNA de *I. escapularis*, um dos dois únicos cDNAs que conferiu proteção parcial, codifica uma endopeptidase (Almazán et al., 2003). A Bm91, proteína similar à enzima conversora de angiotensina de mamíferos, é a mais estudada das enzimas com perspectivas de desenvolvimento de vacinas (Riding et al., 1994). Quando a Bm91 foi usada em associação com a Bm 96 em experimento de imunização, conferiu um aumento de aproximadamente duas vezes na proteção conferida pela Bm 86 sozinha (Willadsen et al., 1996). Os diversos trabalhos publicados mostram que as tentativas de usar proteinases e seus inibidores em vacinas têm alcançado resultados positivos. No entanto, como antígenos vacinais estas moléculas apresentam os mesmos problemas que a maioria dos demais antígenos já avaliados: falta de efeito consistente, e ainda mais importante, eficácia insuficiente quando usadas isoladamente (Willadsen, 2006).

Alguns fatores são levantados como responsáveis pela baixa proteção alcançada usando proteinases como antígenos, um deles é a provável redundância de função no organismo, o que pode ser prejudicial ao uso destas moléculas como alvo imunológico, a menos que exista uma ampla reatividade cruzada entre múltiplas proteinases. Outro aspecto que deve ser considerado, é que os anticorpos do hospedeiro, após serem ingeridos pelo carrapato, enfrentarão o intestino do parasita e estarão sujeitos à proteólise. Isto fará com que a eficácia de uma vacina dependa da captação e retenção de anticorpos ainda viáveis, que consigam chegar à hemolinfa, e por fim atingir o alvo.

Estudos têm demonstrado a presença de anticorpos na hemolinfa de parasitas, ainda que em baixas quantidades. Em *R. microplus*, apenas 2 % dos anticorpos ingeridos são encontrados viáveis na hemolinfa de fêmeas ingurgitadas (da Silva Vaz, 1996). Para a mosca parasita de bovinos, *Haematobia irritans*, também foi demonstrado que os anticorpos atravessam o intestino e passam para a hemolinfa (Allingham et al., 1992). Nesta mosca, a concentração de IgG detectada no intestino cai 50% uma hora após uma única ingesta de sangue, enquanto a atividade antígeno específica decai cerca de 70%, no mesmo tempo (Allingham et al. 1998). Problemas como estes podem estar comprometendo a eficácia da VTDCE como antígeno vacinal. Entretanto, experimentos preliminares mostraram a presença de uma atividade enzimática, em extrato de intestino de fêmeas parcialmente alimentadas de *R. microplus*, capaz de hidrolisar imunoglobulinas G de bovinos em pH ácido e básico. Uma estratégia seria, isolar esta proteína e usá-la juntamente com outros antígenos na imunização, para que anticorpos anti-enzima degradadora de IgG pudessem inibir esta atividade.

O emprego da VTDCE como antígeno está fundamentado em sua importância fisiológica, já que esta é a enzima mais ativa na degradação de Vt em ovos de *R. microplus* descrita até o momento. Sendo assim, é possível que variações no protocolo de imunização, como quantidade de antígeno, adjuvante e local do inóculo, possam ser realizadas a fim de melhorar a resposta dos bovinos às imunizações com VTDCE. Como a melhor estratégia para o desenvolvimento de uma vacina eficaz contra carrapatos provavelmente seja o uso de um coquetel de antígenos, sugerimos que o efeito protetor da VTDCE possa ser complementar ao de outras moléculas, sendo esta enzima uma nova candidata à componente de uma vacina multiantigênica.

Resumindo, esta tese de doutorado teve três enfoques: fisiológico, bioquímico e imunológico. Primeiramente, foi investigado o papel do hormônio 20E, e de fatores da hemolinfa, na vitelogênese de carrapatos. O estudo de hormônios em carrapatos é uma área bastante atual que necessita de muita atenção, pois a medida que as pesquisas avançam, torna-se mais evidente que os conhecimentos em insetos, apesar de estarem muito mais adiantados, não podem ser extrapolados para carrapatos. Complementarmente ao controle da síntese e captação da vitelogenina pelos oócitos, estudamos o papel de uma cisteína endopeptidase, VTDCE, na disponibilização deste material de reserva, e as diferentes estratégias envolvidas na garantia de que este processo seja bem sucedido. Por fim, contribuimos com a busca por novos antígenos que possam ser testados para a formulação de um coquetel, que confira a proteção necessária para uma vacina, útil e prática, a ser aplicada no controle do carrapato.

Os carrapatos têm se tornado um problema cada vez mais grave, visto que o uso indiscriminado de produtos químicos tem levado, cada vez mais, ao desenvolvimento de populações resistentes. Estudos como os realizados nesta tese contribuem para elucidar o papel de moléculas, muitas vezes pouco investigadas, e melhorar o entendimento da biologia destes parasitas de modo a possibilitar que novos e melhores métodos de controle sejam desenvolvidos.

5. REFERÊNCIAS:

1. Agbede,R.I. & Kemp,D.H. (1987) Ultrastructure of secretory cells in the gut of the cattle-tick *Boophilus microplus*. *Int.J.Parasitol.* **17**, 1089-1098.
2. Akimenko,Z.A., Ofitserov,V.I., Shaprov,V.V., & Iastrebov,S.I. (1999) HPLC separation and characterization of tick-borne encephalitis and equine Venezuela encephalomyelitis viral proteins. *Bioorg.Khim.* **25**, 253-256.
3. Aljamali,M.N., Sauer,J.R., & Essenberg,R.C. (2002) RNA interference: applicability in tick research. *Exp.Appl.Acarol.* **28**, 89-96.
4. Allingham P.G., East I.J., Kerlin R.L., & Kemp D.H. (1998) Digestion of host immunoglobulin and activity of midgut proteases in the buffalo fly *Haematobia irritans exigua*. *J. Insect Physiol.* **44**, 445-450.
5. Allingham,P.G., Kerlin,R.L., Tellam,R.L., Briscoe,S.J., & Standfast,H.A. (1992) Passage of host immunoglobulin across the mid-gut epithelium into the haemolymph of blood-fed buffalo flies *Haematobia irritans Exigua*. *J.Insect Physiol.* **38**, 9-17.
6. Andreotti,R. (2007) A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. *Exp.Parasitol.* **116**, 66-70.
7. Balashov Y.S. (1972) Bloodsucking ticks (Ixodoidea)—vectors of diseases of man and animals. In: pp. 161-376. Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America.
8. Ben-Yakir,D. (1989) Quantitative studies of host immunoglobulin G in the hemolymph of ticks (Acari). *J.Med.Entomol.* **26**, 243-246.
9. Biesenkamp-Uhe.C, Li Y., Hehnen HR, Sachse K, & Kaltenboeck B. (2007) Therapeutic *Chlamydophila abortus* and *C. pecorum* vaccination transiently

- reduces bovine mastitis associated with *Chlamydomphila* infection. *Infect. Immun.* **75**, 870-877.
10. Boctor,F.N. & Kamel,M.Y. (1976) Purification and Characterization of 2 Lipovitellins from Eggs of Tick, *Dermacentor andersoni*. *Insect Biochem.* **6**, 233-240.
 11. Bowman,A.S., Dillwith,J.W., & Sauer,J.R. (1996) Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitol.Today* **12**, 388-396.
 12. Bownes,M. & Hames,B.D. (1977) Accumulation and Degradation of 3 Major Yolk Proteins in *Drosophila melanogaster*. *J. of Experim. Zool.* **200**, 149-156.
 13. Boyer,K.M., Munford,R.S., Maupin,G.O., Pattison,C.P., Fox,M.D., Barnes,A.M., Jones,W.L., & Maynard,J.E. (1977) Tick-borne relapsing fever: an interstate outbreak originating at Grand Canyon National Park. *Am.J.Epidemiol.* **105**, 469-479.
 14. Braz,G.R., Coelho,H.S., Masuda,H., & Oliveira,P.L. (1999) A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr Biol* **9**, 703-706.
 15. Brouqui,P., Sanogo,Y.O., Caruso,G., Merola,F., & Raoult,D. (2003) *Candidatus Ehrlichia walkerii*: a new *Ehrlichia* detected in *Ixodes ricinus* tick collected from asymptomatic humans in Northern Italy. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **990**, 134-140.
 16. Brown,S.J. & Askenase,P.W. (1986) *Amblyomma americanum*: physiochemical isolation of a protein derived from the tick salivary gland that is capable of inducing immune resistance in guinea pigs. *Exp.Parasitol.* **62**, 40-50.
 17. Canal,C.W., Maia,H.M., Vaz,J., I, 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*. *Exp.Appl.Acarol.* **19**, 325-336.

18. Chino,H., Yamagata,M., & Sato,S. (1977) Further Characterization of Lepidopteran Vitellogenin from Hemolymph and Mature Eggs. *Insect Biochemistry* **7**, 125-131.
19. Chinzei,Y., Chino,H., & Takahashi,K. (1983) Purification and Properties of Vitellogenin and Vitellin from A Tick, *Ornithodoros moubata*. *J. Comp.Physiol.* **152**, 13-21.
20. Chinzei,Y. & Yano,I. (1985) Vitellin Is the Nutrient Reserve During Starvation in the Nymphal Stage of A Tick. *Experientia* **41**, 948-950.
21. Cho,W.L., Deitsch,K.W., & Raikhel,A.S. (1991a) An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 10821-10824.
22. Cho,W.L., Dhadialla,T.S., & Raikhel,A.S. (1991b) Purification and Characterization of A Lysosomal Aspartic Protease with Cathepsin-D Activity from the Mosquito. *Insect Biochem.* **21**, 165-176.
23. Cho,W.L. & Raikhel,A.S. (1992) Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. *J. Biol.Chem.* **267**, 21823-21829.
24. Connat,J.L., Diehl,P.A., & Morici,M. (1984) Metabolism of ecdysteroids during the vitellogenesis of the tick *Ornithodoros moubata* (Ixodoidea, Argasidae): accumulation of apolar metabolites in the eggs. *Gen.Comp Endocrinol.* **56**, 100-110.
25. Connat,J.L., Dotson,E.M., & Diehl,P.A. (1987) Metabolism of ecdysteroids in the female tick *Amblyomma hebraeum* (Ixodoidea, Ixodidae): accumulation of free ecdysone and 20-hydroxyecdysone in the eggs. *J.Comp Physiol [B]* **157**, 689-699.
26. Connat,J.L., Lafont,R., & Diehl,P.A. (1986) Metabolism of [3H]ecdysone by isolated tissues of the female ixodid tick *Amblyomma hebraeum* (Ixodoidea; Ixodidae). *Mol.Cell Endocrinol.* **47**, 257-267.

27. Coons,L.B., L'Amoreaux,W.J., Rosell-Davis,R., & Starr-Spires,L. (1990) Fine structure of the fat body and nephrocytes in the life-stages of *Dermacentor variabilis*. *Exp.Appl.Acarol.* **8**, 125-142.
28. Coons,L.B., Lamoreaux,W.J., Rosell-Davis,R., & Tarnowski,B.I. (1989) Onset of vitellogenin production and vitellogenesis, and their relationship to changes in the midgut epithelium and oocytes in the tick *Dermacentor variabilis*. *Exp.Appl.Acarol.* **6**, 291-305.
29. Crosby,T., Evershed,R.P., Lewis,D., Wigglesworth,K.P., & Rees,H.H. (1986) Identification of ecdysone 22-long-chain fatty acyl esters in newly laid eggs of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Biochem.J.* **240**, 131-138.
30. da Silva Vaz Jr.,I., Martinez,R.H., Oliveira,A., Heck,A., Logullo,C., Gonzales,J.C., Dewes,H., & Masuda,A. (1996) Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet.Parasitol.* **62**, 155-160.
31. da Silva,V.I.J., Logullo,C., Sorgine,M., Velloso,F.F., Rosa,d.L.M., Gonzales,J.C., Masuda,H., Oliveira,P.L., & Masuda,A. (1998) Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Vet Immunol. Immunopathol.* **66**, 331-341.
32. de la,F.J., Almazan,C., Canales,M., Perez de la Lastra JM, Kocan,K.M., & Willadsen,P. (2007a) A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim.Health Res.Rev.* **8**, 23-28.
33. de la,F.J., Kocan,K.M., & Blouin,E.F. (2007b) Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Vet.Res.Commun.* **31 Suppl 1**, 85-90.
34. de la,F.J., Rodriguez,M., & Garcia-Garcia,J.C. (2000) Immunological control of ticks through vaccination with *Boophilus microplus* gut antigens. *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **916**, 617-621.

35. Dees,W.H., Sonenshine,D.E., & Breidling,E. (1984) Ecdysteroids in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), during different periods of tick development. *J.Med.Entomol.* **21**, 514-523.
36. Diehl P.A., Aeschlimann A., & Obenchain.F.D. (1982) Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: *Physiology of ticks*, F.D.Obenchain and R.Galun (eds), pp. 277-350. Pergamon Press, Oxford.
37. Durden,L.A., McLean,R.G., Oliver,J.H., Jr., Ubico,S.R., & James,A.M. (1997) Ticks, Lyme disease spirochetes, trypanosomes, and antibody to encephalitis viruses in wild birds from coastal Georgia and South Carolina. *J.Parasitol.* **83**, 1178-1182.
38. Estrela,A., Seixas,A., & Termignoni,C. (2007) A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comp Biochem.Physiol B Biochem.Mol.Biol.* **148**, 410-416.
39. Ezquieta,B. & Vallejo,C.G. (1986) Lipovitellin Inhibition of Artemia Trypsin-Like Proteinase - A Role for A Storage Protein in Regulating Proteinase Activity During Development. *Arch. Biochem.Biophys.* **250**, 410-417.
40. Fagotto,F. (1995) Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *J.Cell Sci.* **108**, 3645-3647.
41. Fagotto,F. (1991) Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Develop.Growth & Differ.* **33**, 57-66.
42. Fagotto,F. (1990) Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Arch.Insect Biochem.Physiol* **14**, 217-235.
43. Fagotto,F. & Maxfield,F.R. (1994) Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *J.Cell Sci.* **107**, 3325-3337.

44. Fogaça,A.C., Almeida,I.C., Eberlin,M.N., Tanaka,A.S., Bulet,P., & Daffre,S. (2006) Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* **27**, 667-674.
45. Fogaça,A.C., Lorenzini,D.M., Kaku,L.M., Esteves,E., Bulet,P., & Daffre,S. (2004) Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev.Comp Immunol.* **28**, 191-200.
46. Friesen,K.J. & Kaufman,W.R. (2004) Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. *J.Insect Physiol* **50**, 519-529.
47. Friesen,K.J. & Reuben,K.W. (2002) Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *J.Insect Physiol* **48**, 773-782.
48. Garcia-Garcia,J.C., Gonzalez,I.L., Gonzalez,D.M., Valdes,M., Mendez,L., Lamberti,J., D'Agostino,B., Citroni,D., Fragozo,H., Ortiz,M., Rodriguez,M., & de la,F.J. (1999) Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. *Exp.Appl.Acarol.* **23**, 883-895.
49. Germond,J.E., Diehl,P.A., & Morici,M. (1982) Correlations between integument structure and ecdysteroid titers in fifth-stage nymphs of the tick, *Ornithodoros moubata*. *Gen.Comp Endocrinol.* **46**, 255-266.
50. Giorgi F., Bradley J.T., & Nordin (1999) Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron* **30**, 579-596.
51. Gudderra,N.P., Neese,P.A., Sonenshine,D.E., Apperson,C.S., & Roe,R.M. (2001) Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycopheme-carrier protein from the American dog tick, *Dermacentor*

- variabilis* (Acari: Ixodidae) and observations on a similar protein in the soft tick, *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Insect Biochem.Mol.Biol.* **31**, 299-311.
52. Gudderra,N.P., Sonenshine,D.E., Apperson,C.S., & Roe,R.M. (2002) Hemolymph proteins in ticks. *J.Insect Physiol* **48**, 269-278.
53. Guglielmone,A.A., Beati,L., Barros-Battesti,D.M., Labruna,M.B., Nava,S., Venzal,J.M., Mangold,A.J., Szabo,M.P., Martins,J.R., Gonzalez-Acuna,D., & Estrada-Pena,A. (2006) Ticks (Ixodidae) on humans in South America. *Exp Appl.Acarol.* **40**, 83-100.
54. Horak,I.G., Camicas,J.L., & Keirans,J.E. (2002) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Exp.Appl.Acarol.* **28**, 27-54.
55. Horn,S.C. & Arteché,C.C.P. (1985) Situação parasitária da pecuária no Brasil. *A Hora Vet.* **4**, 12-32.
56. Ikeda,M., Yaginuma,T., Kobayashi,M., & Yamashita,O. (1991) cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comp.Biochem.Physiol.* **99**, 405-411.
57. Imamura,S., da Silva,V.J., I, Sugino,M., Ohashi,K., & Onuma,M. (2005) A serine protease inhibitor (serpin) from *Haemaphysalis longicornis* as an anti-tick vaccine. *Vaccine* **23**, 1301-1311.
58. Imamura,S., Namangala,B., Tajima,T., Tembo,M.E., Yasuda,J., Ohashi,K., & Onuma,M. (2006) Two serine protease inhibitors (serpins) that induce a bovine protective immune response against *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Vaccine* **24**, 2230-2237.
59. James,A.M., Zhu,X.X., & Oliver,J.H., Jr. (1997) Vitellogenin and ecdysteroid titers in *Ixodes scapularis* during vitellogenesis. *J.Parasitol.* **83**, 559-563.

60. Jarney, J.M., Riding, G.A., Pearson, R.D., McKenna, R.V., & Willadsen, P. (1995) Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: a "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **25**, 969-974.
61. Johns, R., Sonenshine, D.E., & Hynes, W.L. (2001) Identification of a defensin from the hemolymph of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **31**, 857-865.
62. Jongejans, F. & Uilenberg, G. (2004) The global importance of ticks. *Parasitology* **129**, S3-14.
63. Kageyama, T. & Takahashi, S.Y. (1990) Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *Eur.J.Biochem.* **193**, 203-210.
64. Kaufman, W.R. (1991) Further investigations on the action of ecdysteroids on the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum*. *Exp.Appl.Acarol.* **10**, 259-265.
65. Kaufman, W.R. (2004) Assuring paternity in a promiscuous world: are there lessons for ticks among the insects? *Parasitology* **129**, S145-S160.
66. Kaufman W.R. and Phillips, J.E. (1973) Ion and water balance in the ixodid tick, *Dermacentor andersoni*: I. Routes of ion and water excretion. *J.Exp.Biol.* **58**, 523-536.
67. Keeley, L.L. (1971) Endocrine effects on the biochemical properties of fat body mitochondria from the cockroach, *Blaberus discoidalis*. *J.Insect Physiol* **17**, 1501-1515.
68. Kopacek, P., Weise, C., Saravanan, T., Vitova, K., & Grubhoffer, L. (2000) Characterization of an alpha-macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Eur.J.Biochem.* **267**, 465-475.

69. Kovar,V., Kopacek,P., & Grubhoffer,L. (2000) Isolation and characterization of Dorin M, a lectin from plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **30**, 195-205.
70. Kucera M. & Turner R.B. (1981) Purification and properties of protease inhibitors from developing embryos of *Hemileuca oliviae*. *Biochim.Biophys.Acta.* **611**, 379-383.
71. Leal,A.T., Seixas,A., Pohl,P.C., Ferreira,C.A., Logullo,C., Oliveira,P.L., Farias,S.E., Termignoni,C., da Silva,V.I., Jr., & Masuda,A. (2006a) Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Vet.Immunol.Immunopathol.* **114**, 341-345.
72. Leal,A.T., Seixas,A., Pohl,P.C., Ferreira,C.A., Logullo,C., Oliveira,P.L., Farias,S.E., Termignoni,C., da Silva,V.I., Jr., & Masuda,A. (2006b) Purification and antigenicity of two recombinant forms of *Boophilus microplus* yolk pro-cathepsin expressed in inclusion bodies. *Protein Expr.Purif.* **45**, 107-114.
73. Liu,L. & Rodgers,G.M. (1996) Characterization of an inducible endothelial cell prothrombin activator. *Blood* **88**, 2989-2994.
74. Logullo,C., Moraes,J., Dansa-Petretski,M., Vaz,I.S., 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 Biochem.Mol.Biol.* **32**, 1805-1811.
75. Logullo,C., Vaz,I.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. (1998) Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology* **116**, 525-532.
76. Lomas,L.O., Gelman,D., & Kaufman,W.R. (1998) Ecdysteroid regulation of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*: a

- reconciliation of in vivo and in vitro observations. *Gen.Comp Endocrinol.* **109**, 200-211.
77. Lomas,L.O. & Kaufman,W.R. (1992) An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Arch.Insect Biochem.Physiol* **21**, 169-178.
78. Mallya,S.K., Partin,J.S., Valdizan,M.C., & Lennarz,W.J. (1992) Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *J.Cell Biol.* **117**, 1211-1221.
79. Mao,H. & Kaufman,W.R. (1999) Profile of the ecdysteroid hormone and its receptor in the salivary gland of the adult female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **29**, 33-42.
80. Masuda,H. & Oliveira,P.L. (1985) Characterization of vitellin and vitellogenin from *Rhodnius prolixus* - Identification of phosphorylated compounds in the molecule. *Insect Biochemistry* **15**, 543-&.
81. Maya-Monteiro,C.M., Daffre,S., Logullo,C., Lara,F.A., Alves,E.W., Capurro,M.L., Zingali,R., Almeida,I.C., & Oliveira,P.L. (2000) HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J.Biol.Chem.* **275**, 36584-36589.
82. Medina,M., Leon,P., & Vallejo,C.G. (1988) Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Arch.Biochem.Biophys.* **263**, 355-363.
83. Minoura,H., Chinzei,Y., & Kitamura,S. (1985) *Ornithodoros moubata*: host immunoglobulin G in tick hemolymph. *Exp.Parasitol.* **60**, 355-363.
84. Montenegro-James,S. (1992) Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* **87**, 27-36.

85. Mulenga,A., Sugimoto,C., Sako,Y., Ohashi,K., Musoke,A., Shubash,M., & Onuma,M. (1999) Molecular characterization of a *Haemophysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits. *Infect.Immun.* **67**, 1652-1658.
86. Murrell,A. & Barker,S.C. (2003) Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Syst.Parasitol.* **56**, 169-172.
87. Nakajima,Y., Ogihara,K., Taylor,D., & Yamakawa,M. (2003) Antibacterial hemoglobin fragments from the midgut of the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *J.Med.Entomol.* **40**, 78-81.
88. Neese,P.A., Sonenshine,E., Kallapur,V.L., Apperson,C.S., & Roe,R.M. (2000a) Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari:Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari:Argasidae). *J.Insect Physiol* **46**, 477-490.
89. Neese,P.A., Sonenshine,E., Kallapur,V.L., Apperson,C.S., & Roe,R.M. (2000b) Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari:Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari:Argasidae). *J.Insect Physiol.* **46**, 477-490.
90. Nordin,J.H., Beaudoin,E.L., & Liu,X.D. (1990) Proteolytic Processing of *Blattella germanica* Vitellin During Early Embryo Development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology* **15**, 119-135.
91. Oliver,J.H., Jr., Pound,J.M., & Andrews,R.H. (1984) Induction of egg maturation and oviposition in the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *J.Parasitol.* **70**, 337-342.
92. Pappas,P.J. & Oliver,J.H., Jr. (1972) Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). *J.Med.Entomol.* **9**, 47-50.

93. Patarroyo,J.H., Portela,R.W., De Castro,R.O., Couto,P.J., Guzman,F., Patarroyo,M.E., Vargas,M.I., Prates,A.A., & Dias Mendes,M.A. (2002) Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet.Immunol.Immunopathol.* **88**, 163-172.
94. Pinkerton,A.M., Hall,J.D., & Shepherd,J. (1982) Scanning electron microscopy of post-ejaculatory spermiogenesis in the tick *Ornithodoros moubata*. *Tissue Cell* **14**, 785-797.
95. Pound,J.M. & Oliver,J.H., Jr. (1979) Juvenile Hormone: Evidence of Its Role in the Reproduction of Ticks. *Science* **206**, 355-357.
96. Rees,H.H. (2004) Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology* **129**, S127-S143.
97. Ribolla,P.E. & De Bianchi,A.G. (1995) Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. *Insect Biochem.Mol.Biol.* **25**, 1011-1017.
98. Riding,G.A., Jarmey,J., McKenna,R.V., Pearson,R., Cobon,G.S., & Willadsen,P. (1994a) A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*. Purification, localization, and possible function. *J.Immunol.* **153**, 5158-5166.
99. Rodriguez,M., Massard,C.L., da Fonseca,A.H., Ramos,N.F., Machado,H., Labarta,V., & de la,F.J. (1995b) Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. *Vaccine* **13**, 1804-1808.
100. Rosell,R. & Coons,L.B. (1991a) Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *J.Med.Entomol.* **28**, 41-44.
101. Rosell,R. & Coons,L.B. (1991b) Purification and Partial Characterization of Vitellin from the Eggs of the Hard Tick, *Dermacentor variabilis*. *Insect Biochemistry* **21**, 871-885.

102. Sahli,R., Germond,J.E., & Diehl,P.A. (1985) *Ornithodoros moubata*: spermateleosis and secretory activity of the sperm. *Exp.Parasitol.* **60**, 383-395.
103. Saito,K.C., Bechara,G.H., Nunes,E.T., de Oliveira,P.R., Denardi,S.E., & Mathias,M.I. (2005) Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). *Vet.Parasitol.* **129**, 299-311.
104. Salisbury,N., Calaprice,N., & Triplett,E.L. (1980) Amphibian Embryo Protease Inhibitors .6. Maternal Origin and Identity with Lipovitellin Heavy Subunit. *Cell Differentiation* **9**, 219-227.
105. Schriefer,M.E., Beveridge,M., Sonenshine,D.E., Homsher,P.J., Carson,K.A., & Weidman,C.S. (1987) Evidence of ecdysteroid production by tick (Acari: Ixodidae) fat-body tissues in vitro. *J.Med.Entomol.* **24**, 295-302.
106. Seixas,A., dos Santos,P.C., Velloso,F.F., da Silva,V.I., Jr., Masuda,A., Horn,F., & Termignoni,C. (2003) A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology* **126**, 155-163.
107. Shanbaky,N.M., Mansour,M.M., Main,A.J., & Helmy,N. (1990) Vitellogenic and Nonvitellogenic Proteins in Hemolymph, Ovaries, and Eggs of *Argas (Argas) hermanni* (Acari: Argasidae). *J.Med.Entomol.* **27**, 986-992.
108. Sonenshine D.E. (1991) Biology of Ticks. In: Oxford University Press, Oxford, UK.
109. 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 the hard tick *Boophilus microplus*. *J.Biol.Chem.* **275**, 28659-28665.
110. Stanley,D. (2006) Prostaglandins and Other Eicosanoids in Insects: Biological Significance. *Annu.Rev.Entomol.* **51**, 25–44

111. Sugino,M., Imamura,S., Mulenga,A., Nakajima,M., Tsuda,A., Ohashi,K., & Onuma,M. (2003) A serine proteinase inhibitor (serpin) from ixodid tick *Haemaphysalis longicornis*; cloning and preliminary assessment of its suitability as a candidate for a tick vaccine. *Vaccine* **21**, 2844-2851.
112. Tatchell,R.J. (1971) Electrophoretic studies on the proteins on the haemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Insect Biochem.* **1**, 47-55.
113. Thompson,D.M., Khalil,S.M., Jeffers,L.A., Ananthapadmanaban,U., Sonenshine,D.E., Mitchell,R.D., Osgood,C.J., Apperson,C.S., & Michael,R.R. (2005) In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *J Insect Physiol* **51**, 1105-1116.
114. Tsuda,A., Mulenga,A., Sugimoto,C., Nakajima,M., Ohashi,K., & Onuma,M. (2001) cDNA cloning, characterization and vaccine effect analysis of *Haemaphysalis longicornis* tick saliva proteins. *Vaccine* **19**, 4287-4296.
115. Wang,H. & Nuttall,P.A. (1994) Excretion of host immunoglobulin in tick saliva and detection of IgG-binding proteins in tick haemolymph and salivary glands. *Parasitology* **109**, 525-530.
116. Wang,H. & Nuttall,P.A. (1999) Immunoglobulin-binding proteins in ticks: new target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell Mol.Life Sci.* **56**, 286-295.
117. Weiss,B.L. & Kaufman,W.R. (2004) Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**, 5874-5879.
118. Willadsen,P. (2004a) Anti-tick vaccines. *Parasitology* **129**, S367-S387.
119. Willadsen,P. (2004b) Veterinary parasitic vaccines: pitfalls and future directions. *Trends Parasitol.* **20**, 488-492.

120. Willadsen,P. (2006a) Tick control: thoughts on a research agenda. *Vet.Parasitol.* **138**, 161-168.
121. Willadsen,P. (2006b) Vaccination against ectoparasites. *Parasitology* **133**, S9-S25.
122. Willadsen,P., Bird,P., Cobon,G.S., & Hungerford,J. (1995) Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* **110** , S43-S50.
123. Willadsen,P., Riding,G.A., McKenna,R.V., Kemp,D.H., Tellam,R.L., Nielsen,J.N., Lahnstein,J., Cobon,G.S., & Gough,J.M. (1989) Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J.Immunol.* **143**, 1346-1351.
124. Willadsen,P., Smith,D., Cobon,G., & McKenna,R.V. (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* **18**, 241-246.
125. Yamashita,O. & Irie,K. (1980) Larval Hatching from Vitellogenin-Deficient Eggs Developed in Male Hosts of the Silkworm. *Nature* **283**, 385-386.
126. Zhu,X.X., Oliver,J.H., Jr., & Dotson,E.M. (1991) Epidermis as the source of ecdysone in an argasid tick. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 3744-3747.

6. ANEXOS

6.1 Pedido de patente depositado no Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI): **Cisteíno protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato**
N° PI0701760-0

REIVINDICAÇÃO

1. "Cisteíno protease ou peptídeos dela derivados para imunização contra o carrapato", caracterizada pela administração à bovinos, em qualquer dosagem da mistura, de antígeno ou de mistura de antígenos contendo cisteíno protease, inclusive seus variantes, e/ou contendo peptídeos derivados desta proteína, denominada VTDCE ("Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase"), do carrapato bovino, *Boophilus microplus*, pelo uso da proteína inteira e ou de partes dela, quer estes antígenos ou partes deles tenham sido obtidos por extração e purificação de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e purificação de órgãos de carrapatos ou produzidos por síntese química ou produzidos em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante.

RESUMO

"Cisteíno protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato", caracterizada como uma vacina contra o carrapato bovino contendo uma cisteíno protease encontrada, principalmente, no ovo, obtida por extração e cromatografia de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos ou produzidos em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante. O uso da proteína como imunógeno em bovino resultou em redução da viabilidade dos carrapatos de forma que o antígeno pode ser utilizado como vacina, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos, para prevenir a infestação, por carrapatos de bovinos e outras espécies de animais.

"Cisteíno protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato".

Refere-se o presente invento ao isolamento, caracterização e uso como antígeno vacinal de uma proteína do carrapato bovino, *Boophilus microplus*. A proteína isolada, denominada VTDCE, é uma cisteíno protease encontrada, principalmente, no ovo. O uso da proteína como imunógeno em bovinos resulta em redução da viabilidade dos carrapatos, de forma que a proteína ou peptídeos dela derivados, obtida por extração e cromatografia de ovos, larvas e qualquer outro estágio, tecidos e/ou fluídos de carrapatos, por extração e cromatografia de órgãos de carrapatos, produzida por síntese química ou produzida em outros organismos por meio de técnicas de DNA recombinante, pode ser utilizada como vacina para prevenir a infestação, isoladamente ou em conjunto com outros antígenos já descritos ou a serem descritos.

As perdas econômicas causadas pelo *B. microplus* são estimadas em quase 1 bilhão de dólares norte-americanos ao ano no Brasil, quando contabilizados a queda na produção de carne e leite, a mortalidade, a redução da natalidade, os gastos no seu controle e os prejuízos decorrentes da transmissão dos protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* e

da riquetsia *Anaplasma marginale*, agentes que causam a Tristeza Parasitária Bovina.

A possibilidade do uso de vacinas para o controle de parasitas tem sido alvo de estudos, especialmente no que se refere a *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti*, *Polyplax serrata*, *Stomoxys calcitrans*, *B. microplus* e *Amblyomma americanum*. No caso do carrapato *B. microplus*, as propostas para o desenvolvimento de vacinas têm por base o fato de que, após repetidas infestações, bovinos desenvolvem certo grau de resistência a novas infestações. O uso de vacinas contornaria o problema da resistência a drogas e ainda reduziria a possibilidade da presença de resíduos no leite e na carne.

Os trabalhos de desenvolvimento de vacinas contra *B. microplus* tiveram grande avanço com o achado de que a inoculação de uma fração purificada obtida de fêmeas parcialmente ingurgitadas era capaz de provocar diminuição no número de carrapatos que completavam o ciclo no bovino. Um antígeno presente nessa fração antigênica foi purificado e identificado como sendo uma glicoproteína de massa molecular de 89 KDa ligada à membrana. Essa proteína antigênica foi denominada Bm86. O gene da Bm86 foi clonado e expresso em *Escherichia coli*, *Aspergillus nidulans* e *A. niger*.

A proteína Bm86 é a base de duas vacinas comerciais lançadas no mercado. Essas vacinas, embora baseadas na proteína Bm86, utilizam proteínas de fusão diferentes, a proteína da TickGard[®] é obtida em *E. Coli* e a da Gavac[®] em *Pichia pastoris*. Essas vacinas, entretanto, não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas. Portanto, até que sejam descobertos novos antígenos capazes de aumentar o grau de proteção, essas vacinas parecem servir apenas para aumentar o intervalo entre os tratamentos com acaricidas.

Baseados em observações que a vacinação com material purificado de carrapato contendo outros componentes, além da Bm86, induz uma proteção mais eficiente que aquela obtida somente pela vacinação com Bm86 foi possível purificar, de fêmeas adultas semi-ingurgitadas de *B. microplus*, outra proteína, denominada Bm91, com capacidade imunoprotetora. A Bm91 recombinante é capaz de aumentar a proteção induzida pela vacinação com a Bm86 recombinante. Apesar do aumento ser pequeno, a resposta produzida contra a Bm91 não interfere na resposta contra a Bm86, indicando a possibilidade do uso de uma vacina poliantigênica.

No Brasil, pesquisadores do Centro de Biotecnologia e da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio

Grande do Sul, em associação com pesquisadores do Departamento de Bioquímica Médica da Universidade Federal do Rio de Janeiro isolaram, a partir de ovos de *B. microplus*, uma glicolipoproteína de 50 KDa, denominada BYC - "Boophilus Yolk pro-Cathepsin". A resposta imune induzida pela BYC afetou o desenvolvimento dos carrapatos que infestaram os bovinos imunizados. A THAP outra protease aspártica composta de dois peptídeos de massas moleculares de, aproximadamente, 32 KDa e 37 KDa, purificada de ovos de *B. microplus*, também foi capaz de desenvolver uma resposta imune em bovinos e afetar os carrapatos que infestaram esses bovinos imunizados. Apesar do fato de que tanto a BYC como a THAP são aspartico proteases (ou precursores) encontradas no ovo do carrapato, a possibilidade de que as duas sejam o mesmo antígeno pode ser descartada, uma vez que anticorpos policlonais contra THAP não reconhecem BYC em ensaio do tipo Western Blot. De outro lado, o experimento inverso, empregando o mesmo ensaio utilizando anticorpos policlonais contra BYC mostrou ausência de reatividade cruzada contra THAP, confirmando que se tratam de antígenos distintos. Já a VTDCE, alvo desta patente, também presente em ovos de *B. microplus*, difere destas duas enzimas (BYC e THAP) por inúmeras

características moleculares e funcionais, pertencendo a uma classe distinta de proteases: cisteíno proteases.

A utilização dos modelos matemáticos permitem inferir o impacto que o uso de uma vacina teria sobre populações de *B. microplus* e assim podem auxiliar na decisão quanto as estratégias a serem utilizadas para o controle do carrapato. Além disso, a obtenção de novos antígenos que possam funcionar como alternativa e/ou complementar a ação daqueles já descritos constitui avanço importante no desenvolvimento de vacinas eficazes.

O antígeno isolado é uma proteína relativamente abundante no ovo do *B. microplus* e presente na hemolinfa e em diversos tecidos, incluindo ovário, corpo gorduroso. A cisteíno proteinase de *B. microplus* (VTDCE) foi purificada a partir de ovos, por meio de duas cromatografias de troca aniônica em pH neutro e ácido, cromatografia de gel filtração e uma etapa de autólise. Para a purificação, ovos foram homogeneizados, o homogenizado foi centrifugado e filtrado através de uma sequência de filtros (AP20, 0,22 e 0,45 μm). A fase protéica solúvel foi aplicada em uma coluna de troca aniônica em resina Mono-Q (ou HiTrap-Q ou similares) equilibrada em tampão fosfato de sódio 10 mM pH 7,0 e eluída com gradiente de fosfato de sódio 10 mM contendo de 0 a 0,8 M de NaCl. As frações contendo VTDCE

foram concentradas acidificadas com ácido cítrico (1 M) até pH 3,5-4,0 e incubadas a 37° C por aproximadamente 3 horas. A amostra foi centrifugada a 3000 g e o sobrenadante concentrado até 200 µl e aplicado em coluna de gel filtração Superdex-75 previamente equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0. As frações contendo VTDCE foram reunidas e aplicadas em coluna de troca aniônica (mono-Q) equilibrada em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0 e eluída com um gradiente de 0 a 0,8 M de NaCl em tampão acetato de sódio 10 mM pH 4,0. A proteína purificada foi dialisada contra água e concentrada.

A protease foi encontrada na forma de dois peptídeos de massas moleculares de, aproximadamente, 22 KDa e 17 KDa, correspondentes a duas subunidades da mesma proteína. Por degradação automatizada de Edman em um microsequenciador de aminoácidos Perkin-Elmer Corporation, foi identificada a seqüência de aminoácidos VDDPDIIAFDDVKGILMRRVREKA presente na proteína, podendo apresentar variantes com a substituição de um ou mais aminoácidos.

Foi observado que, em pH ácido, a VTDCE apresenta alta atividade proteolítica contra vitelina e outros substratos sintéticos, como N-Cbz-Phe-Arg-MCA, sendo essa atividade inibida pela presença de E-64 (L-trans-epoxisucinil-L-

leucilamido(4-guanidino)-butano) indicando tratar-se de uma cisteíno protease.

Por SDS-PAGE e western-blot, foi observada a presença de VTDCE durante toda embriogênese do carrapato e durante o desenvolvimento larval, assim como na hemolinfa, o que indica um sítio de síntese extra ovariano. A presença da VTDCE foi também observada em diferentes órgãos do carrapato (aparelho digestivo, ovário, corpo gorduroso, glândula salivar e singânglio).

A VTDCE além da alta capacidade de hidrolisar vitelina, a principal proteína de reserva do carrapato, apresenta-se associada a esta proteína o que foi comprovado por ensaios usando a enzima marcada com iodo radioativo. Essa associação pode ser rompida por incubação em pH ácido, quando a VT é hidrolisada e libera a enzima livre.

Para testar a capacidade da VTDCE de induzir uma resposta imunológica protetora, bovinos com idade de 14 meses foram inoculados por via intramuscular por 5 vezes com intervalos de 10 dias entre cada inoculação com 100 µg de VTDCE suspensa no adjuvante Montanide. Após 10 dias da última inoculação os 4 bovinos imunizados e 4 bovinos controles (inoculados apenas com o adjuvante em PBS) foram infestados com 20.000 larvas de *B. microplus*. Os animais foram mantidos em baias individuais e os carrapatos que

completavam o ciclo biológico no hospedeiro eram coletados, contados e pesados. Uma amostra de 5 g de fêmeas ingurgitadas, obtidas de cada bovino eram colocadas e mantidas em estufa a 28° C com 85% de umidade relativa do ar para realizarem a postura, a massa de ovos posta foi pesada e os ovos incubados, após o final da eclosão as larvas foram separadas e pesadas.

A eficácia da VTDCE em induzir uma resposta imunológica protetora em bovinos foi calculada segundo a fórmula:

$$\text{eficácia (\%)} = 100[1 - (\text{CRT} \times \text{CRO} \times \text{CRF})], \text{ onde:}$$

CRT: corresponde ao coeficiente de redução do número de teleóginas;

CRO: corresponde ao coeficiente de redução da ovopostura e;

CRF: corresponde ao coeficiente de redução da fertilidade dos ovos.

O coeficiente de redução do número de fêmeas ingurgitadas é calculado como a razão entre o número médio de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados (controle). O coeficiente de redução de ovoposição é calculado como a razão entre o peso médio da postura de todas as fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos vacinados e o peso médio da

postura de todas as fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo nos bovinos não vacinados. O coeficiente de redução de fertilidade dos ovos é calculado como a razão entre a média da soma do peso de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em animais vacinados e a média da soma do peso de ovos férteis obtidos de 5,0 gramas de ovos provenientes de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em bovinos não vacinados.

O número de fêmeas ingurgitadas que completaram o ciclo em cada bovino, o índice de capacidade de postura das fêmeas ingurgitadas, tomadas como amostra, que completaram o ciclo em cada bovino (5,0 gramas de fêmeas ingurgitadas) e o índice de fertilidade dos ovos provenientes da postura das teleóginas tomadas como amostra que completaram o ciclo em cada bovino estão colocados na tabela I.

Tabela I: Resultado da vacinação de bovinos e desafio com carrapatos.

Grupo	Animal	Número de carrapatos (n)	Índice	
			Capacidade de postura ^b	Fertilidade dos ovos ^c
Controle	361	2415	0,415	0,330
	362	1915	0,399	0,320
	367	1198	0,433	0,286
	368	3245	0,402	0,309
Média		2193	0,410	0,311
±DP		861	0,020	0,019
Vacinado	369	2019	0,400	0,294
	370	1584	0,407	0,357
	383	1303	0,404	0,276
	384	2586	0,388	0,258
Média		1873	0,400	0,296
±DP		559	0,010	0,043
Diferença (%) ^a		14,6	3,06	4,81

a) Diferença (%) = $100 \times (1 - (\text{valor médio do grupo vacinado} / \text{valor médio do grupo controle}))$

b) Proporção entre peso das fêmeas e peso dos ovos.

c) Proporção entre peso dos ovos férteis e peso dos ovos.

D.P. = Desvio Padrão.

Ao Instituto da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de uma patente na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: Adriana Seixas

1.2 Qualificação: Bióloga

1.3 CGC/CPF: 95468706091

1.4 Endereço completo: Av. Jacuí 618, apto 304. Bairro Cristal. Porto Alegre. RS. Brasil. CEP 90810-150.

1.5 Telefone: (51) 32428489

FAX: (51) 32262187

(X) continua em

folha anexa

2. Natureza:

2.1 Invenção 2.1.1. Certificado de Adição 2.2 Modelo de Utilidade

Escreva, obrigatoriamente e pro extenso, a Natureza desejada: Invenção

3. Título da Invenção, do Modelo de Utilidade ou do Certificado de Adição (54):

“Cisteíno protease ou peptídeos derivados utilizados para imunização contra o carrapato”

() continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão** do pedido nº _____, de / /

5. **Prioridade Interna** - o depositante reivindica a seguinte prioridade:

Nº de depósito

Data de Depósito / / / (66)

6. **Prioridade**- o depositante reivindica a(s) seguinte(s) prioridade(s):

País ou organização de origem	Número do depósito	Data de depósito

() continua em folha anexa

Formulário 1.01- Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 1/2)

- 7. Inventor (72):**
 Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seu(s) nome(s)
 (art. 6º da LPI e item 1.1 do Ano Normativo nº 127/97)
- 7.1 Nome: Adriana Seixas
- 7.2 Qualificação: Bióloga.
- 7.3 Endereço: Av. Jacuí 618, apto 304. Bairro Cristal. Porto Alegre. RS. Brasil.
- 7.4 CEP: 90810-150. 7.5 Telefone (51) 32428489
 continua em folha anexa

8. Declaração na forma do item 3.2 do Ano Normativo nº 127/97:

em anexo

- 9. Declaração de divulgação anterior não prejudicial** (Período de graça):
 (art. 12 da LPI e item 2 do Ano Normativo nº 127/97)

Avaliação da proteína VTDCE como imunógeno em uma vacina para bovinos contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Seixas, A.; Leal, A. T.; Da Silva Vaz Jr., I.; Masuda, A.; Termignoni, C. XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latino-Americano de Rickettsioses. 3-6 de Setembro de 2006. Livro de resumos pág. 236.

em anexo

10. Procurador (74):

- 10.1 Nome e CPF/CGC: Carlos Termignoni CPF.: 183912060-68
- 10.2 Endereço: Rua Marquês do Pombal, 1938/apto 701. , Porto Alegre, RS. Brasil.
- 10.3 CEP:90540-000 10.4 Telefone (51)33421444

11. Documentos anexados (assinale e indique também o número de folhas):
 (Deverá ser indicado o nº total de somente uma das vias de cada documento)

11.1 Guia de recolhimento	1 fls.	11.5 Relatório descritivo	9 fls.
11.2 Procuração	fls.	11.6 Reivindicações	1 fls.
11.3 Documentos de prioridade	fls.	11.7 Desenhos	fls.
11.4 Doc. de contrato de Trabalho	fls.	11.8 Resumo	1 fls.
11.9 Outros (especificar) continuação de depositante, inventores e declaração			5 fls.
11.10 Total de folhas anexadas			20 fls.

12. Declaro, sob penas da Lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras

Porto alegre, 3 de julho de 2007.

Adriana Seixas

Formulário 1.01- Depósito de Pedido de Patente ou de Certificado de Adição (folha 2/2)

ANEXO 1

Continuação:

1a. Depositante (71):

1.1a Nome: Aoi Masuda

1.2a Qualificação: Biomédica - Professora Universitária

1.3a CGC/CPF: 686882028-34

1.4a Endereço completo: Rua Farias Santos 589/apto 301, 90670-150, Porto Alegre, RS. Brasil.

1.5a Telefone: (51) 33883985

FAX: (51) 33087309

1.1b Nome: Carlos Termignoni

1.2b Qualificação: Veterinário - Professor Universitário

1.3b CGC/CPF: 183912060-68

1.4b Endereço completo: Rua Marquês do Pombal, 1938/apto 701, 90540-000, Porto Alegre, RS. Brasil.

1.5b Telefone: (51) 33421444

FAX: (51) 33087309

1.1c Nome: Itabajara da Silva Vaz Junior

1.2c Qualificação: Veterinário - Professor Universitário

1.3c CGC/CPF: 485117220-68

1.4c Endereço completo: Rua Jari 619, Torre 3 apto 504, 91350-170, Porto Alegre, RS. Brasil.

1.5c Telefone: (51) 30228261

FAX: (51) 33087309 Inventores:

6.2 Curriculum Vitae

Adriana Seixas

Curriculum vitae

March, 2008

Personal details

Name: Adriana Seixas

Date and place of birth: May 2nd, 1979
Taquari, RS, Brazil

Nationality: Brazilian

Home address: Rua Jacuí, 618 ap.304
Porto Alegre, RS CEP 90810-150
Brazil
Phone: -55 51 3273 2023

Office address: Centro de Biotecnologia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Av. Bento Gonçalves, 9500 Prédio 43431
Porto Alegre - RS CEP 91501-970
Brazil
Phone: -55 51 3308 6082

E-mail: adriana@cbiot.ufrgs.br, adriseixas@hotmail.com

Education

- 2004-2008** **PhD in Cellular and Molecular Biology.** Student at Cellular and Molecular Biology Program, Centre for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Scholarship granted by CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Thesis title: "Tick reproduction and evaluation of a prominent enzyme in this process as a vaccinal antigen against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". Supervisor: Professor Carlos Termignoni.
- 2002-2003** **MSc Degree in Cellular and Molecular Biology.** Student at Cellular and Molecular Biology Program, Centre for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Scholarship granted by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior). Thesis title: "Cysteine endopeptidases from the cattle tick *Boophilus microplus* egg and Larva". Supervisor: Professor Carlos Termignoni.
- 1997-2001** **BSc Degree in Biological Sciences,** College of Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Research activities

- 2006-2007** **Visiting student at University of Alberta.** Between Nov/2006 and Jun/2007 I worked as a visiting PhD student at University of Alberta in Edmonton, Canada. Project: "Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph factors on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*". Scholarship granted by CNPq. Supervisor: Professor Reuben Kaufman.
- 1999- 2002** **Research Student.** Centre for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Scholarship for Initiation in Scientific Research, granted by CNPq. Research project: "Purification and characterization of cysteine endopeptidases from *Boophilus microplus* eggs and larva". Supervisor: Professor Carlos Termignoni.
- 1998- 1999** **Research Student.** Centre for Biotechnology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil. Research project: "Arylamidases from the cattle tick *Boophilus microplus*" Supervisor: Dr. Marc François Richter.

Research Experience

- Experience with a wide range of experimental techniques:
- Protein purification and analysis (including chromatography - HPLC, FPLC, electrophoresis, centrifugation, Western blot analysis, ELISA)
 - Enzymatic assays with fluorogenic and chromogenic substrates (experience with SpectraMax)
 - Two-dimensional gel electrophoresis
 - Preparation of proteins for Mass Spectrometry Analysis (Protein spot identification, in-gel digestion, and peptide extraction).
 - Molecular techniques including PCR, and cloning
 - Tissue culture
 - Antibody production and purification
 - Immunohistochemistry and confocal microscopy
 - Microscopic dissections
 - *In vivo* assays with ticks
- As senior graduate student, responsibilities included:
- Organization and maintenance of the laboratory.
Maintenance of colony of cattle ticks (*Rhipicephalus Boophilus microplus* and *Amblyomma hebraeum*).
Coordination and development of undergraduate research projects.
Training new individuals in common laboratory procedures.

Publications

- SEIXAS**, Adriana, FRIESEN, Kevin J., and KAUFMAN, Reuben W. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph factors on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. Journal of Insect Physiology. Submitted.
- SEIXAS**, Adriana; LEAL, Alexandre Trindade, NASCIMENTO-SILVA, Maria Clara L., MASUDA, Aoi, TERMIGNONI, Carlos, DA SILVA VAZ JR, Itabajara. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). Veterinary Immunology and Immunopathology. Partially accepted.
- ESTRELA, Andréia; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. 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, p. 410-116, **2007**.
- LEAL, Alexandre Trindade; **SEIXAS**, Adriana; POHL Paula Cristina; FERREIRA, Carlos Alexandre; LOGULLO, Carlos; OLIVEIRA, Pedro Lagerblad; FARIAS, Sandra Estrasulas; TERMIGNONI, Carlos; DA SILVA VAZ JR, Itabajara; MASUDA, Aoi. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. Veterinary Immunology Immunopathology, v. 114, p. 341-345, **2006**.
- SEIXAS**, Adriana; PONTES, Emerson Guedes; GONDIN, Katia; LARA, Flávio; TERMIGNONI, Carlos. *Boophilus microplus* cysteine endopeptidase: immunolocalization and association with vitellin. In: 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens Proceedings, p. 205-209, **2005**.
- SEIXAS**, Adriana; DOS SANTOS, Patrícia Coutinho; VELLOSO, Fernando; DA SILVA VAZ JR, Itabajara; MASUDA, Aoi; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. Parasitology, v. 126, p. 155-163, **2003**.

Abstracts and Presentations

- ESTRELA, Andréia Bergamo; **SEIXAS**, Adriana; CEOLATO, Juliana; TEIXEIRA, Vivian Oliveira; TERMIGNONI, Carlos. "Digestive enzyme association in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut". In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference. Salvador, BA, Brazil. May (21-27), **2007**.
- TEIXEIRA, Vivian Oliveira; ESTRELA, Andréia Bergamo; CEOLATO, Juliana, **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. "IgG degrading activity of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut". In: XXXVI Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology and 10th International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB) Conference. Salvador, BA, Brazil. May (21-27), **2007**.
- SEIXAS**, Adriana; LEAL, Alexandre Trindade; DA SILVA VAZ JR.; Itabajara; MASUDA, Aoi; TERMIGNONI, Carlos. "Avaliação da proteína VTDCE como imunógeno em uma vacina para bovinos contra o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*". In: 14^o Brazilian Congress of Veterinary Parasitology. Ribeirão Preto, SP, Brazil. September (3-6), **2006**.
- ESTRELA, Andréia Bergamo; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. "Degradação de vitelina e hemoglobina por cisteíno endopeptidase no carrapato bovino *Rhipicephalus (Boophilus)*

- microplus". In: 14^o Brazilian Congress of Veterinary Parasitology. Ribeirão Preto, SP, Brazil. September (3-6), **2006**.
- SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. Atividade cisteíno endopeptidásica em Diferentes Tecidos do Carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). In: I Brazilian Symposium of Acarology. Viçosa, MG, Brazil. May (11-12), 2006.
- LEAL, Alexandre Trindade; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos; DA SILVA VAZ JR, Itabajara; MASUDA, Aoi. "Cattle vaccination with a *Boophilus* Yolk pro-cathepsin recombinant expressed in *E. coli*". In: XIX Brazilian congress of Parasitology. Porto Alegre, RS, Brazil. October- november (31-04), **2005**.
- ESTRELA, Andréia Bergamo; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. "Vitellin degradation in *Boophilus microplus* larvae: action of a cysteine endopeptidase". In: XIX Brazilian congress of Parasitology. Porto Alegre, RS, Brazil. October- november (31-04), **2005**.
- CEOLATO, Juliana Casagrande; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. "Characterisation of a *Boophilus microplus* trypsin inhibitor and its relationship with VTDCE". In: XIX Brazilian congress of Parasitology. Porto Alegre, RS, Brazil. October- november (31-04), **2005**.
- SEIXAS**, Adriana; PONTES, Emerson Guedes; GONDIN, Katia; LARA, Flávio; TERMIGNONI, Carlos. "*Boophilus microplus* cysteine endopeptidase: immunolocalization and association with vitellin". In: 5th International Conference on Ticks and Tick-Borne Pathogens. Neuchatêl, Switzerland. August – September (29-02), **2005**.
- SEIXAS**, Adriana; ESTRELA, Andréia Bergamo; TERMIGNONI, Carlos. "*Boophilus microplus* larvae cysteine endopeptidase: an improved purification protocol". In: XXXIV Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Águas de Lindóia, SP, Brazil. July (02-05), **2005**.
- SEIXAS**, Adriana; CEOLATO, Juliana Casagrande; ESTRELA, Andréia Bergamo; TERMIGNONI, Carlos. "*Boophilus microplus* vitellin degrading cysteine endopeptidase and its possible physiological inhibitor". In: XXXIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (15-18), **2004**.
- SEIXAS**, Adriana; ESTRELA, Andréia, HORN, Fabiana. "Vitellin Degrading Cysteine Endopeptidase distribution in *Boophilus microplus* tissues, eggs and larvae" In: XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (17-20), **2003**.
- ESTRELA, Andréia; **SEIXAS**, Adriana; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. "A Cysteine endopeptidase from cattle tick *Boophilus microplus* larvae degrading vitellin" In: XXXII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (17-20), **2003**.
- SEIXAS**, Adriana; HORN, Fabiana; Termignoni, Carlos. "Enzymes of *Boophilus microplus* yolk degradation. XVIII Meeting of the Experimental Biology Society Federation (FeSBE). Pinhais, PR, Brazil. August (27-30), **2003**.
- SEIXAS**, Adriana, PONTES, Emerson Guedes; GONDIN, Katia; OLIVEIRA, Pedro Lagerblad; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. "A cysteine endopeptidase from *Boophilus microplus* likely involved in vitellin degradation during embryogenesis". In: XXXI Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (18-21), **2002**.

- TERMIGNONI, Carlos; **SEIXAS**, Adriana. Purification and Characterization of a cysteine endopeptidase from *Boophilus microplus* that degrades vitellin. XII Brazilian Congress of Veterinary Parasitology. Rio de Janeiro, RJ, Brazil. September (01-05), **2002**.
- SEIXAS**, Adriana; SANTOS, Patrícia; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. Characterization of an egg cysteine endopeptidase from the cattle tick *Boophilus microplus*. Annual Meeting of Brazilian Society of Science Progress (SBPC). Salvador, BA, Brazil. July (13-18), **2001**.
- SEIXAS**, Adriana; HILLEBRAND, Sandro; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. "Purification of a vitellin associated cysteine endopeptidase from *Boophilus microplus* eggs". XXX Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (19-22), **2001**.
- SEIXAS**, Adriana; SANTOS, Patrícia Coutinho; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. "Partial characterization of a cysteine endopeptidase from the cattle tick *Boophilus microplus* eggs". XXIX Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (27-30), **2000**.
- RICHTER, François Marc; HOFMEISTER, Alex.; **SEIXAS**, Adriana.; MASUDA, Aoi; TERMIGNONI, Carlos. "Purification and partial characterization of arylamidases from the cattle tick *Boophilus microplus*". XXVIII Annual Meeting of the Brazilian Society of Biochemistry and Molecular Biology (SBBq). Caxambu, MG, Brazil. May (03-06), **1999**.

6.3 Trabalhos publicados

ESTRELA, Andréia; **SEIXAS**, Adriana; TERMIGNONI, Carlos. 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, p. 410-116, **2007**.

LEAL, Alexandre Trindade; **SEIXAS**, Adriana; POHL Paula Cristina; FERREIRA, Carlos Alexandre; LOGULLO, Carlos; OLIVEIRA, Pedro Lagerblad; FARIAS, Sandra Estrasulas; TERMIGNONI, Carlos; DA SILVA VAZ JR, Itabajara; MASUDA, Aoi. Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology Immunopathology*, v. 114, p. 341-345, **2006**

SEIXAS, Adriana; DOS SANTOS, Patrícia Coutinho; VELLOSO, Fernando; DA SILVA VAZ JR, Itabajara; MASUDA, Aoi; HORN, Fabiana; TERMIGNONI, Carlos. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*, v. 126, p. 155-163, **2003**.