

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS**

TESE

**Estudos Bioquímicos Comparativos dos Ovos de
Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari:
Ixodidae) Durante a Oviposição**

Vanessa de Almeida Raia

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**ESTUDOS BIOQUÍMICOS COMPARATIVOS DOS OVOS DE *RHIPICEPHALUS*
(*BOOPHILUS*) *MICROPLUS* (ACARI: IXODIDAE) DURANTE A OVIPOSIÇÃO.**

VANESSA DE ALMEIDA RAIA

Sob a Orientação da Professora
Kátia Maria Famadas

e Co-orientação da Professora
Adriana Rayol Pedrenho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências Veterinárias**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Parasitologia Animal.

Seropédica, RJ
Janeiro de 2011

595.429

R149e

T

Raia, Vanessa de Almeida, 1980-

Estudos bioquímicos comparativos dos ovos de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) durante a oviposição / Vanessa de Almeida Raia - 2011.

38 f.: il.

Orientador: Kátia Maria Famadas.

Tese(doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 29-38.

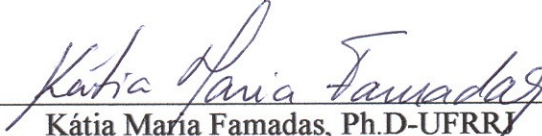
1. *Boophilus microplus* - Ovos - Teses. 2. Parasito - Bovino - Teses. 3. Lipídios - Teses. 4. Carboídratos - Teses. I. Famadas, Kátia Maria, 1961-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.


UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE VETERINÁRIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

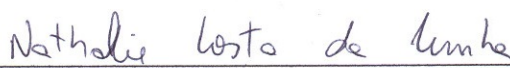
VANESSA DE ALMEIDA RAIA

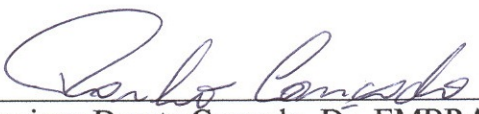
Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de Concentração em Parasitologia Animal.


TESE APROVADA EM 28 / 01 / 2011


Kátia Maria Famadas, Ph.D-UFRRJ


Jairo Pinheiro da Silva, Dr.-UFRRJ


Nathalie Costa da Cunha, Dr^a. – ENSP - FIOCRUZ


Paulo Henrique Duarte Cançado, Dr.-EMBRAPA-CNPGL


Márcia Cristina de Azevedo Prata, Ph.D-EMBRAPA-CNPGL

“A diferença entre pessoas comuns e pessoas bem-sucedidas é a percepção e resposta ao fracasso.”

John Maxwell

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que me deu força e coragem para continuar, mesmo com tantas dificuldades;

Ao HERCULES, pelo amor, companheirismo, compreensão e incentivo diários;

À minha MÃE KÁTIA e IRMÃ VIVIANE, que me amam e torcem por mim;

À minha SOGRA CIDA e à minha CUNHADA LUCIANA que me aceitaram e me acolheram;

À minha orientadora, DR^a KÁTIA MARIA FAMADAS (UFRRJ), pelos ensinamentos que serão levados para vida;

À minha co-orientadora PROF. DR^a.ADRIANA RAYOL PEDRENHO (UFRRJ) pela cumplicidade;

Ao PROF. DR. JAIRO PINHEIRO (UFRRJ) por me deixar calma, fazendo com que as coisas fossem bem menos complicadas a cada conversa;

À PROF. DR^a. GEÓRGIA CORREIA ATELLA (Laboratório de Bioquímica de Lipídios – UFRJ) pela disponibilização do laboratório e de seu tempo para realização das HPTLC`s, e às suas bolsistas MICHELE DE SOUZA LIMA pela ajuda e simpatia e à NUCCIA NICOLE THEODORO DE CICCIO pela ajuda antes mesmo de me conhecer;

À professora VÂNIA RITA ELIAS PINHEIRO BITTENCOURT e aos seus orientados, pela cessão das teleóginas utilizadas no experimento;

À ALEKSANDRA MENEZES DE OLIVEIRA (Laboratório de Biologia de Helmitos Otto Wucherer – UFRJ) pelo propósito de ajudar;

Ao PROF. ADIVALDO FONSECA pela proposta de Pós-Doc, o que fez com que a defesa fosse adiantada, me deixando louca, mas feliz;

À banca examinadora, DR^a. NATHALIE COSTA DA CUNHA (ENSP-FIOCRUZ), DR. PAULO HENRIQUE DUARTE CANÇADO (EMBRAPA-CNPGC), DR^a. MÁRCIA CRISTINA DE AZEVEDO PRATA (EMBRAPA-CNPGL) pela disposição de vir a Rural no calor de janeiro;

Ao DR. WALTER FLAUSINO (UFRRJ), pela amizade;

Aos amigos GISELE SANTOS DE MEIRELES, IWINE JOYCE BARBOSA DE SÁ e CHALES PASSOS RANGEL pelo apoio na fase de redação da tese;

Às companheiras do Laboratório de Ixodologia (UFRRJ) CARLA C. D. U. RIBEIRO, MICHELE DA COSTA PINHEIRO, CAMILA DANTAS MARTINS e GABRIELA ALCÂNTARA;

Ao casal ÍSIS DANIELE COSTA SANTOLIN e ALEXANDRE SANTOLIN pelo acolhimento durante o período em que estive na UFRJ;

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias (UFRRJ), que torceram para que tudo desse certo, principalmente à BRUNA BAÊTA;

Aos FUNCIONÁRIOS das Secretarias dos Cursos de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e em Microbiologia Veterinária; A todos os FUNCIONÁRIOS da Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz;

Aos CIDADÃOS BRASILEIROS, que pagam impostos, permitindo que parte deste recurso seja utilizado para fins legais no ensino e na pesquisa;

À COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES) pelo auxílio financeiro sob a forma de bolsa para realização deste trabalho.

A TODOS que estiveram comigo, me apoiaram e incentivaram em algum momento desse período turbulento e incerto, no qual todas as noites eu pensava em desistir e todas as manhãs decidia me dar mais uma chance.

Valeu à pena, deu certo! Obrigada.

BIOGRAFIA

VANESSA DE ALMEIDA RAIA, filha de Kátia Regina de Almeida Raia, nasceu no dia 12 de outubro de 1980, na cidade de Duque de Caxias, Estado do Rio de Janeiro. Concluiu o ensino fundamental em 1994, na Associação Brasileira de Ensino Universitário (ABEU) localizada na cidade de Belford Roxo, Rio de Janeiro. Em 1997, concluiu o ensino médio no Instituto Iguaçuanos de Ensino, localizado na cidade de Nova Iguaçu, Rio de Janeiro.

No ano de 1999, ingressou no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de Médica Veterinária em 15 de maio de 2004.

Durante o período acadêmico, realizou estágio em diversas áreas e instituições, participando de projetos de pesquisa no Laboratório de Morfofisiologia de Ácaros, onde participou de 15 publicações científicas em congressos e eventos científicos nacionais e internacionais. Neste mesmo laboratório, foi bolsista do Programa de Bolsas de Pré-Iniciação Científica (Pré-IC UFRRJ) no ano de 2000, monitora da disciplina Zoologia Médica e Parasitologia I em 2001 e bolsista de iniciação científica FAPERJ (Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro) por dois anos consecutivos.

No ano de 2003, foi monitora voluntária da disciplina Anestesiologia e Técnica Cirúrgica II durante as aulas práticas.

Em março de 2005, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Parasitologia Animal, ao nível de Mestrado, onde foi bolsista CAPES de março de 2004 a fevereiro de 2007.

Em março de 2007, ingressou no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, Área de Concentração Parasitologia Animal, em nível de Doutorado, onde foi bolsista CAPES de março de 2007 a janeiro de 2011.

RESUMO

RAIA, Vanessa de Almeida. **Estudos Bioquímicos Comparativos dos Ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) Durante a Oviposição**. 2011. 38p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Objetivando preencher algumas lacunas sobre os mecanismos intrínsecos da biologia da oviposição de *R. (B.) microplus*, foram avaliadas as concentrações de lipídios e carboidratos, assim como a variabilidade lipídica dos ovos postos em diferentes dias de postura. Para isso, fêmeas ingurgitadas pesando entre 151 e 360 mg foram colocadas em estufa biológica sob condições controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase), e após início da postura, três amostras diárias do “pool” de ovos foram coletadas, acondicionadas e preservadas a -20°C . As amostras 1 e 2, pesando 50 mg cada, foram utilizadas para dosar lipídios e glicose, e avaliar o perfil de lipídios, respectivamente; a amostra 3, contendo 1 g de ovos foi utilizada para dosar glicogênio. A dosagem de lipídios totais foi realizada através do reagente de fosfovanilina, enquanto as concentrações de colesterol, triglicerídios e glicose foram obtidas através de determinação colorimétrica com a utilização de kit enzimático de ponto final. A dosagem de glicogênio foi realizada através do reativo ácido 3,5 dinitrosalicílico. Os resultados das dosagens foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e a relação entre as concentrações dos substratos e os dias de postura foi avaliada através de Regressão polinomial. Não foram constatadas diferenças significativas entre as concentrações destes substratos nos ovos de diferentes dias de oviposição, assim como não houve relação dessas concentrações com os dias de postura. Após extração dos lipídios das amostras, foram realizadas cromatografias em camada delgada de alto desempenho (HPTLC) para lipídios neutros e fosfolipídios. Em seguida, a densitometria foi realizada através do programa Image Master Total Lab e o percentual diário de cada lipídio nas amostras foi calculado. Dentre os lipídios neutros foram identificados hidrocarbonetos, colesterol esterificado, triglicerídios, ácidos graxos, colesterol livre e diacilglicerol. Destes, o colesterol esterificado foi o que apresentou maior variação, não sendo detectado nos ovos do quinto dia de oviposição. Dentre os fosfolipídios foram detectados o ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina, fosfatidilinositol e esfingomiéline. Sendo este último ausente nos ovos do sétimo dia de postura em diante. Assim, as diferentes taxas de eclodibilidade por dia de postura não podem ser atribuídas às concentrações de lipídios totais, embora alguns lipídios específicos como o colesterol esterificado e a esfingomiéline possam ter influência na diferença de eclodibilidade larval, sendo necessários mais estudos para esclarecer o papel desses substratos na embriogênese.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Lipídios, Carboidratos.

ABSTRACT

RAIA, Vanessa de Almeida. **Biochemical Analysis of eggs of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) during the Oviposition.** 2011. 38p. Thesis (Doctor Sciences Veterinary, Animal Parasitology) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica , RJ, 2011.

To fill some gaps about the intrinsic mechanisms of the biology of oviposition of *R. (B.) microplus*, we evaluated the concentration of lipids and carbohydrates, as well as the variability of lipid in eggs per day of posture. For this, engorged females weighing between 151 and 360 mg were placed in controlled environment (27 ± 1 ° C, $80 \pm 5\%$ RH, darkness), and after beginning of laying, three samples of the eggs pool were daily collected, packed and preserved at -20 ° C. Samples 1 and 2, weighing 50 mg each, were used to quantitate lipids and glucose, and to evaluate the lipid profile, respectively; and the third sample, containing 1 g of eggs, was used to quantitate glycogen. The determination of total lipids was performed using phospho-vanillin reagent, while the concentrations of cholesterol, triglycerides and glucose were obtained by colorimetric determination using endpoint enzymatic kit. The level of glycogen was performed using the acid 3,5 dinitrosalicylic reactive . The results were analyzed by nonparametric Kruskal-Wallis and the relationship between the concentrations of substrates and the days of laying was assessed by polynomial regression. There was no significant difference in the concentrations of these substrates in eggs from different days of oviposition, as there was no relationship of these concentrations with the days of laying. After lipid extraction, the samples were performed in thin layer chromatography, high-performance (HPTLC) for neutral lipids and phospholipids. Then, densitometry was performed using the Image Master Total Lab and the daily percentage of each lipid in the samples was calculated. Among the neutral lipids were identified the hydrocarbons, esterified cholesterol, triglycerides, fatty acids, free cholesterol and diacylglycerol. Of these, the cholesterol ester showed the highest variation, it was not detected in eggs at the fifth day of oviposition. Among the phospholipids were detected the phosphatidic acid, phosphatidylethanolamine, phosphatidylcholine and sphingomyelin fosfatidilinusitol. This latter was absent in eggs of the seventh day onwards. Thus, the different rates of hatchability of eggs from different laying days cannot be attributed to the concentrations of total lipids, although some specific lipids such as cholesterol ester and sphingomyelin might influence the difference in larval hatchability, more researches are needed for clarify the role of these substrates in embryogenesis.

Key-words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, Lipids, Carbohydrates.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

%	porcento;
° C	graus Celsius;
° N	graus a norte;
° S	graus a sul;
µg	microgramas;
3,5 DNS	ácido 3,5 dinitrosalicílico;
B.O.D.	demanda biológica de oxigênio;
CHO	colesterol livre;
CHOE	colesterol esterificado;
cm	centímetro;
DG	diacilglicerol;
dL	decilitro;
FA	ácidos graxos;
g	grama;
GS	glicogênio sintase;
GSK-3	glicogênio sintase quinase-3;
h	horas;
H ₂ SO ₄	ácido sulfúrico;
H ₃ PO ₄	ácido fosfórico;
HCl	ácido clorídrico;
HPTLC	cromatografia em camada fina de alta performance;
IEN	índice de eficiência nutricional;
IER	índice de eficiência reprodutiva;
kDa	quilodalton
mg	miligrama;
MG	monoglicerídeos;
min	minutos;
mL	mililitros;
N	normal;
NaOH	hidróxido de sódio
ng	nanograma;
nm	nanômetro;
PA	ácido fosfatídico;
PC	fosfatidilcolina;
PE	fosfatidiletanolamina;
PEPCK	fosfoenolpiruvato-carboxiquinmase;
pH	potencial hidrogeniônico;
PI	fosfatidilinositol;
RPM	rotações por minuto;
SM	esfingomiéline;
TG	triacilglicerol;

TLC	cromatografia em camada delgada;
UDP-glicose	uracila difosfato-glicose;
UR	umidade relativa;
Vg	vitelogenina;
Vt	vitelina;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Concentração de lipídios totais em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	18
Figura 2. Concentração de colesterol em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	19
Figura 3. Concentração de triglicerídios em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	20
Figura 4. Concentração de glicose em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	22
Figura 5. Concentração de glicogênio em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	23
Figura 6. HTPLC de lipídios neutros contidos nos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de diferentes dias de postura. HC – hidrocarboneto; CHOE – colesterol esterificado; TG – triglicerídeos; FA – ácido graxo; DG+CHO – diacilglicerol + colesterol livre; 1-9 – Dias da postura dos ovos.....	25
Figura 7. Variação de lipídios neutros dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de diferentes dias de postura. HC – hidrocarboneto; CHOE – colesterol esterificado; TG – triglicerídeos; FA – ácido graxo; DG+CHO – diacilglicerol + colesterol livre.....	25
Figura 8. HTPLC de fosfolipídios contidos nos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de diferentes dias de postura. PA – ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; SM – esfingomiélna; 1-9 – Dias de postura dos ovos.....	27
Figura 9. Variação de fosfolipídios dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de diferentes dias de postura. PA – ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; SM – esfingomiélna.....	27

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de substratos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ dos ovos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de diferentes dias de postura e com desenvolvimento embrionário estacionado nas primeiras 24h.....	17
Tabela 2. Percentual de lipídios neutros dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ovipostos em diferentes dias de postura.....	24
Tabela 3. Percentual de fosfolipídios presentes nos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ovipostos em diferentes dias de oviposição.....	26

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Aspectos Gerais sobre <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	2
2.1.1 Taxonomia.....	2
2.1.2 Importância.....	2
2.1.3 Ciclo biológico.....	2
2.2 Biologia da Oviposição.....	3
2.3 Lipídios e Carboidratos.....	4
2.4 Importância dos Lipídios na Fisiologia da Reprodução.....	5
2.4.1 Etapa inicial.....	5
2.4.2 Oogênese.....	7
2.4.3 Vitelogênese.....	8
2.4.4 Ovulação e maturação do oócito no trato genital.....	9
2.4.5 Embriogênese.....	9
2.5 Composição dos Ovos.....	10
3 MATERIAL E MÉTODOS	12
3.1 Local de Execução.....	12
3.2 Origem e Manutenção dos Ixodídeos no Laboratório.....	12
3.2.1 Origem.....	12
3.2.2 Manutenção das fêmeas ingurgitadas no laboratório.....	12
3.3 Obtenção das Amostras.....	12
3.4 Técnicas de Dosagem.....	13
3.4.1 Lipídios totais.....	13
3.4.2 Colesterol total.....	13
3.4.3 Triglicerídios.....	13
3.4.4 Glicose.....	14
3.4.5 Glicogênio.....	14
3.4.5.1 Extração.....	14
3.4.5.2 Hidrólise.....	14
3.4.5.3 Neutralização.....	15
3.4.5.4 Dosagem.....	15
3.5 Análise Estatística.....	15
3.6 Análise de Lipídios.....	15
3.6.1 Dosagem de proteínas.....	15
3.6.2 Extração de lipídios.....	15
3.6.3 Cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC).....	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Concentrações de Lipídios e Carboidratos.....	17
4.1.1 Dosagem de lipídios totais	17
4.1.2 Dosagem de colesterol.....	18
4.1.3 Dosagem de triglicerídios.....	20
4.1.4 Dosagem de glicose e glicogênio.....	21
4.2 Composição de Lipídios Neutros.....	23
4.3 Composição de Fosfolipídios.....	26

5 CONCLUSÕES	28
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	29

1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são parasitos com importância sanitária amplamente reconhecida pelos danos que causam em seus hospedeiros, principalmente devido ao hábito hematófago. Todos os estágios parasitários necessitam de sangue para sua sobrevivência, no entanto são as fêmeas acasaladas as maiores espoliadoras de sangue, pois são capazes de ingerir uma grande quantidade de sangue durante todo o período de fixação no hospedeiro. Isto somado aos danos indiretos resulta em diminuição da produção e perdas econômicas. Dentre as espécies de carrapatos que parasitam animais domésticos no Brasil, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) se destaca por causar enormes prejuízos anuais para pecuária bovina.

A capacidade reprodutiva é fator chave para manutenção de qualquer espécie na natureza. Neste aspecto, carrapatos da família Ixodidae são bem sucedidos, pois se reproduzem de acordo com a estratégia bionômica r . Neste tipo de estratégia os indivíduos não apresentam comportamento parental em relação à prole, por isso a chance individual de cada larva chegar à idade adulta é reduzida, em compensação é produzido um número elevado de ovos. Fêmeas das principais espécies de ixodídeos podem liberar um total de até 20.000 ovos ao longo de vários dias de postura, em seu único ciclo gonadotrófico.

Vários fatores atuam para uma boa produtividade durante a reprodução. Fatores abióticos, principalmente temperatura e umidade, há muito vem sendo estudados e já é sabido que influenciam no número de ovos deixados no ambiente e na duração do período de postura. Contudo, ainda existem lacunas no conhecimento dos fatores bioquímicos que podem explicar a biologia destas fases do ciclo dos carrapatos. Uma dessas questões diz respeito ao fator intrínseco responsável pela menor taxa de eclodibilidade larval observada nos ovos dos primeiros e dos últimos dias de postura. A baixa disponibilidade de proteínas e outros nutrientes fornecidos pela fêmea, bem como espermatozóides insuficientes para fertilização foram responsabilizados por isso. No entanto, estudos posteriores não puderam explicar as menores taxas de eclosão nas posturas dos primeiros dias, quando a fêmea está repleta de nutrientes e de espermatozóides em seu receptáculo.

Em *R. (B.) microplus* o período de postura dura aproximadamente 15 dias, com o pico entre o segundo e quinto dia após o dia modal de início da postura, após o pico há queda progressiva na quantidade de postura até o fim da oviposição. Ovos do primeiro e do oitavo dia em diante possuem taxa de eclosão larval menor do que os ovos dos dias intermediários.

Proteínas, lipídios e carboidratos são estocados pelo oócito durante o seu amadurecimento no ovário e utilizados como suporte energético ao rápido desenvolvimento do embrião. Com relação às proteínas, já foi verificado que os ovos são diferentes em relação à concentração e ao conteúdo de acordo com o dia de oviposição, mas são necessários mais estudos para identificar a influência das mesmas na eclodibilidade larval destes ovos.

Vale ressaltar, que embora de caráter básico, a compreensão dos mecanismos que regem a oviposição e embriogênese dos carrapatos é o ponto de partida para desenvolvimento de pesquisas sobre métodos seletivos de controle, como por exemplo, vacina.

Devido ao pouco conhecimento relacionado à bioquímica da oviposição e a importância do sucesso da embriogênese para manutenção das espécies de ixodídeos, achados sobre a variação de nutrientes como proteínas, glicogênio e lipídios nos ovos durante a postura são de extrema importância. Este conhecimento pode esclarecer mecanismos fisiológicos da reprodução e explicar aspectos da biologia da oviposição, uma vez que o desenvolvimento do embrião dos carrapatos é dependente da deposição de nutrientes pelas fêmeas. Este conhecimento pode ser fundamental para a elaboração de estratégias que impeçam a postura das fêmeas, controlando assim, a capacidade de reprodução dos ixodídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos Gerais sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

2.1.1 Taxonomia

Carrapatos são ectoparasitos pertencentes ao Filo Arthropoda; Subfilo Chelicerata; Classe Arachnida, Ordem Acari; Subordem Ixodida (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Por possuírem os estigmas respiratórios localizados após o quarto par de pernas, são chamados de metastigmatas. Esta subordem é dividida em três famílias: Nuttalielidae, Ixodidae e Argasidae, sendo as duas últimas mais importantes em medicina veterinária. Carrapatos da Família Ixodidae representam cerca de 80% da diversidade de carrapatos do mundo, com 683 espécies (HORAK et al., 2002); possuem como principal característica a presença de um escudo dorsal, que cobre todo o dorso em machos e um terço do dorso nas fêmeas. Por causa da presença desse escudo carrapatos desta família são conhecidos como “hard ticks” – “carrapatos duros”. Dentre os carrapatos desta família, recentemente os gêneros *Boophilus* e *Rhipicephalus* foram considerados monofiléticos e as cinco espécies do gênero *Boophilus* foram remanejadas para o gênero *Rhipicephalus* sendo o antigo gênero incorporado ao nome da espécie como subgênero. Desta forma a espécie *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) foi renomeada *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (MURREL; BAKER, 2003).

2.1.2 Importância

Carrapatos são ectoparasitos, obrigatoriamente hematófagos em todos os estágios do ciclo de vida, e por isso são de grande importância sanitária. No entanto, são as fêmeas acasaladas as maiores espoliadoras de sangue, uma vez que necessitam de nutrientes para a formação dos ovos, sendo capazes de ingerir um total de cerca de dois a três mililitros de sangue (ARTHUR, 1960; FURLONG et al., 1996). Dentre as espécies de carrapatos que parasitam animais domésticos no Brasil, *R. (B.) microplus* se destaca por causar prejuízos anuais em cerca de dois bilhões de dólares (GRISI et al., 2002). Entre os danos diretos causados ao rebanho podemos destacar a desvalorização do couro e a anemia causada pela grande perda de sangue. Além disso, os carrapatos atuam como vetores de agentes causadores de doenças, e nenhum grupo de artrópodes vetores é capaz de transmitir uma variedade tão grande de patógenos, entre protozoários, bactérias e vírus (JONGEJAN; UILENBERG, 2004). Como exemplo, podemos destacar a transmissão de *Anaplasma marginale* Theiler, 1910 e protozoários do gênero *Babesia*, responsáveis por causar o complexo de enfermidades conhecido como “tristeza parasitária bovina” (KOCAN et al., 2004; BOCK et al., 2004).

A distribuição geográfica de *R. (B.) microplus* inclui as regiões tropical e subtropical entre os paralelos 30° S e 40° N, onde as condições climáticas favorecem o seu desenvolvimento. A espécie tem origem no sudeste da Ásia, mas é dispersa pela Austrália, África e América. Este carrapato é endêmico na América do Sul (JONGEJAN; UILENBERG, 2004), sendo reportado em pelo menos 95,6% dos municípios brasileiros (HORN, 1983).

2.1.3 Ciclo biológico

O ciclo de vida de *R. (B.) microplus* se divide em uma fase de vida livre e uma fase parasitária, que ocorre no hospedeiro, e dura aproximadamente 21 dias, na qual a fêmea fertilizada se alimenta de sangue. Como são monoxenos, necessitam de apenas um hospedeiro

para completar seu ciclo, estes hospedeiros são preferencialmente bovinos, podendo parasitar outros animais como equinos e ovinos (GONZALES, 1974). Após o ingurgitamento, a teleógina (fêmea completamente alimentada) cai no solo iniciando o período de vida não-parasitário. O período compreendido a partir do momento da queda até o início da postura é denominado período de pré-postura. Em *R. (B.) microplus* este período tem duração aproximada de três dias. Em seguida, a fêmea realiza sua única postura, que dura em média 15 dias, e morre após o fim da oviposição. Imediatamente após a postura, tem início o período embrionário, que em condições controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase) dura entre 24 e 26 dias (LOUZADA; DAEMON, 2003). No ambiente, as larvas estão prontas para parasitar um hospedeiro três a sete dias após a eclosão (DAVEY et al., 1991). Ao se fixarem no hospedeiro através do hipostômio (estrutura pertencente ao aparelho bucal) e completarem sua alimentação sofrem a muda para ninfa, em seguida, ainda sem descerem ao solo realizam outra alimentação e ao final desta, nova muda para adulto. O acasalamento ocorre ainda no hospedeiro, e logo após as fêmeas iniciam o processo de ingurgitamento, na qual ingerem quantidade de sangue voltada para a produção de ovos (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

2.2 Biologia da Oviposição

Vários fatores atuam para o sucesso ou insucesso do estágio reprodutivo em carrapatos. Particularmente em ixodídeos, fatores abióticos, principalmente temperatura e umidade, vem sendo estudados e vários pontos já estão esclarecidos no que se refere a sua influência na biologia da oviposição (BELLATO; DAEMON, 1997; PRATA, 2002). Para *R. (B.) microplus*, a faixa de temperatura ideal para o melhor desempenho na postura está entre 27 e 30°C (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974). Hitchcock (1955) chegou a esta conclusão ao observar maior número de ovos postos no ambiente nesta faixa de temperatura. O trabalho de Bennett (1974) corroborou os achados de Hitchcock (1955), concluindo que baixas temperaturas prolongam o ciclo, mas são prejudiciais em relação à produção de ovos, assim como altas temperaturas aceleram o ciclo, mas prejudicam a quantidade de postura. A faixa de umidade relativa (UR) na qual as fêmeas ingurgitadas apresentam melhor desempenho de postura é entre 80 - 90% (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974).

Hitchcock (1955) e Bennett (1974) também avaliaram a eclodibilidade larval de acordo com o dia da postura. Ambos observaram que entre 24 e 27°C a taxa de eclodibilidade é maior nos ovos postos nos dias intermediários de postura, sendo considerada baixa nos ovos dos dois primeiros e dos últimos dias de postura. A queda de eclodibilidade começa e ser observada em ovos colocados a partir do sétimo dia, esta queda é acentuada nos ovos do oitavo dia em diante, decrescendo até chegar a zero nos ovos dos últimos dias de postura. Tanto nos ovos observados por Hitchcock (1955) quanto nos observados por Bennett (1974) o pico de eclodibilidade larval ocorreu nos ovos postos no quinto dia de postura.

Estudos comparando a eclodibilidade larval em ovos de diferentes dias de postura foram realizados com outros ixodídeos. Prata (2002) observou a eclodibilidade larval de *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 de acordo com o dia em que os ovos foram postos, detectando diferenças significativas entre esses períodos. Em um total de 36 dias de postura, foi observado que os ovos provenientes dos primeiros dois dias de oviposição tiveram a eclodibilidade larval menos eficiente (85 e 86,25%, respectivamente) quando comparados aos ovos dos dias intermediários de postura (acima de 90%). Também foi observado que a partir dos ovos postos no 22º dia após o início da postura a eclodibilidade larval sofreu um declínio gradativo, chegando a zero nos três últimos dias de oviposição. Como os ovos foram mantidos em condições de umidade satisfatórias, a autora especulou que as diferenças na eclodibilidade dos ovos dos primeiros e últimos dias de postura foram provavelmente devido à ocorrência de deficiências no processo de absorção de água prévio à postura, ao invés de perda de água pós-

oviposição. Citando como exemplo, falhas na formação e desenvolvimento dos primeiros oócitos destacados, distúrbios ao desencadear o processo de fertilização ou problemas no início dos processos de endurecimento e deposição de substâncias impermeabilizantes na casca dos ovos, pois estes se encontravam escuros e encarquilhados, evidências de desidratação.

Em *Dermacentor variabilis* Say, 1821 a eclodibilidade foi reduzida nos ovos dos últimos dias de oviposição. Alguns autores atribuíram este fato à diminuição do nível de nutrientes disponibilizados aos ovos pelas teleóginas e/ou diminuição do estoque de espermatozoides para os últimos ovos produzidos (SONENSHINE; TIGNER, 1969; CAMPBELL; HARRIS, 1979). Esta especulação pode ser válida para os ovos dos últimos dias de postura, mas não é suficiente para explicar a menor eclodibilidade dos ovos dos primeiros dias de postura nas espécies, *R. (B.) microplus* e *A. cajennense* citados anteriormente.

Dipeolu (1991) descreveu dois modelos de curva de oviposição para *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) A curva tipo I observada em 81% dos espécimes analisados caracteriza-se por uma postura com pequena quantidade de ovos nos primeiros dias aumentando progressivamente até atingir um pico por volta do terceiro dia, decrescendo em seguida até o final da oviposição. A curva do tipo II foi caracterizada pelo pico de postura no primeiro dia da oviposição, diminuindo progressivamente a quantidade de ovos postos até o final da postura. Essa curva foi representativa para 19% dos espécimes analisados. O autor ainda destaca que os modelos de curva observados são independentes em relação ao tipo de hospedeiro (cão ou coelho) e a capacidade de oviposição das teleóginas ser baixa ou alta. Em ambos os modelos de curva, os ovos postos nos últimos dias de oviposição foram mais leves quando comparados aos dos demais dias. De acordo com esta classificação, o ritmo de postura de *R. (B.) microplus* se enquadra no modelo de curva tipo I, com os picos de postura variando do segundo ao quinto dia de oviposição (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974).

Borges et al. (2001) avaliaram a influência do peso inicial das fêmeas na conversão de ovos em *R. (B.) microplus*. Os autores verificaram que fêmeas ingurgitadas pesando entre 151 e 360 mg tiveram IER mais altos (variando de 44,9% a 51,4%) do que aquelas mais leves, as quais apresentaram uma menor capacidade de conversão em ovos (variando de 31,4% a 39,0%). Bennett (1974) também observou máxima conversão de peso em ovos nas fêmeas deste mesmo intervalo de peso.

2.3 Lipídios e Carboidratos

Lipídios são biomoléculas orgânicas de baixa solubilidade em solventes polares, como água, e altamente solúveis em solventes apolares. São encontrados na estrutura de membranas biológicas; armazenando e transportando fontes de energia metabólica; como película protetora sobre a superfície de diversos organismos; além de atuar no reconhecimento celular e sistema imunológico. Para executar tantas funções diferentes existem lipídios especializados, organizados em dois grupos principais. Os lipídios podem ser agrupados em dois grandes grupos: aqueles que possuem ácidos graxos em sua composição, chamados de lipídios complexos e aqueles que não possuem ácidos graxos, como o colesterol, um esterol precursor de várias biomoléculas, dentre elas, os hormônios sexuais. Dentre os lipídios complexos ainda podemos separar os apolares e polares. Os triacilgliceróis, mais conhecidos por triglicerídeos, representam os lipídios apolares e são os mais abundantes e os principais depósitos de energia das células animais (LEHNINGER, 1984).

Dentre os lipídios complexos polares estão os fosfolipídios, que são um dos tipos de lipídios constituintes básicos primários de membranas biológicas. Em geral os fosfolipídios são formados por uma molécula de glicerol na qual se ligam dois ácidos graxos, formando

uma região hidrofóbica; e um fosfato conectando uma porção polar (colina, etanolamina, serina, etc.), hidrofílica. A estrutura dos fosfolipídios, com seu caráter anfipático, é essencial para seu papel biológico, especialmente na formação das membranas (CULLIS; HOPE, 1991).

Entretanto, os fosfolipídios não podem ser considerados meramente como componentes estruturais essenciais à delimitação das células; fluidos, porém imutáveis. Esta visão, até certo ponto estática, tem sido completamente revista, e os fosfolipídios são agora considerados não somente como tendo papel estrutural, mas também representando importantes funções dinâmicas na fisiologia das células e dos organismos. Como exemplo podem ser citadas a participação essencial de fosfolipídios em várias etapas da cascata de coagulação sanguínea, na interação direta com proteínas de membrana, e como mensageiros celulares (HANAHAN; NELSON, 1984; EXTON, 1994).

Em insetos os lipídios são utilizados como substrato na reprodução, embriogênese, metamorfose, comunicação (através dos feromônios), regulação de processos fisiológicos (hormônios), como proteção contra dessecação e constituintes celulares (GILBERT; CHINO, 1974). Entre os lipídios dos insetos, destacam-se os esteróis (MONROE, 1960; CLAYTON, 1964). Estes são observados em uma concentração relativamente alta nos tecidos, o que sugere que a maior parte da dieta de esteróis seja utilizada como elemento da estrutura celular (CLAYTON, 1964).

Na mosca *Musca domestica* (Linnaeu, 1758), uma dieta rica em colesterol é fundamental para eclosão e sobrevivência das larvas nos últimos grupos de ovos colocados, pois quando privada de colesterol em sua dieta, a fêmea consegue transferir esteróides armazenados somente para as primeiras posturas. Assim, as moscas que têm uma dieta pobre em colesterol colocam ovos, mas a eclosão das primeiras posturas é baixa com redução progressiva a cada postura até chegar a zero. Além disso, somente metade das larvas oriundas da dieta deficiente em colesterol produzem adulto, quando comparado com 91% das oriundas da dieta com colesterol (MONROE, 1960).

Em carrapatos os ésteres de colesterol são utilizados como precursores de feromônios sexuais em diversas espécies de ixodídeos. Esses ésteres constituem o maior componente dos lipídios da cutícula de revestimento do corpo de fêmeas do carrapato *Hyalomma dromedarii* Koch, 1844 e *R. sanguineus* (SOBBHY et al., 1994). Em *R. (B.) microplus* a quantidade de colesterol presente nas teleóginas é diretamente proporcional ao peso e aproximadamente um terço deste substrato é transferido para os ovos. Assim, ovos oriundos de fêmeas mais pesadas possuem maior conteúdo de colesterol/mg. Após a postura, menos da metade do conteúdo de colesterol inicial é detectado nas fêmeas (CHERRY, 1976).

Os carboidratos ou sacarídeos representam o principal substrato de energia utilizável. Dentre muitos, a glicose, mais abundante, é armazenada sob a forma de glicogênio, que é o mais importante carboidrato de reserva nos animais (LEHNINGER, 1984). Além disso, as organizações destes nas proteínas e superfícies celulares são a chave para muitos eventos de reconhecimento celular, além de servirem como direcionadores das proteínas recém sintetizadas aos seus locais de atuação (VOET et al., 2000). Em carrapatos os carboidratos foram estudados como fonte de energia para o desenvolvimento do embrião (CAMPOS et al., 2006; MORAES et al., 2007). O assunto será exposto mais adiante.

2.4 Importância dos Lipídios na Fisiologia da Reprodução

2.4.1 Etapa inicial

Em ixodídeos o processo de oviposição é dependente do repasto sanguíneo, que é iniciado após a cópula (BALASHOV, 1972; DIEHL et al., 1982), cada teleógina ingere em

torno de três mililitros de sangue durante sua passagem no hospedeiro e transforma 60% de sua massa corporal em ovos (GONZÁLES, 2002). Balashov (1972) caracterizou o repasto sanguíneo em três fases. A primeira fase, chamada de “fase preparatória”, dura cerca de um dia e é quando a fêmea estabelece a lesão de alimentação. A segunda fase, conhecida como “fase lenta”, dura de sete a nove dias, nesse período a fêmea cresce cerca de 10 vezes o seu peso corporal em jejum, atingindo o chamado “peso crítico” (HARRIS; KAUFMAN, 1984). Na terceira fase, chamada de “fase rápida”, a fêmea aumenta dez vezes o peso corporal obtido na fase lenta, esta fase dura cerca de um dia. Da primeira à última fase do repasto sanguíneo as fêmeas têm um aumento total de cerca de cem vezes o seu peso corporal em jejum. Em seguida, as fêmeas ingurgitadas se desprendem do hospedeiro para realizar a postura (FRIESEN; KAUFMAN, 2009).

O processo de alimentação nas fêmeas acasaladas é o estímulo gerador de uma sucessão de eventos fisiológicos. Em *Rhipicephalus appendiculatus* Newman, 1901 foi observado que as glândulas salivares são reabsorvidas após o início do processo da alimentação (TILL, 1961). Em *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 o título de hormônios ecdisteróides sobe substancialmente na hemolinfa de fêmeas acasaladas após o início da alimentação (KAUFMAN, 1991). De acordo com Friesen e Kaufman (2009) a chegada ao peso crítico, que ocorre ao final da fase lenta de alimentação, é o fator desencadeante da liberação de ecdisteróides na hemolinfa. O aumento deste hormônio é o fator que desencadeia a autólise das glândulas salivares ainda durante a alimentação (HARRIS; KAUFMAN, 1984, 1985; KAUFMAN, 1991). Em seguida a fêmea se desprende do hospedeiro, pois com a degeneração das glândulas salivares as funções de fixação das teleóginas são prejudicadas (KAUFMAN; LOMAS, 1996). Após a queda do hospedeiro aumenta ainda mais a concentração de ecdisteróides na hemolinfa, o que acelera a degeneração da glândula salivar pós-ingurgitamento; estimula a síntese de vitelogenina (Vg), a principal proteína do vitelo e fonte nutricional para o embrião; e o crescimento do ovário em teleóginas Ixodidae ingurgitadas (LOMAS; KAUFMAN, 1992).

Fêmeas não acasaladas, mesmo que atinjam o peso crítico demoram ou não conseguem se desprender do hospedeiro, pois o nível de ecdisteróides na hemolinfa é baixo. Se estas são retiradas manualmente do hospedeiro até ocorre um aumento no tamanho dos ovários, mas este não é relacionado ao acúmulo de Vt e as glândulas salivares completam sua degeneração em aproximadamente oito dias (FRIESEN; KAUFMAN, 2009). Isto demonstra a importância da fecundação no estímulo dos processos fisiológicos envolvidos na alimentação das fêmeas.

A função dos ecdisteróides em estimular a síntese de Vg foi observada em outros carrapatos ixodídeos como *A. hebraeum* (FRIESEN; KAUFMAN, 2002, 2004) e *D. variabilis* (SANKHON et al., 1999; THOMPSON et al., 2005) e no argasídeo *Ornithodoros moubata* (Murray, 1877) (OGIHARA et al., 2007; Horigane et al., 2007). Em estudos realizados com *D. variabilis* foi constatado que a ecdisona é o ecdisteróide responsável pela mensagem de início da síntese de Vg (NEESE et al., 2000; THOMPSON et al., 2005, 2007; ROE et al., 2008).

Ainda durante o período de ingurgitamento já começam a serem produzidas enzimas que atuam na embriogênese, como é o caso da glicogêniosintase quinase-3 (GSK-3). Enzima envolvida no metabolismo do glicogênio devido à sua ação inibitória sobre a glicogênio sintase (GS), através de fosforilação (EMBI et al., 1980). Enquanto a GSK-3 está ativa, a GS é mantida em estado fosforilado e inativo (CROSS et al., 1995). A função da GS é a catalização da reação de transformação da uracila difosfato - glicose (UDP-glicose) em UDP, convertendo o excesso de glicose para armazenamento de glicogênio. Assim, com a GSK-3 ativa a glicose presente nos ovos está disponível para ser utilizada no metabolismo.

Segundo Logullo et al. (2009) a GSK-3 de *R. (B.) microplus* apresentou níveis de transcrição elevados tanto nos ovários de fêmeas ingurgitadas quanto de parcialmente ingurgitadas, embora o nível de transcrição nas fêmeas parcialmente ingurgitadas tenha sido maior. Nos ovos, o nível de expressão relativa foi próximo ao observado para os ovários de fêmeas plenamente ingurgitadas.

2.4.2 Oogênese

Por serem ovíparos, a embriogênese dos carrapatos ixodídeos é dependente da absorção de nutrientes pelos oócitos durante o seu desenvolvimento nos ovários, já que são os nutrientes de origem materna a fonte de energia para o desenvolvimento do embrião (FAGOTTO, 1990; DENARDI et al., 2004). A fase vitelogênica (de síntese e absorção de Vg) do oócito começa com o aparecimento dos primeiros grânulos de vitelo e termina com a ovulação (OBENCHAIN; GALUN, 1982). Durante este período os elementos do vitelo são depositados nos oócitos seguindo uma seqüência preferencial, em que os lipídios são os primeiros, seguido pelas proteínas e depois carboidratos. Estes podem ficar livres no citoplasma ou quimicamente ligados formando glicoproteínas ou lipoproteínas (DENARDI et al., 2004).

De acordo com a classificação mais recente, a oogênese nos carrapatos está dividida em cinco estágios distintos. Esta divisão é baseada no critério utilizado por Balashov (1983) e na deposição de substâncias no vitelo, levando em consideração a aparência do citoplasma; presença de vesícula germinal, que representa o núcleo do oócito; presença, quantidade e constituição dos grânulos de vitelo e a presença do córion, que é uma fina membrana que envolve os anexos embrionários (DENARDI et al., 2004).

Em *R. (B.) microplus* a oogênese foi estudada com características detalhadas da morfologia e composição do ovário e dos oócitos. Nesta espécie, os oócitos começam a se desenvolver em ninfas alimentadas, estes são chamados de oócitos primários (estágio I), estão no período de pré-vitelogênese inicial, são pequenos e possuem conteúdo citoplasmático homogêneo. Após o início da alimentação hematófaga da fêmea adulta, os oócitos entram no estágio de pré-vitelogênese tardia (estágio II), no qual uma fina granulação pode ser observada no citoplasma. A vitelogênese ocorre nos estágios III e IV da oogênese, os quais são caracterizados por um grande aumento no volume dos oócitos e pelo surgimento de grânulos de vitelo maiores, provenientes da fusão dos grânulos menores. No estágio V, o oócito apresenta o citoplasma completamente preenchido por grânulos de vitelo, está bem desenvolvido e pronto para a oviposição. Além dos cinco estágios clássicos, esta espécie de carrapato apresenta o estágio VI, no qual os oócitos são caracterizados por uma aparência atípica, como se alguns componentes celulares estivessem sendo submetidos a um processo degenerativo e/ou de reabsorção, além de desorganização do citoplasma e contorno irregular (SAITO et al., 2005).

As proteínas são encontradas em todos os estágios de desenvolvimento dos oócitos, aparecendo nos grânulos de vitelo nos estágios V e VI. Lipídios são encontrados nas membranas plasmática, nuclear e no córion dos oócitos de *R. (B.) microplus*. A concentração deste substrato varia de acordo com o estágio de desenvolvimento, estando presentes nos espaços entre os grânulos de vitelo nos estágios III a VI. Os polissacarídeos são incorporados gradualmente, e nos estágios mais desenvolvidos provavelmente formam complexos com lipídios e proteínas (SAITO et al., 2005).

Na maioria dos Ixodidae, os oócitos menos avançados são encontrados geralmente no sulco longitudinal, enquanto os mais avançados estão mais distantes da fenda (DENARDI et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2005; SAITO et al., 2005; SANCHES et al., 2010). Este mecanismo garante que o período de vitelogênese, ovulação e oviposição no carrapato seja

prolongado por dias ou semanas. Este prolongamento tem algumas vantagens definidas, pois o percurso extracelular do material do vitelo presumivelmente não pode ser sintetizado e exportado a uma taxa na qual permita a vitelogênese de todos os oócitos ao mesmo tempo. Além disso, levando-se em consideração o espaço restrito dentro do ducto genital, e o tempo necessário para a manipulação individual dos ovos durante a sua impermeabilização pelo órgão de Genè, a falta de sincronismo da vitelogênese e ovulação deve ser uma vantagem seletiva para a eficiência reprodutiva de um grande grupo de ovos. Aumentando assim a probabilidade da sobrevivência da população de carrapatos (SONENSHINE, 1991).

2.4.3 Vitelogênese

Vitelogênese é um termo utilizado tanto para a síntese de Vg como para a captação desta pelos oócitos. A Vg é precursora da proteína de reserva mais importante dos ovos de ixodídeos, a Vt. Em carrapatos a maior parte da Vg é sintetizada fora do ovário, como no corpo gorduroso e intestino (CHINZEI; YANO, 1985; ROSELL; CONSS, 1990). Nos ovários, as células responsáveis pela síntese de Vg são as células foliculares, que circundam os oócitos (NIJHOUT, 1994).

De acordo com Rosell e Coons (1991a) as Vt's são lipoglicofosfoproteínas formadas por seis a nove subunidades que variam entre 35 e 160 kDa cada, sendo considerada de alto peso molecular. Cerca de 90% da proteína total presente nos grânulos de vitelo dos ovos de carrapatos correspondem a Vt. A presença de heme na Vt é derivada da digestão da hemoglobina do hospedeiro pela teleógina e confere aos ovos de carrapato a cor marrom escura.

A Vg é produzida e exportada para hemolinfa pelo corpo gorduroso (ROSELL; COONS, 1992; JAMES; OLIVER, 1999; THOMPSON et al., 2007), intestino (COONS et al., 1982; AGBEDE et al., 1986) e ovários (AVARRE et al., 2003; SERRANO-PINTO et al., 2004). Esta síntese é estimulada pelos hormônios ecdisteróides (FRIESEN; KAUFMAN, 2002; THOMPSON et al., 2005; SEIXAS et al., 2008), que são produzidos através do estímulo do repasto sanguíneo (FRIESEN; KAUFMAN, 2009). Em seguida, a Vg é transferida para os oócitos em desenvolvimento através de endocitose mediada por receptores (MITCHELL et al., 2007; BOLDBAATAR et al., 2008).

Após ser capturada pelos oócitos, a Vg sofre alterações como glicosilação (adição de sacarídeos), sulfatação (adição de um grupo sulfato), e fosforilação (adição de um grupo fosfato), sendo incorporada ao vitelo e passando a se chamar Vt (WYATT, 1980; ENGELMANN, 1990). A principal diferença entre Vt e Vg consiste na quantidade de lipídios totais, lipídios neutros e fosfolipídios associados às proteínas (CHINO et al., 1977; ROSELL; COONS, 1991b). Além disso, os açúcares manose e glicosamina se encontram ligados a Vt (ROSELL; COONS, 1991b). Por isso, um dos mecanismos mais importantes é a síntese e a absorção de proteínas, carboidratos e lipídios. Estes substratos podem ser sintetizados endogenamente pelos oócitos e / ou produzidos pelo corpo gorduroso, intestino ou células do pedicelo para depois serem transportados aos oócitos por endocitose através da hemolinfa (RICARDO et al., 2007). Já incorporados ao vitelo estes mesmos substratos podem estar livres ou ligados quimicamente a outros compostos (RAMAMURTY, 1968; DENARDI et al., 2004).

Nos oócitos de *R. sanguineus*, além de lipídios e proteínas, foram encontrados polissacarídeos (OLIVEIRA et al., 2005). Enquanto Balashov (1983) relatou que o vitelo dos oócitos seria composto, provavelmente, de proteínas e lipídios. Segundo a literatura, os polissacarídeos são freqüentemente encontrados nas células do corpo gorduroso de alguns artrópodes (CRUZ-LANDIM, 1985). Estes mesmos substratos são observados em trofócitos de fêmeas parcialmente ingurgitadas de *A. cajennense*. No entanto, a concentração deste

elemento ocorre apenas em algumas regiões da célula, sugerindo que logo após a síntese o material seja liberado na hemolinfa, e apenas pequenas quantidades permaneçam armazenadas na célula (DENARDI et al., 2009). De acordo com Ricardo et al. (2007), os polissacarídeos encontrados em oócitos de *Amblyomma triste* Koch, 1844 podem ser produzidos pelos mesmos; ou se originarem nas células do pedicelo, que podem produzir carboidratos ou ainda atuar na absorção deste composto para que estes sejam transportados para os oócitos. Não foram investigados polissacarídeos em oócitos de *R. (B.) microplus*.

2.4.4 Ovulação e maturação do oócito no trato genital

Se adequadamente fertilizadas, fêmeas ingurgitadas de carrapatos iniciam a ovulação dentro de uma a duas semanas depois de iniciada a alimentação. Como a ovulação é contínua, oócitos acumulam no lúmen do ovário ou do útero, e essas regiões podem iniciar uma grande distensão. Nos ovidutos, entretanto, os oócitos tendem a ser alinhados um atrás do outro em forma de cordão de pérolas (SONENSHINE, 1991).

Depois da cópula, as fêmeas de ixodídeos estocam o espermatóforo, contendo os espermatozoides dos machos, em um grande útero ou em uma expansão na porção cervical da vagina (OBENCHAIN; GALUN, 1982). Segundo Balashov (1968), a fertilização dos carrapatos ocorre na parte ampular do oviduto das teleóginas, onde os espermióforos se acumulam. Após o oócito entrar na ampola do oviduto, uma porção da espessa membrana externa do oócito é dissolvida pelo espermatozoide para penetração do núcleo. Após fertilização, o pró-núcleo masculino estimula o recomeço da divisão de maturação do oócito primário. A segunda divisão de maturação (clivagem) e a união dos pró-núcleos masculino e feminino ocorrem somente após a postura (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

2.4.5 Embriogênese

O desenvolvimento embrionário de *R. (B.) microplus* se completa em aproximadamente 21 dias quando os ovos são mantidos a $27 \pm 1^\circ \text{C}$, UR > 80% e escotofase. Até o quinto dia após a postura, o embrião se encontra na fase de sincício, quando é uma massa de citoplasma contendo vários núcleos envolvidos por uma única membrana plasmática. Mas no quarto dia começam a ocorrer divisões mitóticas, e no sexto dia a celularização já pode ser observada, confirmando a fase de blastoderme. A partir do sétimo dia o embrião já está claramente distinguido da membrana extra-embriônica e a segmentação é evidente (CAMPOS et al., 2006).

O rápido desenvolvimento do embrião requer um suporte energético prontamente disponível. Como dito anteriormente, a nutrição do embrião fica a cargo das proteínas, lipídios e carboidratos estocados pelo oócito em grânulos de vitelo durante o seu amadurecimento no ovário (CAMPOS et al., 2006). Estes grânulos armazenam Vt, que é o substrato, e as enzimas necessárias para a sua degradação (FAGOTTO, 1990; SAPPINGTON; RAIKHEL, 1998). A degradação enzimática da Vt para nutrição do embrião (FAGOTTO, 1990; LOGULLO et al., 1998; SORGINE et al., 2000; SEIXAS, et al., 2003; FIALHO et al., 2005) é disparada durante a embriogênese, através da acidificação dos grânulos de vitelo, que ativam as enzimas proteolíticas (FAGOTTO, 1991; LIU et al., 1996; CHO et al., 1999; ABREU et al., 2004).

Recentemente foram descobertas outras possíveis fontes de energia para o desenvolvimento do embrião de *R. (B.) microplus*: os carboidratos e lipídios (CAMPOS et al., 2006; MORAES et al., 2007). Estes substratos ainda são pouco estudados durante a embriogênese, mas a quantificação dos principais constituintes dos ovos no curso do desenvolvimento embrionário sugere que lipídios e carboidratos são as principais fontes de

energia dos ovos, principalmente no início da embriogênese. Uma acentuada diminuição no conteúdo de lipídios totais ocorre entre o quinto e o sétimo dia de desenvolvimento, sugerindo que os lipídios são a principal fonte de energia para a celularização. Em seguida, entre o sétimo e o nono dia ocorre uma queda brusca no conteúdo de carboidratos, que são utilizados durante o período de segmentação morfológica do embrião (CAMPOS et al., 2006).

Apesar da utilização dos carboidratos nas primeiras etapas de formação do embrião, o conteúdo de glicose nos ovos é baixo nos primeiros dias de embriogênese, e aumenta somente após o nono dia de desenvolvimento. A concentração de glicogênio, por sua vez, é maior no primeiro dia de desenvolvimento (cerca de 140 ng/ovo, que correspondem a 2,8µg/mg de ovos), esse glicogênio é consumido nos primeiros sete dias de desenvolvimento, caindo progressivamente até quase chegar à zero no sétimo dia, em seguida é re-sintetizado e por volta do décimo segundo dia após a postura ultrapassa a concentração do início da embriogênese, voltando a cair até o dia da eclosão (MORAES et al., 2007).

Ainda de acordo com Moraes et al. (2007) depois da formação da blastoderme, um estágio de intensa degradação de aminoácidos é iniciado. A guanina é o produto de excreção do nitrogênio produzido durante a degradação de aminoácidos em aracnídeos. Sendo assim uma grande concentração de guanina pode ser observada nos ovos em estágios finais da embriogênese (URICH, 1990). No mesmo período é observado um aumento no conteúdo de glicose, que indica a atividade de uma enzima participante da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK). Isto sugere que o aumento de glicose no fim do período de embriogênese é obtido pelo catabolismo de aminoácidos. Este processo é acompanhado por uma significativa ressíntese de glicogênio (MORAES et al., 2007).

2.5 Composição dos Ovos

Em se tratando de carrapatos, poucos estudos têm focado na identificação dos lipídios presentes nos ovos. Em *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1908) foram analisadas as composições de ácidos graxos nas fêmeas, ovos e larvas (MAROUN; KAMEL, 1973), sendo, para cada estágio, encontrados cinco ácidos graxos em maior quantidade: ácido palmítico, esteárico, oléico, linoléico e outro ácido graxo que não foi identificado. Durante a embriogênese, a concentração dos ácidos graxos totais diminuiu bruscamente antes da eclosão das larvas, enfatizando a utilização desses como um recurso de energia para eclosão.

Em 1977, Hussein e Kamal verificaram que nos ovos, larvas e hemolinfa das fêmeas de *D. andersoni* quatro classes de fosfolipídios eram predominantes: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina e lisofosfatidilcolina; também foram detectados fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol e ácido fosfatídico, porém em baixas quantidades. Ainda, na hemolinfa da fêmea a concentração de lisofosfatidilcolina foi quatro vezes maior durante a postura do que no ingurgitamento e nos ovos durante a embriogênese, com diminuição em cerca de 10% em sua concentração nos ovos de terceiro dia havendo posteriormente um aumento de 250%.

Ovos de *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) foram analisados quanto à composição de lipídios (IWUALA et al., 1979), ácidos graxos e glicogênio (IWUALA et al., 1981) durante a postura. Foram identificados sete grupos de lipídios: fosfolipídios; ácidos graxos livres; monoglicerídeos; diglicerídeos, triglicerídeos, ésteres de colesterol e colesterol. Em relação aos ácidos graxos livres nos ovos de *B. decoloratus* (IWUALA et al., 1981) durante a postura observou-se uma queda progressiva em sua concentração, chegando a menos de um terço após trinta dias de oviposição quando comparado ao início da postura. Em relação ao glicogênio, a média contida por mg de ovos diminuiu muito rapidamente após o início da postura se tornando indetectável ao final da oviposição. Perfis similares para ácidos graxos

livres e glicogênio foram observados pelos mesmos autores (IWUALA et al., 1981) em *Amblyomma variegatum* (Fabricius, 1794).

Ao analisar lipídios em ovos de *Argas (Persicargas) arboreus* Kaiser, Hoogstraal and Kohls, 1964 Maroun (1972) encontrou fosfolipídios, esteróis livres, triglicerídeos, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres, monoglicerídeos e diglicerídeos. Sendo também constatado que a concentração de esteróis não foi alterada durante o desenvolvimento embrionário, e que a quantidade de ácido palmítico foi maior em ovos do que em larvas. Com relação aos fosfolipídios, foram detectados fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, esfingomiéline, lisofosfatidilcolina, em maiores concentrações; além de fosfatidilinositol, difosfatidilglicerol e ácido fosfatídico (HUSSEIN; KAMAL, 1977).

Em outra espécie de Argasidae, *Argas (Persicargas) persicus* (Oken, 1818), foram detectados nos ovos fosfolipídios, esteróis livres, triglicerídeos, ésteres de colesterol, ácidos graxos livres, além de mono e diglicerídeos (MAROUN, 1972).

Em relação a *R. (B.) microplus*, foi realizada investigação quantitativa das gorduras totais e esteróis nas fêmeas durante a alimentação, digestão e oviposição (KITAOKA, 1961). Onde foi verificado que a utilização dos esteróis pela fêmea está relacionada com o tempo de repasto sanguíneo e o número de ovos. Ceras cuticulares foram investigadas por Gilby (1957), que verificou uma alta concentração de colesterol e ésteres de colesterol, além das cadeias longas de ácidos e alcoóis normalmente presentes.

Em pesquisa mais recente, proteínas dos ovos de *R. (B.) microplus* foram avaliadas nos diferentes dias de postura através de análise do perfil eletroforético. Foi verificado que algumas proteínas se tornam indetectáveis à medida que se aproxima o fim da oviposição (RAIA, 2007). Nesta espécie, este é o único trabalho relacionando o ritmo biológico da postura com a deposição de nutrientes pela fêmea. Outros trabalhos disponibilizam dados sobre enzimas envolvidas no metabolismo de glicogênio (LOGULLO et al., 2009).

Levando em consideração a importância dos lipídios e carboidratos no desenvolvimento dos embriões e dados de biologia ainda não compreendidos do ponto de vista fisiológico; e em continuidade aos estudos sobre mecanismos intrínsecos que têm influência sobre a biologia da oviposição, este estudo teve como objetivo avaliar se a concentração dos lipídios totais, triglicerídios, colesterol, glicose e glicogênio; bem como, a composição e perfis dos lipídios neutros e fosfolipídios nos ovos de *R. (B.) microplus* variam durante a oviposição; e se essa variação pode ser associada às diferenças de eclodibilidade larval observadas na literatura.

Desta forma, em carrapatos, pela primeira vez se está correlacionando o ritmo biológico da postura com a deposição de lipídios e carboidratos pela fêmea.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

Esse projeto foi desenvolvido no Laboratório de Ixodologia localizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas Wilhelm Otto Neitz e no Laboratório de Acarologia, pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal; Laboratório de Biofísica e Química Fisiológica do Departamento de Ciências Fisiológicas. Todos patrimônios da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; Laboratório de Bioquímica de Lipídios, pertencente ao Instituto de Bioquímica Médica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

3.2 Origem e Manutenção dos Ixodídeos no Laboratório

3.2.1 Origem

Os carrapatos utilizados no experimento foram gentilmente cedidos pelo Laboratório de Controle Microbiológico de Ixodídeos do Departamento de Parasitologia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, onde as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram obtidas a partir de infestação artificial em bezerros mestiços, de ambos os sexos, alimentados com ração peletizada própria para a espécie ([®]Ternerina), capim *Brachiaria* sp e água *ad libitum*. Os bezerros infestados não estavam infectados com hemoparasitos e foram acomodados em baias, as quais dificultavam o contato dos bezerros com carrapatos do ambiente. Em todas as etapas do experimento foram respeitadas as normas da Sociedade Brasileira de Ciências em Animais de Laboratório (SBCAL).

3.2.2 Manutenção das fêmeas ingurgitadas no laboratório

Após desprenderem-se naturalmente, as fêmeas ingurgitadas de *R. (B.) microplus* foram lavadas em solução de hipoclorito a 1,0 %, enxaguadas em água corrente e secas em papel toalha. As fêmeas limpas foram pesadas em balança analítica e em seguida coladas com esparadrapo em decúbito dorsal em placas de Petri, que foram acondicionadas em estufa para demanda biológica de oxigênio (B. O. D.) sob condições controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase). Durante a pesagem foram selecionadas para o experimento fêmeas com pesos entre 151 e 360 mg, totalizando 409 teleóginas, pois de acordo com Borges et al. (2001) fêmeas desta faixa de peso apresentam melhores índices de conversão em ovos. No mesmo horário, a cada 24 horas, as fêmeas eram observadas para que o início da oviposição fosse detectado.

3.3 Obtenção das Amostras

Das 409 fêmeas de *R. (B.) microplus* mantidas na BOD, 366, com peso médio e desvio padrão de $269,4 \pm 36,6\text{mg}$, iniciaram a postura concomitantemente no terceiro dia após a queda. Usando a mesma metodologia de observação a cada 24 horas, toda a massa de ovos depositada por cada fêmea neste intervalo, era retirada e misturada às demais. Desta mistura foram coletadas três amostras, duas de 50mg; uma para dosagem de lipídios totais, colesterol, triglicerídio e glicose (Amostra 1), outra para HPTLC (Amostra 2); a terceira amostra, de 1,0g, foi utilizada para dosagem de glicogênio (Amostra 3).

Todas as amostras foram acondicionadas em microtubos e preservadas imediatamente em freezer a -20°C . Assim, o desenvolvimento embrionário foi interrompido e amostras diárias com mesma idade embrionológica (< 24 h) foram obtidas até o término da postura.

Visto que há um decréscimo natural da deposição de ovos após o pico da postura, a partir do décimo primeiro dia de oviposição as posturas diárias de *R. (B.) microplus* não atingiram 100 mg. Sendo assim, as cromatografias foram realizadas com ovos postos até o nono dia de postura. Após o décimo primeiro dia de oviposição o peso total das posturas diárias não chegou aos 50 mg coletados no primeiro dia. Por isso, as dosagens de lipídios totais, colesterol, triglicerídios e glicose foram realizadas do primeiro ao décimo dia de postura. A utilização de fêmeas que iniciaram postura na mesma data garantiu que os ovos do “pool” coletado diariamente correspondessem ao mesmo dia de postura de cada teleógina.

3.4 Técnicas de Dosagem

Para realização das análises as amostras foram descongeladas em temperatura ambiente e maceradas em 1,0 mL de água destilada, para que nenhum reagente interferisse nas metodologias utilizadas. Todas as dosagens foram feitas em triplicata e os resultados foram expressos em valores médios de μg de substrato/mg de ovos.

3.4.1 Lipídios totais

A dosagem de lipídios totais foi realizada através de técnica com utilização do reagente de fosfo-vanilina, preparado através da administração de 800 mL de ácido fosfórico (H_3PO_4) concentrado em 200 mL de solução de vanilina a 0,6% (FRINGS;DUNN, 1970).

Durante a realização da técnica foram adicionados 2,0 mL de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4) em tubos de ensaio contendo 0,1 mL de amostra macerada como descrito anteriormente. Em seguida estes tubos foram agitados em banho de gelo durante 10 min, logo após 0,1 mL foi transferido para um tubo contendo 5,0 mL do reagente de fosfo-vanilina. Estes tubos foram agitados e incubados a 37°C por 15 min. A leitura foi feita em espectrofotômetro ([®]BEL-Photonics, modelo 1105) a 525 nm.

3.4.2 Colesterol total

A dosagem de colesterol total foi realizada através de determinação colorimétrica com a utilização de kit enzimático de ponto final ([®]Katal). Neste método, os ésteres de colesterol da amostra são hidrolisados pela colesterol esterase produzindo colesterol livre. Este, em presença da colesterol oxidase e de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio que pela ação da peroxidase em presença de fenol e 4-aminoantipirina produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina).

Para a dosagem foram acrescentados 0,01 mL de cada amostra em tubos de ensaio contendo 1,0 mL do reagente enzimático. Estes tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37°C durante 10 min. O mesmo foi realizado com o padrão, uma solução aquosa contendo colesterol a 200 mg/dL e azida sódica a 0,1 g/dL.

As absorvâncias de cada amostra foram determinadas em espectrofotômetro ([®]BEL-Photonics, modelo 1105) a 500 nm.

3.4.3 Triglicerídios

A dosagem de triglicerídios foi realizada através de determinação colorimétrica com a utilização de kit enzimático de ponto final ([®]Katal). Neste método os triglicerídios da amostra

são hidrolisados pela lipase lipoproteica produzindo glicerol livre. Este é fosforilado pela glicerol quinase cujo produto sofre a ação da glicerol-P-oxidase a qual em presença de oxigênio, produz peróxido de hidrogênio. Este, sob a ação da peroxidase em presença de um reagente fenólico (p-clorofenol) e 4-aminoantipirina, produz um composto róseo-avermelhado (quinonimina).

Para a dosagem foram acrescentados 0,01 mL de cada amostra em tubos de ensaio contendo um mL do reagente enzimático. Estes tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37° C durante 10 minutos. O mesmo foi realizado com o padrão, uma solução aquosa contendo glicerol em quantidade equivalente a 200 mg/dL em triglicerídios e azida sódica a 0,1 g/dL.

Em seguida as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (®BEL-Photonics, modelo 1105) em 500 nm.

3.4.4 Glicose

A dosagem de glicose foi realizada através de determinação colorimétrica com a utilização de kit enzimático de ponto final (®Katal). Neste método a glicose da amostra sofre a ação da glicose oxidase em presença de oxigênio produzindo peróxido de hidrogênio; este, em presença de fenol e de 4-aminoantipirina, sofre a ação da peroxidase produzindo a quinonimina, um composto róseo-avermelhado com máximo de absorção em 505 nm.

Para realização da técnica foram acrescentados 0,01 mL de cada amostra em tubos de ensaio contendo um mL do reagente enzimático. Estes tubos foram homogeneizados e colocados em banho-maria a 37° C durante 10 minutos. O mesmo foi realizado com o padrão, uma solução a 0,25% de ácido benzóico contendo glicose a 100 mg/dL.

Em seguida as absorvâncias foram determinadas em espectrofotômetro (®BEL-Photonics, modelo 1105) em 505 nm.

3.4.5 Glicogênio

Todas as etapas da dosagem de glicogênio foram realizadas de acordo com Pinheiro e Gomes (1994).

3.4.5.1 Extração

Para a extração, 1,0 g de ovos de cada dia de postura ainda no primeiro dia de embriogênese foram macerados em 10 mL de solução a 10% de ácido tricloroacético. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado a 1.310 xg durante 5 min em temperatura ambiente. O sobrenadante foi filtrado em papel filtro previamente umedecido e mantido por 5min em banho-maria a 40° C. Após os tubos esfriarem foram adicionados 2,0 mL de etanol absoluto gelado para cada mL do sobrenadante. A solução contida nos tubos foi homogeneizada por inversão e mantida em banho de gelo picado durante 15 min. Logo após foi centrifugada a 11.270 xg por 10min a 4° C e desprezado o sobrenadante. O precipitado foi ressuspenso em 2,0 mL de água destilada. Este material foi congelado a -20° C.

3.4.5.2 Hidrólise

Na etapa de hidrólise o material congelado anteriormente foi descongelado em temperatura ambiente e uma alíquota de 1,0 mL da suspensão foi transferida para um tubo de ensaio com tampa de rosca e adicionado 1,0 mL de ácido clorídrico (HCl) 1N. Em seguida o tubo foi aquecido a 100° C por 30 min.

3.4.5.3 Neutralização

Para neutralização os tubos foram esfriados a temperatura ambiente e em seguida alcalinizados com 1,0 mL de hidróxido de sódio (NaOH) 1M. O pH foi verificado através de fitas indicadoras e a dosagem foi realizada após constatação de que o mesmo estava acima de 7.

3.4.5.4 Dosagem

Esta foi realizada a partir de uma alíquota de 1,0 mL do hidrolisado transferida para um tubo de ensaio. A este foi adicionado 1,0 mL de reativo ácido 3,5 dinitrosalicílico (3,5 DNS) e em seguida os tubos foram aquecidos a 100° C por 5 min. Após este procedimento o volume de solução foi aumentado para 15 mL e a absorbância foi lida em espectrofotômetro (®BEL-Photonics, modelo 1105) à 540 nm. As dosagens foram realizadas em triplicata e os resultados foram comparados com padrões de D-glicose nas concentrações de 0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL. Para análise estatística os resultados foram expressos em valores médios de µg de glicogênio/mg de ovos.

3.5 Análise Estatística

Os resultados das dosagens foram analisados pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, as comparações múltiplas foram feitas pelo teste de Dunn através do programa InStat. A relação entre as concentrações dos substratos e os dias de postura foi avaliada através de Regressão polinomial pelo programa GraphPad.

3.6 Análise de Lipídios

3.6.1 Dosagem de proteínas

Com o objetivo de padronizar a quantidade de proteínas presente em cada amostra durante a extração de lipídios, foi realizada a dosagem de proteínas pelo método do reagente de Folin (LOWRY et al., 1951).

3.6.2 Extração de lipídios

Os lipídios foram extraídos usando o método de Bligh e Dyer (1959). Para isso foram adicionados volumes de amostras proporcionais a 3,0 mg de proteínas em tubos de extração de lipídios. Em seguida o volume foi completado para 800 µL com água destilada, posteriormente foram acrescentados 3,0 mL de uma mistura contendo metanol:clorofórmio (2:1 v/v). Após agitação contínua durante duas horas, as soluções foram centrifugadas por 15 min a 1.900 xg em centrífuga clínica (IEC HN-SII) e o sobrenadante, contendo os lipídios, foi separado do precipitado. O precipitado foi submetido a uma segunda extração, na qual foram adicionados outros 3,0 mL da mesma mistura de solventes, seguindo-se agitação intermitente por mais uma hora, e nova centrifugação. Os sobrenadantes foram unificados e a eles adicionados 1,0 mL de água destilada e 1,0 mL de clorofórmio. Após 40s de agitação, o material foi novamente centrifugado a 1.900 xg por 30 min. Após a centrifugação as soluções de amostras e solventes apresentaram-se divididas em duas fases. A fase inferior (orgânica), contendo os lipídios, foi então separada com auxílio de seringa de vidro e transferida para tubos de reação tipo “eppendorfs” novos, resistentes a solventes orgânicos (Axygen Scientific Inc., Union City, CA, USA). O solvente foi evaporado por arraste de nitrogênio gasoso (N₂).

A massa de lipídios totais obtida foi mensurada, com auxílio de balança analítica, pela diferença existente entre “eppendorfs” após e antes da evaporação do solvente.

3.6.3 Cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC)

Para a análise do perfil de lipídios neutros e fosfolipídios contidos nos ovos de *R. (B.) microplus* de diferentes dias de postura, as amostras extraídas foram analisadas por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC) em placa de sílica com 8 cm de altura (Silica Gel, 60F₂₅₄, Merck KGaA., Frankfurt, DS, Alemanha). Antes da aplicação das amostras na sílica foi acrescentado a cada “eppendorf” volume apropriado de clorofórmio para deixar a solução de lipídios na concentração de 50 µg/µL. foram aplicados 300 µg de lipídios de cada amostra nas HPTLC's.

As cromatografias unidimensionais de lipídios neutros correram em duas etapas (MANGOLD, 1969), o sistema de solventes utilizado para a primeira etapa, quando os lipídios das amostras são arrastados até metade da altura da sílica, foi hexano:éter etílico:ácido acético (60:40:1 v/v) (VOGEL et al, 1962). Depois da corrida a placa de sílica foi deixada sobre bancada em temperatura ambiente, durante aproximadamente 1 h, para evaporação dos solventes. A segunda etapa da corrida foi realizada com solução de solventes contendo hexano:clorofórmio:ácido acético (80:20:1 v/v) (MANGOLD, 1969), nesta etapa os lipídios foram arrastados pelo solvente por toda a extensão da placa de sílica.

As cromatografias unidimensionais de fosfolipídios correram em uma única fase e o sistema de solventes utilizado foi clorofórmio: acetona: metanol: ácido acético: água (40:15:13:12:8 v/v) (RUIZ; OCHOA, 1997).

Nos dois tipos de cromatografia os lipídios foram identificados através de comparação com padrões comerciais nas concentrações de 5,0 mg/mL (Sigma-Aldrich Corp, St Louis, MO, USA). Foram aplicados 5 µg de cada padrão. Após as corridas e evaporação dos solventes das sílicas as HPTLC's foram borrifadas com solução de “charring” constituída de sulfato de cobre (CuSO₄) a 10% e ácido fosfórico (H₃PO₄) a 8%, após secas as mesmas foram aquecidas a 170° C por 5-10 min entre placas de vidro (RUIZ; OCHOA, 1997).

Depois de frias, ainda sem desmontar a estrutura de aquecimento, as HPTLC's foram escaneadas em aparelho de escâner convencional e a densitometria foi realizada através do programa Image Master Total Lab.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Concentrações de Lipídios e Carboidratos

As concentrações médias e os desvios padrões do conteúdo de lipídios totais, triglicerídios, colesterol, glicose e glicogênio em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos, de acordo o dia da postura, estão na Tabela 1. O cálculo do desvio padrão foi realizado para detecção de possíveis erros metodológicos durante a dosagem dos substratos. Nota-se que os triglicerídios e o colesterol representam uma pequena parcela dos lipídios totais presentes em ovos de *R. (B.) microplus* de diferentes dias de postura. Os dois juntos constituem entre 1,2 e 2,29% dos lipídios totais dos ovos postos no ambiente, dependendo do dia analisado.

Tabela 1. Conteúdo de substratos em $\mu\text{g}/\text{mg}$ dos ovos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes dias de postura e com desenvolvimento embrionário estacionado nas primeiras 24 h.

Dia de postura	Concentração de substrato em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos				
	(Média \pm Desvio Padrão)				
	Lipídios Totais	Colesterol	Triglicerídios	Glicose	Glicogênio
1	336,8 \pm 30,7	4,8 \pm 1,8	2,9 \pm 1,4	2,8 \pm 0,6	0,7 \pm 0,07
2	335,3 \pm 104,2	2,1 \pm 1,4	2,8 \pm 0,9	5,8 \pm 4,1	0,7 \pm 0,09
3	350,1 \pm 31,3	2,2 \pm 0,3	2,0 \pm 1,2	1,5 \pm 0,4	0,7 \pm 0,2
4	383,4 \pm 84,6	2,1 \pm 0,7	2,9 \pm 0,5	1,6 \pm 0,8	2,1 \pm 0,3
5	294,0 \pm 46,1	1,6 \pm 0,9	2,1 \pm 0,3	2,1 \pm 0,6	0,6 \pm 0,3
6	264,4 \pm 9,2	3,6 \pm 0,7	1,8 \pm 1,5	1,5 \pm 0,5	0,4 \pm 0,2
7	296,9 \pm 29,1	3,7 \pm 1,0	2,7 \pm 0,9	1,6 \pm 0,9	1,4 \pm 0,2
8	305,8 \pm 27,0	2,2 \pm 0,7	3,0 \pm 1,3	5,1 \pm 3,2	0,3 \pm 0,09
9	325,0 \pm 33,3	2,3 \pm 0,6	1,7 \pm 0,8	5,8 \pm 3,9	0,4 \pm 0,4
10	316,1 \pm 15,6	2,6 \pm 0,7	1,7 \pm 1,5	2,9 \pm 1,4	-

4.1.1 Dosagem de lipídios totais

De acordo com a análise estatística as concentrações de lipídios totais não sofreram alterações significativas ao longo da postura ($p > 0,05$). O teste de regressão polinomial de quarta ordem não constatou relação entre o dia da postura e a quantidade de lipídios totais presente em um miligrama de ovos (Figura 1).

Assim pode-se observar que a quantidade de lipídios totais depositada nos ovos varia pouco durante a postura, e mesmo sem significância estatística observa-se que os grupos de ovos com maior taxa de eclodibilidade larval (ovipostos nos dias 5, 6 e 7 de postura) tiveram a menor quantidade de lipídios totais. Sendo assim, são necessários estudos para esclarecer qual a quantidade mínima de lipídios totais necessários para um desenvolvimento embrionário satisfatório. Pois de acordo com Campos et al. (2006) este substrato é a principal fonte de

energia para o desenvolvimento do embrião no início da embriogênese. Isto pode ser constatado através da observação da diminuição do conteúdo de lipídios totais entre o quinto e o sétimo dia de desenvolvimento. Indicando a importância deste substrato para a reprodução.

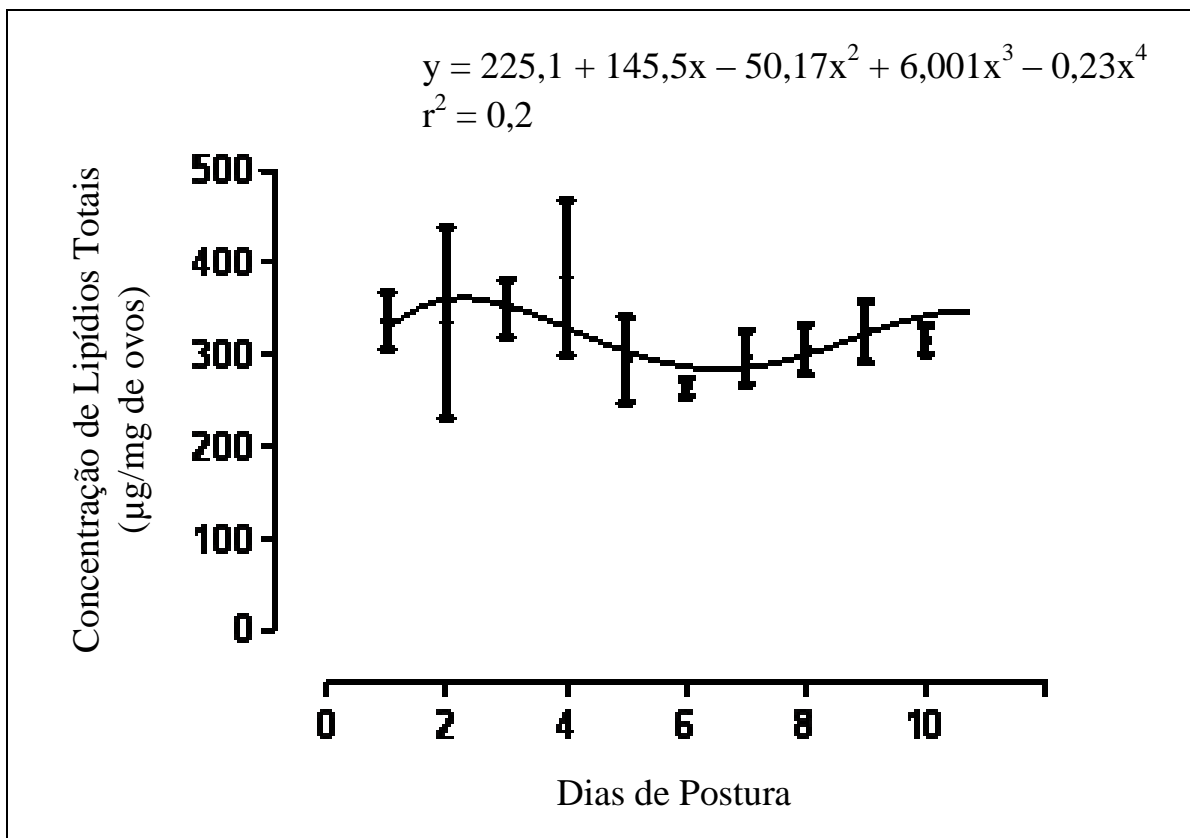


Figura 1. Concentração de lipídios totais em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase).

4.1.2 Dosagem de Colesterol

Neste estudo, a análise estatística não apontou diferença significativa entre o conteúdo de colesterol dos ovos de *R. (B.) microplus* ($p > 0,05$), assim como não houve relação deste com o dia da oviposição através da análise de regressão polinomial de terceira ordem (Figura 2). Apesar da falta de significância estatística, através do gráfico podemos observar uma ligeira queda progressiva na concentração deste substrato nos ovos colocados no ambiente em diferentes dias de postura.

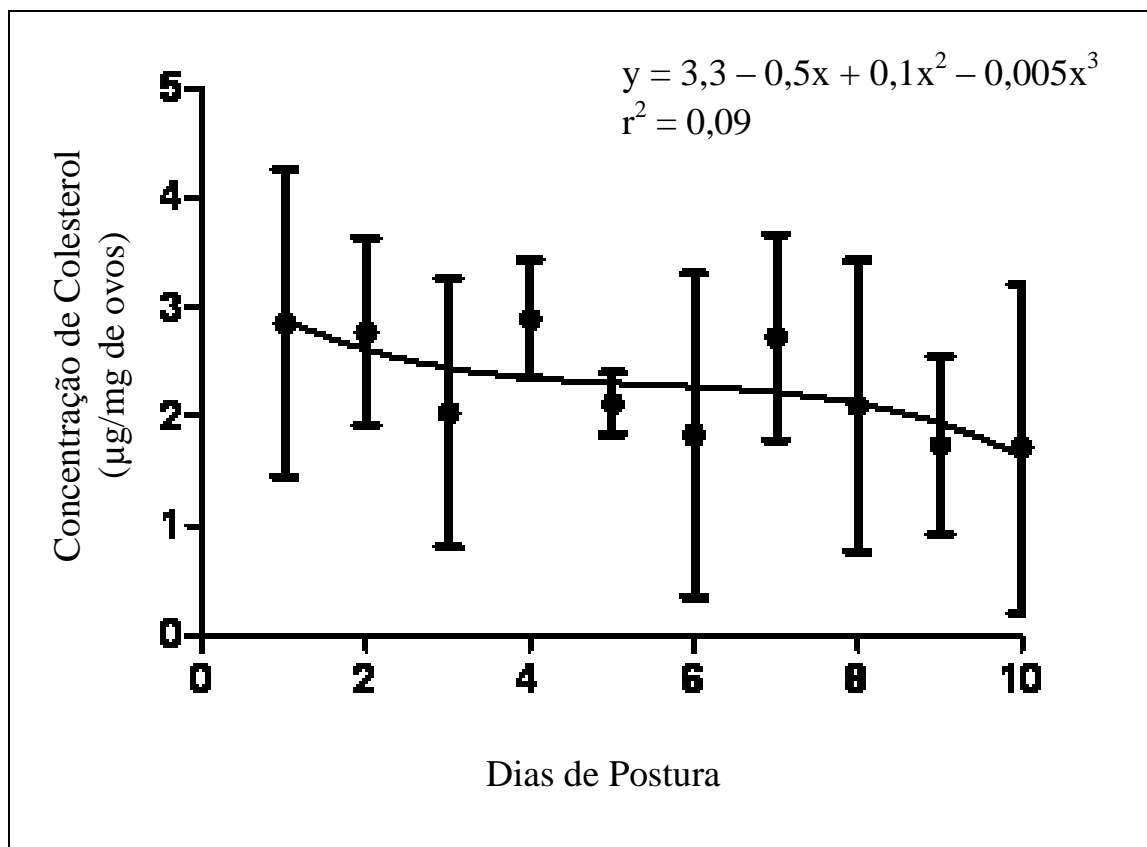


Figura 2. Concentração de colesterol em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase).

Insetos necessitam de uma quantidade relativamente alta de esteróis e durante o seu desenvolvimento, uma concentração constante é observada em seus tecidos (CLAYTON, 1964), sugerindo que a maior parte da dieta de esteróis é utilizada como elemento da estrutura celular. Pois em mamíferos o colesterol livre possui função indispensável na manutenção de estruturas de membrana, estando presente na membrana das células vermelhas, no retículo endoplasmático, nas mitocôndrias e seus derivados e em maior quantidade na bainha de mielina dos nervos (VOET et al., 2000).

Em *R. (B.) microplus* o conteúdo de colesterol foi analisado em ovos e em fêmeas antes e após a postura (CHERRY, 1976). O autor constatou que a quantidade de colesterol presente nas teleóginas foi diretamente proporcional ao peso e aproximadamente um terço foi transferido para os ovos. Sendo assim, ovos oriundos de fêmeas mais pesadas tiveram um conteúdo maior de colesterol/mg, contudo a média encontrada foi de $1,50 \text{ mg/g}$ de ovos com amplitude de $1,45 - 1,55 \text{ mg/g}$ e o autor não mencionou se houve diferença significativa entre o conteúdo de colesterol nos ovos de fêmeas com diferentes faixas de peso. Somente parte do colesterol mantido pelas teleóginas foi constatado nas fêmeas após a postura, indicando que parte deste substrato é utilizado para as funções metabólicas da fêmea ou como fonte energética para a manutenção da postura. Não houve menção sobre a metodologia de coleta, não sendo relatado o dia de postura em que os ovos foram coletados, e nem mesmo o período embrionário dos ovos no momento da quantificação do colesterol.

A amplitude dos desvios padrões observados na Figura 2 pode ser consequência do intervalo de pesos das fêmeas otimizadas, que foi de 151 a 360 mg, de acordo com Cherry (1976) a concentração de colesterol nos ovos é dependente do peso da fêmea antes da postura. Sendo assim não podemos descartar a hipótese de influência do colesterol na eclodibilidade

larval de ovos de diferentes dias de postura. Por isso, seria interessante a realização de estudos utilizando grupos de fêmeas de diferentes faixas de peso para melhor averiguar a significância das alterações observadas no gráfico da concentração de colesterol nos ovos por dia de postura (Figura 2). Pois como os ovos são estruturas leves e pequenas (LABRUNA et al, 1997), alterações de sua composição em princípio insignificantes podem ter grandes consequências biológicas.

Apesar da aparente falta de comparabilidade entre os resultados, podemos observar que estes são próximos aos encontrados por Cherry (1976). Uma possível explicação para a diferença entre as concentrações de colesterol nos dois experimentos seria o fato de que parte do conteúdo de colesterol dos ovos utilizados por Cherry (1976) já estivessem sido utilizados devido alterações características ao desenvolvimento do embrião.

Estes resultados demonstram a importância do colesterol durante a fase reprodutiva dos carrapatos. É importante a realização de estudos que comprovem a função do colesterol nos ovos de ixodídeos durante o período de desenvolvimento embrionário.

4.1.3 Dosagem de triglicerídios

A análise das concentrações de triglicerídios em ovos de diferentes dias de postura através do teste de Kruskal-Wallis não constatou diferença significativa no conteúdo deste substrato nos ovos ($p > 0,05$). Através do teste de regressão polinomial de terceira ordem não foi constatada relação entre os dias de postura e a quantidade de triglicerídios presente em um miligrama de ovos (Figura 3).

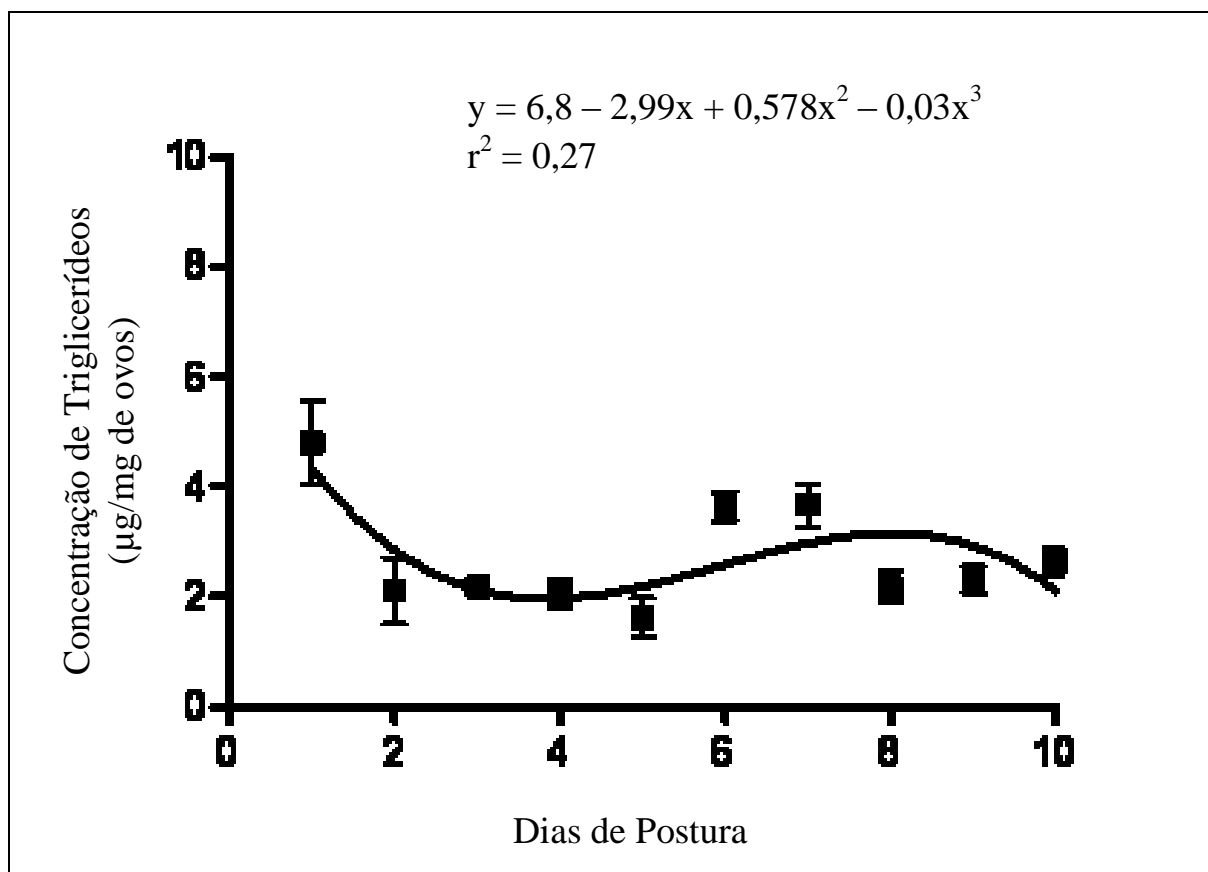


Figura 3. Concentração de triglicerídios em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase).

Os triglicerídeos são a principal fonte de energia dos animais e, portanto devem servir também como fonte energética para o desenvolvimento larval. Estes lipídeos geralmente não estão envolvidos com sinalização celular (VOET et al., 2000), um evento que deve ser o direcionador da taxa de eclodibilidade diferencial durante os dias de postura., portanto a ausência de diferenças quanto as suas concentrações de triglicerídeos em diferentes dias de postura é um dado corroborativo com essa idéia.

4.1.4 Dosagem de glicose e glicogênio

Não foram detectadas diferenças significativas nas concentrações de glicose (Figura 4) e glicogênio (Figura 5) ao longo da postura de acordo com o teste de Kruskal-Wallis. A partir do teste de regressão polinomial de quarta ordem pode-se observar que não há relação entre o dia da postura e a concentração destes substratos nos ovos de *R. (B.) microplus*.

Os açúcares ou carboidratos, como a glicose, foram descobertos recentemente como outras possíveis fontes de energia para o desenvolvimento do embrião de *R. (B.) microplus* (CAMPOS et al., 2006; MORAES et al., 2007). Estes substratos ainda são pouco estudados durante a embriogênese, mas a quantificação dos principais constituintes dos ovos no curso do desenvolvimento embrionário sugere que lipídios e carboidratos sejam as principais fontes de energia dos ovos, principalmente no início da embriogênese. Uma acentuada diminuição no conteúdo de lipídios totais ocorre entre o quinto e o sétimo dia de desenvolvimento, sugerindo que os lipídios são a principal fonte de energia para a celularização. Em seguida, entre o sétimo e o nono dia ocorre uma queda brusca no conteúdo de carboidratos, utilizados durante o período de segmentação morfológica do embrião (CAMPOS et al., 2006).

Apesar da utilização dos carboidratos nas primeiras etapas de formação do embrião, o conteúdo de glicose nos ovos é baixo nos primeiros dias de embriogênese, e aumenta somente após o nono dia de desenvolvimento. A concentração de glicogênio, por sua vez, é maior no primeiro dia de desenvolvimento (cerca de 140 ng/ovo, que correspondem a 2,8µg/mg de ovos), sendo consumido nos primeiros sete dias, caindo progressivamente até quase chegar a zero no sétimo dia, em seguida o glicogênio é re-sintetizado e por volta do décimo segundo dia de embriogênese ultrapassa a concentração do primeiro dia de desenvolvimento, voltando a cair até o dia da eclosão (MORAES et al., 2007).

Gliconeogênese é a via metabólica pela qual se produz glicose por meio da conversão de compostos não glicídicos, como o ácido láctico. Neste caso, os precursores da glicose são o lactato, piruvato, alguns aminoácidos e glicerol. Sendo o último liberado pela hidrólise dos triglicerídios. Durante a embriogênese de *R. (B.) microplus*, depois da formação da blastoderme, um estágio de intensa degradação da aminoácidos é iniciado (MORAES et al., 2007). Durante a degradação de aminoácidos em aracnídeos é produzido nitrogênio, que é excretado sob a forma de guanina (URICH, 1990). Em ixodídeos uma grande quantidade de guanina pode ser observada nos ovos em estágios finais da embriogênese. Neste mesmo período um aumento no conteúdo de glicose, indicando a atividade de uma enzima participante da gliconeogênese, a fosfoenolpiruvato-carboxiquinase (PEPCK). Isto sugere que o aumento de glicose no fim do período de embriogênese é obtido pelo catabolismo de aminoácidos, uma vez que estes oferecem o esqueleto carbônico para a glicose que está sendo sintetizada. Concomitantemente pode-se observar uma significativa ressíntese de glicogênio (MORAES et al., 2007). Neste trabalho, as concentrações de glicose e glicogênio foram consideradas muito baixas nos ovos de primeiro dia de todo o período de postura, corroborando os achados de Moraes et al. (2007).

Estes achados não corroboram as observações de Iwuala et al. (1981) para dosagem de glicogênio nos ovos de *B. decoloratus* e *A. variegatum*. Já que para estes foi observada uma elevada concentração inicial de glicogênio nos ovos postos no primeiro dia de oviposição,

seguidos por uma queda progressiva na concentração deste substrato nos ovos dos dias seguintes até chegar a zero nos ovos do último dia de postura. Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de que os autores podem não ter interrompido o desenvolvimento embrionário, já que não mencionam a metodologia utilizada para tal.

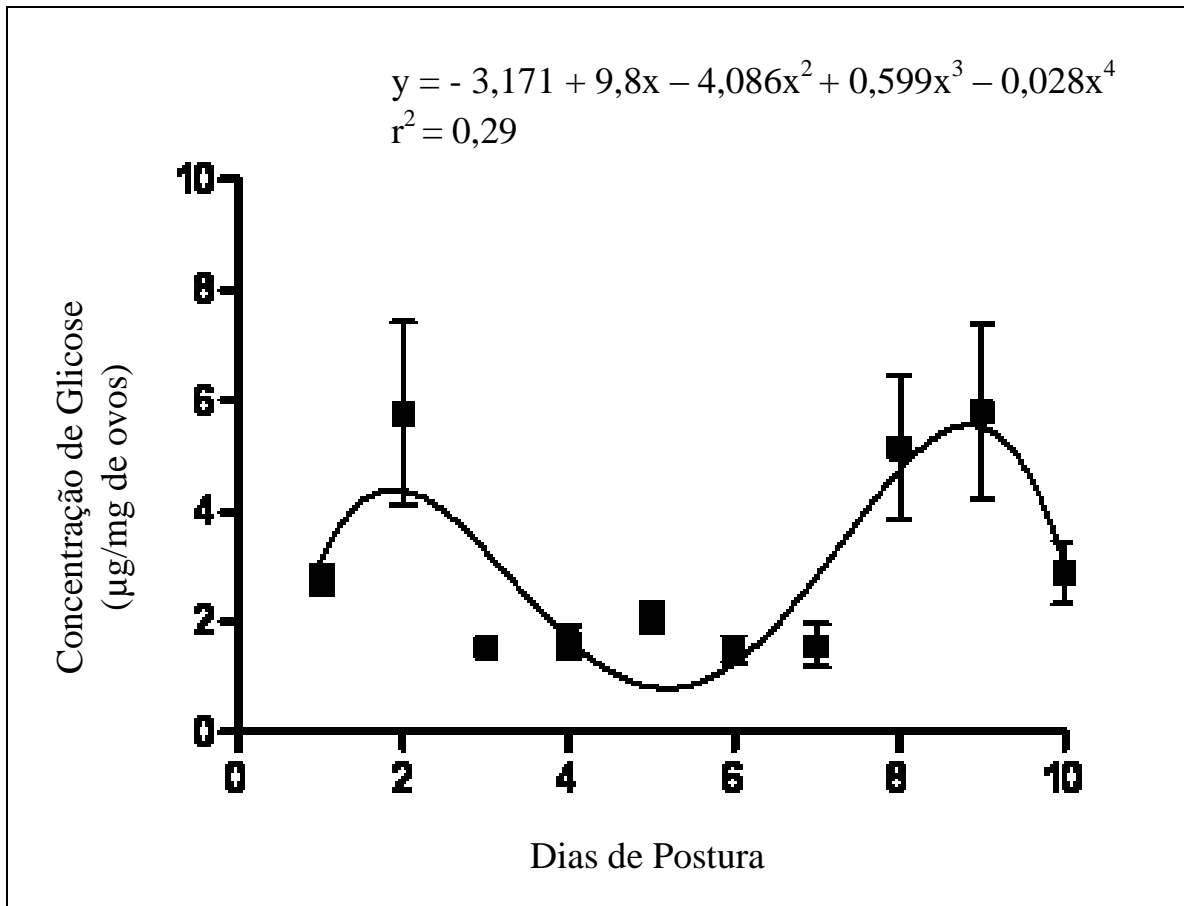


Figura 4. Concentração de glicose em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

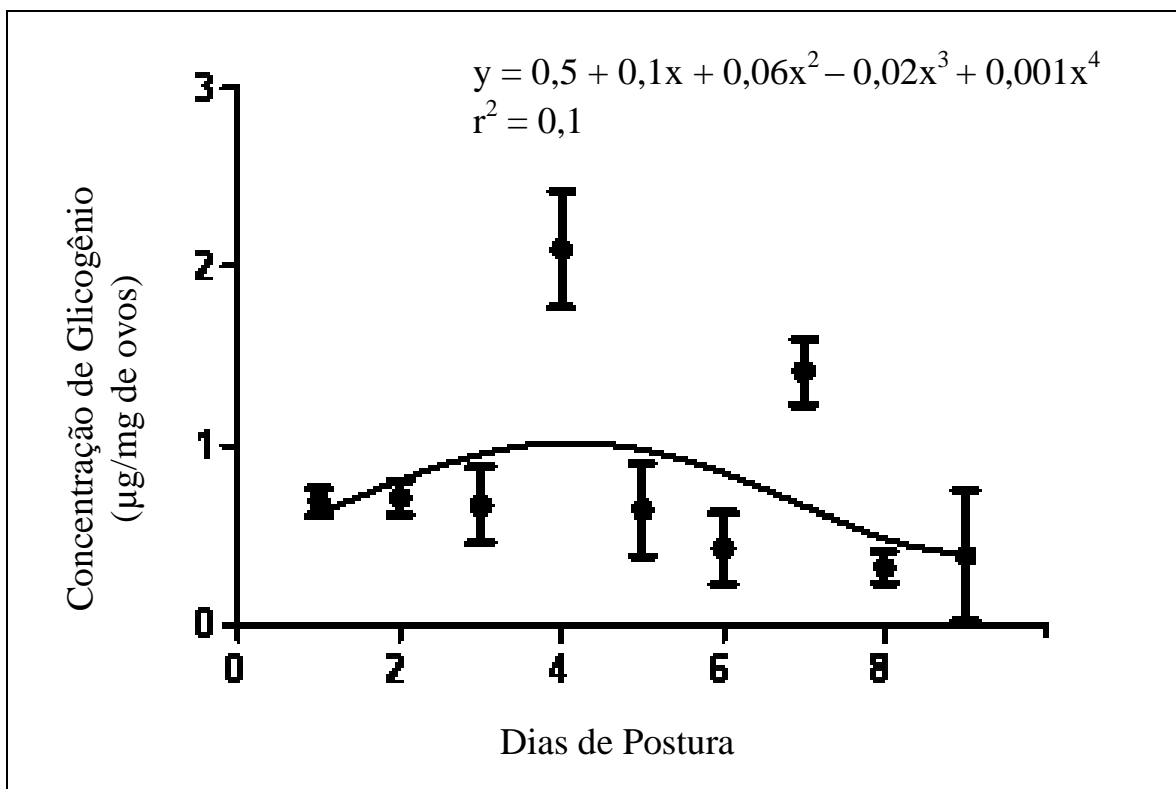


Figura 5. Concentração de glicogênio em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

4.2 Composição de Lipídios Neutros

O perfil de lipídios neutros foi avaliado através de densitometria das HPTLC's (Figura 6). Foram detectados seis tipos de lipídios neutros (Tabela 2). De acordo com os dados da Tabela 2, pode-se observar que os ovos de *R. (B.) microplus* postos em diferentes dias não apresentaram alterações significativas na composição de lipídios neutros, à exceção dos ovos do quinto dia, nos quais não foram identificadas quantidades significativas de colesterol esterificado (CHOE) (Figura 7). Nesses ovos foram observados percentuais um pouco mais elevados de hidrocarbonetos (HC s e diglicerídeos + colesterol livre (DG+CHO) do que em ovos de outros dias de postura. Para determinar exatamente o percentual de DG e CHO será necessário utilizar uma nova técnica de separação, pois na HPTLC esses dois substratos não puderam ser observados separadamente.

De forma simplificada, o colesterol é formado a partir da ciclização do esqualeno, um HC que contém 30 átomos de carbono (C_{30}) (STRYER, 1996). Apesar do HC das amostras não ter sido identificado, pode-se especular que os oócitos precursores dos ovos postos no dia em questão absorveram apenas pequena quantidade de CHO livre, ou ainda que as moléculas de CHO produzidas através dos s absorvidos ainda não haviam sido esterificados no momento do congelamento, que ocorreu em menos de 24 h após a postura. De acordo com dados de biologia, ovos do quinto dia de postura de *R. (B.) microplus* apresentam o maior percentual de eclosão quando comparados aos ovos postos em outros dias (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974). A relação entre a variação destes substratos também pode ser observada nos ovos do segundo dia de postura, quando o percentual de DG+CHO pode ser considerado baixo, o de CHOE está em sua quantidade mais elevada e a quantidade de HC é uma das maiores observadas nos ovos postos em diferentes dias. Desta forma, como este é

um estudo pioneiro com relação a ovos postos em diferentes dias de postura em *R. (B.) microplus*, ainda são necessários estudos específicos para avaliar a função e a vantagem da síntese posterior de CHOE nos ovos do quinto dia de oviposição.

Já foram estudados lipídios em ovos de outros carrapatos. Além dos lipídios observados nos ovos *R. (B.) microplus*, em ovos de *B. decoloratus* (IWUALA, et al., 1979) e nos argasídeos *A. (P.) arboreus* e *A. (P.) persicus* (MAROUN, 1972), através de cromatografia de camada delgada, foi constatada a presença de monoglicerídeos (MG), o que diverge dos dados encontrados para *R. (B.) microplus*. Outro dado divergente está relacionado ao comportamento dos ácidos graxos (AGs). De acordo com Iwuala et al. (1981) este lipídio apresentou queda progressiva nos ovos de *B. decoloratus* e *A. variegatum* durante o período de postura, chegando a menos de um terço após trinta dias de oviposição. Neste trabalho foi observado o comportamento da concentração dos lipídios nos ovos postos ao longo do período de postura observado (Figura 6).

Tabela 2. Percentual de lipídios neutros dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ovipostos em diferentes dias de postura.

Lipídios Neutros	Percentual de Lipídios Neutros por Dia de Postura								
	1º	2º	3º	4º	5º	6º	7º	8º	9º
HC	42	38	36	38	44	34	41	43	31
CHOE	15	18	17	18	0	14	15	17	11
TG	16	17	19	16	21	21	16	15	11
FA	14	16	12	13	14	11	12	11	13
DG+CHO	13	11	16	15	21	20	16	14	12
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*HC – hidrocarboneto; CHOE – colesterol esterificado; TG – triglicerídeos; FA – ácido graxo; DG+CHO – diacilglicerol + colesterol livre.

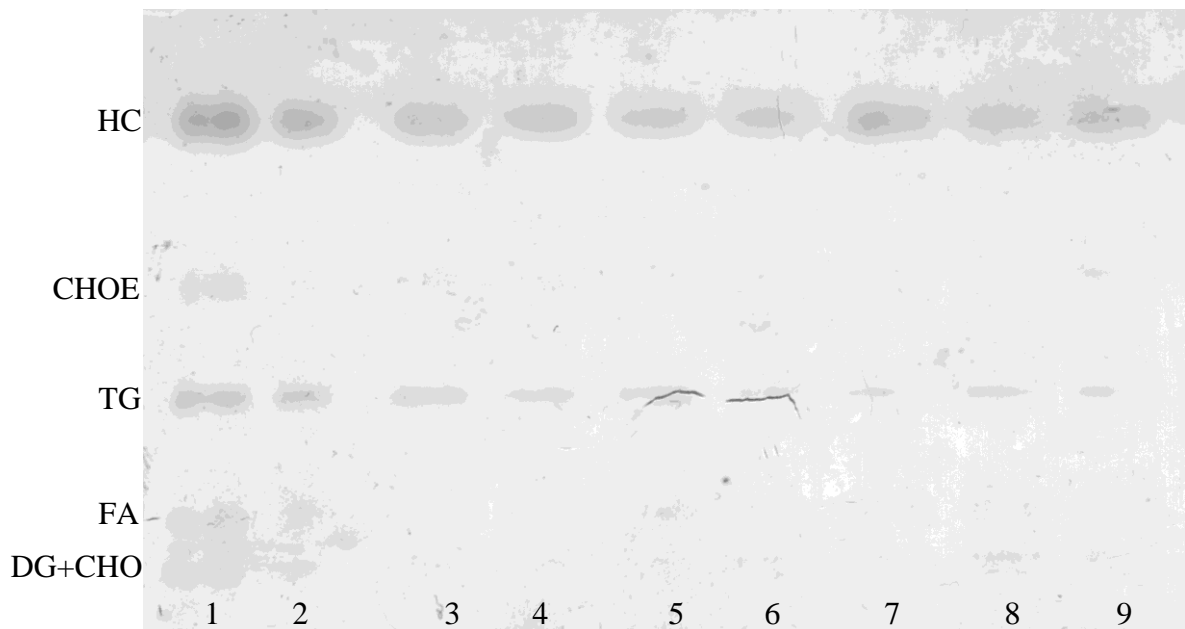


Figura 6. HTPLC de lipídios neutros contidos nos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes dias de postura. HC – hidrocarboneto; CHOE – colesterol esterificado; TG – triglicerídeos; FA – ácido graxo; DG+CHO – diacilglicerol + colesterol livre; 1-9 – Dias da postura dos ovos.

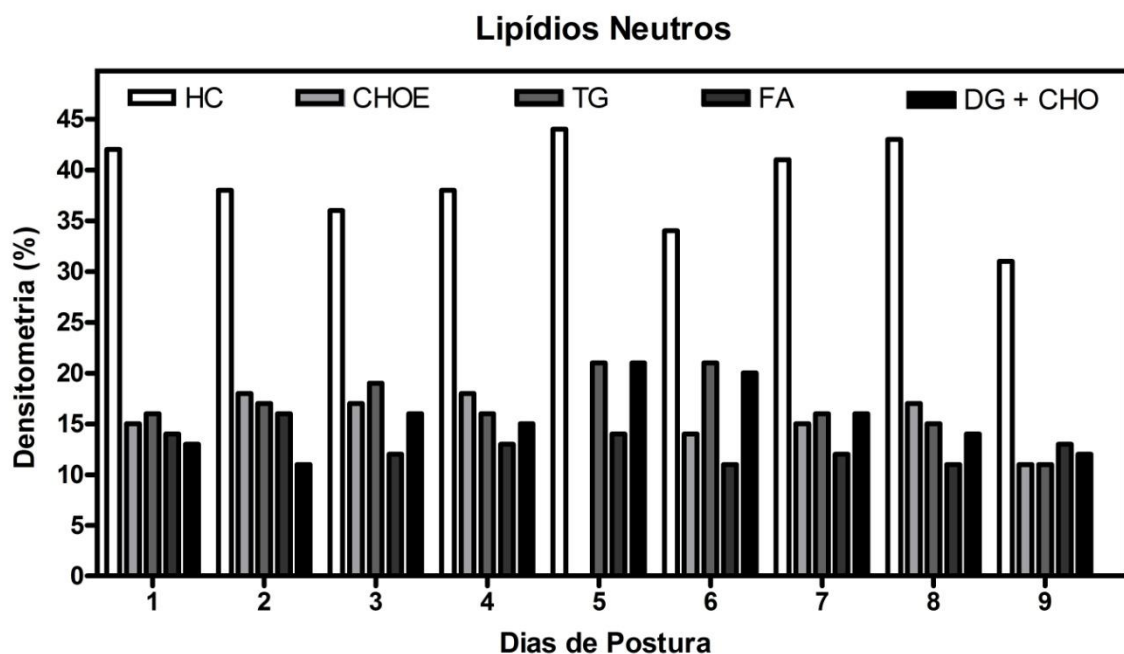


Figura 7. Variação de lipídios neutros dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes dias de postura. HC – hidrocarboneto; CHOE – colesterol esterificado; TG – triglicerídeos; FA – ácido graxo; DG+CHO – diacilglicerol + colesterol livre.

4.3 Composição de Fosfolipídios

Ao analisar os fosfolipídios dos ovos de *R. (B.) microplus* de diferentes dias de postura foi constatada a presença de cinco diferentes tipos deste substrato (Figura 8). A variação destes substratos está discriminada na Tabela 3.

Tabela 3. Percentual de fosfolipídios presentes nos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ovipostos em diferentes dias de oviposição.

Fosfolipídios	Percentual dos Fosfolipídios por Dia de Postura								
	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°
PA	20	28	23	23	20	23	19	19	21
PE	31	30	35	33	34	41	38	40	39
PC	24	23	24	27	25	5	26	26	27
PI	14	11	10	9	10	22	17	15	13
SM	11	8	8	8	11	9	0	0	0
Total	100	100	100	100	100	100	100	100	100

*PA – ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; SM – esfingomielina.

Dentre os fosfolipídios encontrados destaca-se a SM, por não ter sido detectada nos ovos postos a partir do sétimo dia de oviposição (Figura 4). De acordo com dados de biologia a diminuição da eclodibilidade larval começa a ocorrer a partir dos ovos postos no sétimo dia de oviposição, sendo agravada nos ovos do oitavo dia em diante (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974) chegando a zero nos ovos postos nos últimos dias de postura (BENNETT, 1974).

As SM's são ceramidas classificadas como esfingofosfolipídios (VOET et al., 2000), e são o substrato mais abundante da sua classe. Os esfingolipídios são moléculas que apresentam propriedades anfipáticas, isto é, tanto hidrofóbicas como hidrofílicas, o que lhes permite desempenhar um papel importante na formação de membranas biológicas (LEHNINGER, 1984). Desta forma, é importante investigar a real necessidade de SM nos ovos de *R. (B.) microplus*, pois este substrato não é encontrado nos ovos a partir do momento em que os dados biológicos mostram dificuldades de perpetuação da espécie.

Os fosfolipídios também foram encontrados em ovos de *D. andersoni* (HUSSEIN; KAMAL, 1977), *B. decoloratus* (IWUALA et al., 1981) e nos argasídeos *A. (P.) arboreus* e *A. (P.) persicus* (MAROUN, 1972). No segundo e no último apenas a presença de fosfolipídios foi detectada, enquanto no primeiro e no terceiro além dos fosfolipídios presentes em *R. (B.) microplus* também foram detectados lisofosfatidilcolina e difosfatidilglicerol.

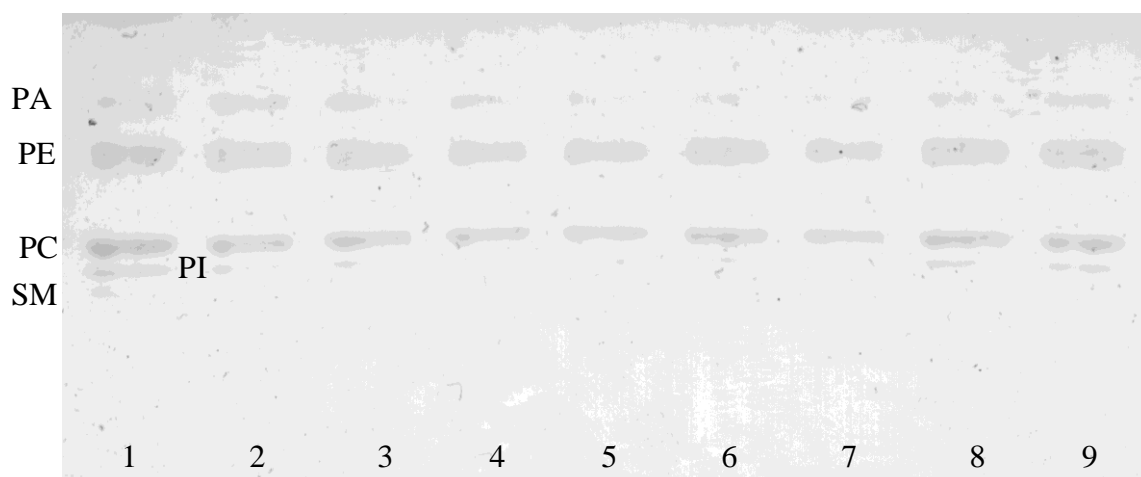


Figura 8. HTPLC de fosfolipídios contidos nos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes dias de postura. PA – ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; SM – esfingomielina; 1-9 – Dias de postura dos ovos.

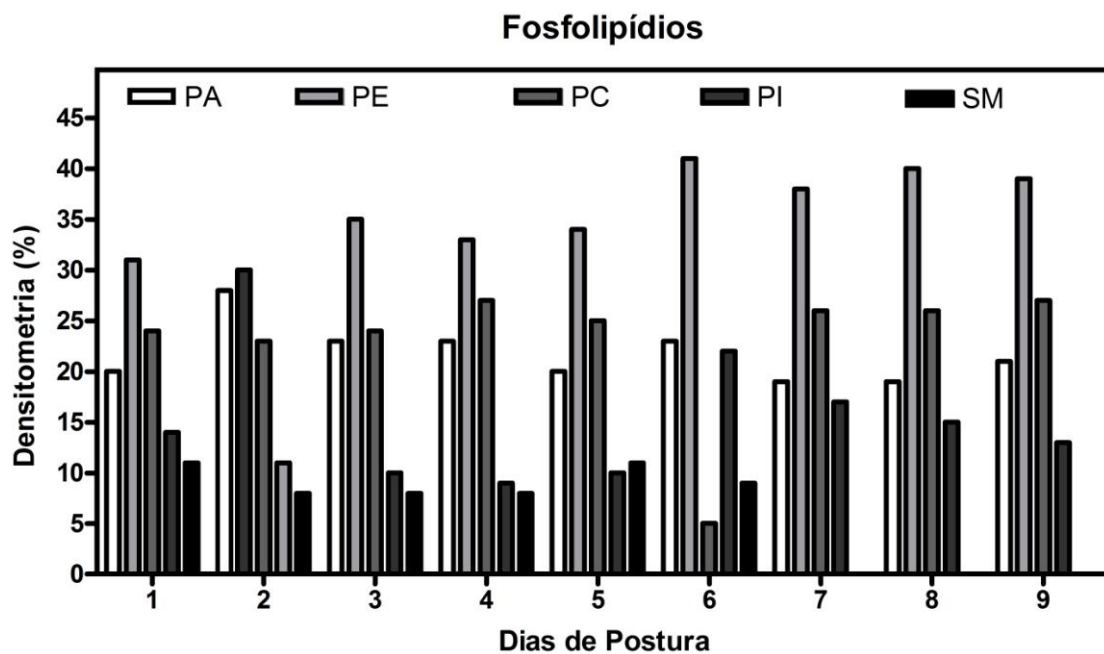


Figura 9. Variação de fosfolipídios dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes dias de postura. PA – ácido fosfatídico; PE – fosfatidiletanolamina; PC – fosfatidilcolina; PI – fosfatidilinositol; SM – esfingomielina.

5 CONCLUSÕES

Pela primeira vez foi descrita a composição de lipídios e foram quantificados os carboidratos em ovos de *R. (B.) microplus* de diferentes dias de postura;

As alterações nas concentrações de lipídios totais, colesterol, triglicerídios, glicose e glicogênio nos ovos dos carrapatos *R. (B.) microplus* ao longo dos dias de postura não são significativas, por isso não interferem na eclodibilidade larval dos ovos de diferentes dias de postura;

A ausência de colesterol esterificado nos ovos postos no quinto dia após o início da postura pode estar relacionada com a elevada taxa de eclosão larval já documentada para ovos postos neste dia de postura;

A ausência de esfingomielina nos ovos postos a partir do sétimo dia de postura pode estar relacionada com a baixa eclodibilidade dos ovos dos últimos dias de postura;

São necessários estudos em que a oferta desses lipídios seja variada para grupos de fêmeas com diferentes faixas de peso para que se possa avaliar a verdadeira importância dos lipídios na eclodibilidade larval em ovos de diferentes dias de postura.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, L. A. O.; VALLE, D. O.; MASUDA, H. ; MASUDA, A.; VAZ, I.; LOGULLO, C. Proteolytic activity of *Boophilus microplus* Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, n.5, p.443-449, 2004.
- AGBEDE, R. I. S.; KEMP, D. H.; HOYTE, H. M. D. Secretory and digest cells of female *Boophilus microplus*: invasion and development of *Babesia bovis*; light and electron microscope studies. IN: Sauer, J.R., Hair, J.A. (Eds.), **Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks**. Halsted Press, Chichester, England. 1986.
- ARTHUR, D. R. **Ticks: a Monograph of the Ixodoidea: on the Genera *Dermacentor*, *Anocentor*, *Cosmiomma*, *Boophilus* and *Margaporus***. Cambridge University Press, London, 1960.
- AVARRE, J. C.; MICHELIS, R.; TIETZ, A.; LUBZENS, E. Relationship between vitellogenin and vitellin in a marine shrimp (*Penaeus semisulcatus*) and molecular characterization of vitellogenin complementary DNAs. **Biology of Reproduction**, v.69, n.1, p.355–364, 2003.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking Ticks (Ixodoidea) – Vectors of Diseases of Man and Animals. (English translation) ed H. Hoogsraal & R. J. Tatchell. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 8, n. 5, p.161-376, 1968.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectores of diseases of man and animals. **Entomological Society of America**, p. 161-376, 1972.
- BALASHOV, Y. S., In: Raikhel A.S., Hoogstraal H. (Eds.), **An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure**. Entomological Society of America, 289 pp, 1983. (Publicação Especial).
- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância Médico-Veterinária da Região Neo-Tropical: para identificação de espécies**. São Paulo, Vox/ICTTD-3/Butantan, 223p., 2006.
- BELLATO, V.; DAEMON, E. Efeitos de três temperaturas sobre a fase não parasitária de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.6, n.1, p.21-27, 1997.
- BENNETT, G. G. Ovipositor of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p.52-61, 1974.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

- BOCK, R.; JACKSON, L. V. A.; JORGENSEN, W. Babesiosis of cattle. **Parasitology**, v. 129, suppl. S247-S269, 2004.
- BOLDBAATAR, D.; BATTSETSEG, B.; MATSUO, T.; HATTA, T.; UMEMIYA-SHIRAFUJI, R.; XUAN, X.; FUJISAKI, K. Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. **Biochemistry and Cell Biology**, v.86, n.4, p.331-344, 2008.
- BORGES, L. M. F.; CARNEIRO, J. R.; GOMES, A. G.; MOREIRA, P.C. Influência do peso inicial e da estação do ano na conversão em ovos de fêmeas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Ciência Animal Brasileira**, v.2, n.2, p.127-131, 2001.
- CAMPBELL, A.; HARRIS, D. L. Reproduction of the American dog tick, *Dermacentor variabilis*, under laboratory and field conditions. **Environmental Entomology**, v.8, n.4, p.734-739, 1979.
- CAMPOS, E.; MORAES, J.; FAÇANHA, A. R.; MOREIRA, E.; VALLE, D.; ABREU, L.; MANSO, P. P. A.; NASCIMENTO, A.; PELAJO-MACHADO, M.; LENZI, H.; MASUDA, A.; VAZ Jr., I. S.; LOGULLO, C. Kinetics of energy source utilization in *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) embryonic development. **Veterinary Parasitology**, n.138, p.349-357, 2006.
- CHERRY, L. M. Utilization of cholesterol by the cattle tick *Boophilus microplus*: cholesterol economy in the engorged female adult. **Insect Biochemistry**, v.6, p.587-594, 1976.
- CHINO, H.; YAMAGATA, M.; SATO, S. Further characterization of Lepidopteran Vitellogenin from Hemolymph and Mature Eggs. **Insect Biochemistry**, v.7, p.125-131, 1977.
- CHINZEI, Y.; YANO, I. Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.41, n.7, p. 948-950, 1985.
- CHO, W. L.; TSAO, S. M.; HAYS, A. R.; WALTER, R.; CHEN, J. S.; SNIGIREVSKAYA, E. S.; RAIKHEL, A. S. Mosquito cathepsin B-like protease involved in embryonic degradation of vitellin is produced as a latent extraovarian precursor. **The Journal of Biological Chemistry**, v.19, p.13311-13321, 1999.
- CLAYTON, R. B. The utilization of sterols by insects. A review. **Journal of Lipid Research**, v.5, p.3-19, 1964.
- COONS, L. B.; TARNOWSKI, B.; OURTH, D. D. *Rhipicephalus sanguineus*: localization of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. **Experimental Parasitology**, v.54, n.3, p.331-339, 1982.
- CROSS, D. A. E.; ALESSI, D. R.; COHEN, P.; ANDJELKOVICH, M.; HEMMINGS, B. A. Inhibition of glycogen-synthase kinase-3 by insulin-mediated by protein-kinase-B. **Nature**, v.378, n.6559, p.785-789, 1995.

CRUZ-LANDIM, C. Histological and cytological studies on the fat body of the queen honeybee abdomen during the active oviposition phase. **Revista Brasileira de Biologia**, v.45, n.3, p.221-232, 1985.

CULLIS, P. R ; HOPE, M. J. New Comprehensive Biochemistry; Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes, Physical properties and functional roles of lipids in membranes. **Journal Vance**, v.20, p.1-40, 1991.

DAVEY, R. B.; COOKSEY, L. M.; DESPINS, J. L. Survival of larvae of *Boophilus annulatus*, *Boophilus microplus*, and *Boophilus hybrids* (Acari: Ixodidae) in different temperature and humidity regimes in the laboratory. **Veterinary Parasitology**, v.40, p.305-313, 1991.

DENARDI S. E.; BECHARA G. H.; CAMARGO-MATHIAS M. I. Fat body cells of *Amblyomma cajennense* partially engorged females (Acari: Ixodidae) and their role on vitellogenesis process. **Experimental Parasitology**, v.121, n.3, p.213-218, 2009.

DENARDI, S. E.; BECHARA, G. H.; OLIVEIRA, P. R.; NUNES, E. T.; SAITO, K. C.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and vitellogenesis dynamics in the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.125, n.3-4, p.379-395, 2004.

DIEHL, P.A.; AESCHLIMANN, A.; OBENCHAIN, F. D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: **Physiology of Ticks**. Oxford: Pergamon Press, p. 277-350, 1982.

DIPEOLU, O. O. Laboratory studies on the oviposition, egg-sizes and shapes and embryonic-development of *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma maculatum*. **Acarologia**, v.32, n.3, p.233 – 244, 1991.

EMBI, N.; RYLATT, D. B.; COHEN, P. Glycogen-synthase kinase-3 from rabbit skeletal-muscl-separation from cyclic-amp-dependent protein-kinase and phosphorylase-kinase. **European Journal of Biochemistry**, v.107, n.2, p.519-527, 1980.

ENGELMANN, F. Hormonal control of arthropod reproduction. **Progress in Clinical and Biological Research**, v.342, p.357-364, 1990.

EXTON, J. H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1212, n.1, p.26-42, 1994.

FAGOTTO, F. Yolk degradation in ticks eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.14, n.4, p.217-235, 1990.

FAGOTTO, F. Yolk degradation in ticks eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. **Development Growth and Differentiation**, v.33, p.57-66, 1991.

FIALHO, E.; NAKAMURA, A.; JULIANO, L.; MASUDA, H.; SILVA-NETO, M. A. Cathepsin D-mediated yolk protein degradation is blocked by acid phosphatase inhibitors. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.436, n.2, p.246-253, 2005.

FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v.48, n.8, p.773–782, 2002.

FRIESEN, K.; KAUFMAN, W. R. 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**, v.50, n.6, p.519-529, 2004.

FRIESEN K. J.; KAUFMAN W. R. Salivary gland degeneration and vitellogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: Surpassing a critical weight is the prerequisite and detachment from the host is the trigger. **Journal of Insect Physiology**, v.55, n.10, p.936-942, 2009.

FRINGS, C., S.; DUNN, R., T. A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanilin reaction, **American Journal of Clinical Pathology**, v. 53, n. 1, p. 89-91, 1970.

FURLONG, J.; DERESZ, F.; MATOS, L. L. DE; BALBI, M. V. The effect of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infestation on milk yield and feed intake of Holstein x Zebu crossbreed cows. In: **Anais do Congresso Panamericano de Veterinária**, Campo Grande, p.340, 1996.

GILBERT, L. I.; CHINO, H. Transport of lipids in insects. **Journal of Lipid Research**, v.15, 1974.

GILBY, A. R. Studies on cuticular lipids of arthropods. III. The chemical composition of the wax from *Boophilus microplus*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.67, p.320-324, 1957.

GONZALES, J.C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 103p., 1974.

GONZÁLES, J. C. O carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Can. 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, v.21, n.125, p.23-28, 2002.

GRISI, L.; MASSARD C. L.; MOYA, B. G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A hora Veterinária**, v.21, n.125, p.8-10, 2002.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Ecdysteroids: possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Experientia**, v.41, n.6, p.740-742, 1985.

HARRIS, R. A.; KAUFMAN, W. R. Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Experimental Biology**, v.109, p. 281-290, 1984.

HANAHAN, D. J.; NELSON, D. R. Phospholipids as dynamic participants in biological processes. **Journal of Lipid Research**, v. 25, p.1528-1535, 1984.

HITCHCOCK, L. F. Studies of the non-parasitic stages on the cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). **Australian Journal of Zoology**, v.3, p.295-311, 1955.

HORAK, I. G.; CAMICAS, J. L.; KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental and Applied Acarology**, v.28, n. XX, p. 27-54, 2002.

HORIGANE, M.; OGIHARA, K.; NAKAJIMA, Y.; SHINODA, T.; TAYLOR, D. Cloning and expression of the ecdysteroid receptor during ecdysis and reproduction in females of the soft tick. *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **Insect Molecular Biology**, v.16, n.5, p.601-612, 2007.

HORN, S.C. **Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos**. Boletim de Defesa Sanitária Animal, nº especial, 2 ed., Brasília: Ministério da Agricultura.1983.

HUSSEIN, M. F.; KAMAL, K. A. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Phospholipid classes in eggs, larvae, and hemolymph of *Argas (Persicargas) arboreus* and *Dermacentor andersoni* (Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.14, n.4, p.407-410, 1977.

IWUALA, M. O. E.; UMEZURIKE, G. M.; NWADIOGBU, N. A Quantitative studies of the lipid components of eggs of *Boophilus decorolatus* (Koch) (Ixodoidea : Ixodidae). **Acarologia**, v.21, n.3-4, p.340-345, 1979.

IWUALA, M. O. E.; UMEZURIKE, G. M.; NWADIOGBU, N. Quantitative studies on the proteins, free fatty acids and glycogen contents of eggs of *Amblyomma variegatum* (Fabr) and *Boophilus decorolatus* (Koch) (Ixodoidea : Ixodidae). **Acarologia**, v.22, n.2, p.133-143, 1981.

JAMES, A. M.; OLIVER, J. H. Localization of vitellogenin production in the blacklegged, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Invertebrate Reproduction and Development**, v.35, n.1, p.81-87, 1999.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v.129, n.3-S14, 2004.

KAUFMAN, W. R. Correlation between haemolymph ecdysteroid titre, salivary gland degeneration and ovarian development in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum* Koch. **Journal of Insect Physiology**, v.37, n.2, p.95-99, 1991.

KAUFMAN, W. R.; LOMAS, L. 'Male Factors' in ticks: their role in feeding and egg development. **Invertebrate Reproduction and Development**, v.30, n.1-3, p.191-198, 1996.

KITAOKA, S. Physiological and ecological studies on some ticks IV. Physiological stage and lipid deposit during the bloodsucking process in the tick. **National Institute of Animal Health Quarterly**, v.1, p.85-95, 1961.

KOCAN, K. M. F.; BLOUIN, E. F.; GARCIA-GARCIA, J. C. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne rickettsia. **Parasitology**, v.129, S285-S3000, 2004.

LABRUNA, M. B.; LEITE, R. C.; OLIVEIRA, P. R. Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.92, n.2, p.205-207, 1997.

LEHNINGER, A., L. **Bioquímica**. Ed. Edgar Blücher, São Paulo: Segunda Edição, v.1, 1232 p, 1984.

LIU, X.; MCCARRON, R. C; NORDIN, J. H. A Cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. **The Journal of Biological Chemistry**, v.271, p.33344-33351, 1996.

LOGULLO, C.; VAZ, I. S., SORGINE, M. H. F.; PAIVA-SILVA, G. O.; FARIA, F. S. ZINGALI, R. B.; LIMA, M. F. R.; ABREU, L.; OLIVEIRA, E. F.; ALVES, E. W.; MASUDA, H.; GONZALES, J. C.; MASUDA, A.; OLIVEIRA, P. L. Isolation of an aspartic Proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. **Parasitology**, v.116, p.525-532, 1998.

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

LOMAS, L. O.; KAUFMAN, W. R. An indirect mechanism by which a protein from the male gonad ha stens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, v.21, n.3, p.169-178, 1992.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR. A. R.; RANDALL, R. J. Protein measurements with the phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n.XX, p. 265-270, 1951.

LOUZADA, G. L.; DAEMON, E. Efeito da imersão de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) em água destilada sobre os parâmetros biológicos ligados à oviposição. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.12, n.3, p.115–120, 2003.

MANGOLD, H.K. Aliphatic lipids. In: STAHL, E. (eds) **Thin-layer Chromatography – a laboratory handbook**, 2a Ed. New York: Springer Verlag., p: 363-421, 1969.

MAROUN, N. A. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Lipids in eggs, larvae, and biological fluids of nymphal and adult *Argas (Persicargas)*

persicus and *A. (P.) arboreus* Kaiser, Hoogstraal & Kohls (Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v.9, n.2, p.161-167, 1972.

MAROUN, N. A.; KAMEL, M. Y. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Fatty acid composition of the female, eggs, and larva of *Dermacentor andersoni* (Stiles) (IXODIDAE). **Journal of Medical Entomology**, v.10, n.4, p.400-405, 1973.

MITCHEL III, R. D.; ROSS, E.; OSGOODA, C.; SONENSHINE, D. E.; DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M.; THOMPSON, D. M.; ROE, R. M. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, n.4, p.375-388, 2007.

MONROE, R. E. Effect of dietary cholesterol on house fly reproduction. **Annals of Entomological Society of America**, v. 53, p. 821-824, 1960.

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

MURRELL, A.; BAKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.

NIJHOUT, H. F. **Insect hormones**. Princeton University Press, New Jersey, 269 p, 1994.

NEESE, P. A.; SONENSHINE, D. E.; KALLAPUR, V. L.; APPERSON, C. S.; ROE, R. M. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari: Ixodidae) and *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). **Journal of Insect Physiology**, v.46, n.4, p.477-490, 2000.

OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. In: **Physiology of Ticks**, Ed. Pergamon Press: New York, v.1, p.277-350, 1982.

OGIHARA, K.; HORIGANE, M.; NAKAJIMA, Y.; MORIBAYASHI, A.; TAYLOR, D. Ecdysteroid hormone titer and its relationship to vitellogenesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **General and Comparative Endocrinology**, v.150, n.3, p.371-380, 2007.

OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; DENARDI, S. E.; NUNES, E. T.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Morphological characterization of the ovary and oocytes vitellogenesis of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v.110, n.2, p.146-156, 2005.

PINHEIRO, J.; GOMES, E. M. A Method for Glycogen Determination in Molluscs. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v.35, p.569-576, 1994.

PRATA, M. C. A. **Biologia do carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) sob tratamentos térmicos diferenciados.** Tese de Doutorado- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Brasil. 223p., 2002.

RAIA, V. A. **Avaliação Quantitativa e Qualitativa das Proteínas dos Ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Acari: Ixodidae) Durante a Oviposição e Embriogênese.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Brasil. 44p., 2007.

RAMAMURTY, P. S. Origin and distribution of glycogen during vitellogenesis of the scorpion *Xy Panorpa communis*. **Journal of Insect Physiology**, v.14, n.9, p.1325-1330, 1968.

RICARDO, A. J.; OLIVEIRA, P. R.; BECHARA, G. H.; CAMARGO MATHIAS, M. I. Ultrastructural detection of proteins, lipids and carbohydrates in oocytes of *Amblyomma triste* (Koch, 1844) (Acari: Ixodidae) during the vitellogenesis process. **Tissue and Cell**, v.39, n.3, p.203–215, 2007.

ROE, R. M.; DONOHUE, K. V.; KHALIL, S. M. S.; SONENSHINE, D. E. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. **Frontiers in Bioscience: a journal and virtual library**, v.13, p.7250-7268, 2008.

ROSELL, R.; CONSS, L. B. Quantification of vitellogenin in the hemolymph and localization of vitellogenin in selected organs of adult female *Dermacentor variabilis*. **Advences in Invertebrate Reproduction**, v.5, p.559-564, 1990.

ROSELL, R.; COONS, L.B. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal Medical Entomology**, v.28, p.41-44, 1991a.

ROSELL, R.; COONS, L. B. Purification and partial characterization of vitellin from the eggs of the hard tick, *Dermacentor variabilis*. **Insect Biochemistry**. v.21, n.8, p.871 – 885, 1991b.

ROSELL, R.; COONS, L. B. The role of fat body, midgut and ovary in vitellogenin production and vitellogenesis in the female tick, *Dermacentor variabilis*. **International Journal of Parasitology**, v.22, n.3, p.341-349, 1992.

RUIZ, J. I.; OCHOA, B. Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **The Journal of Lipid Research**, v.38, p.1482-1489, 1997.

SAITO, K. C.; BECHARA, G. H.; NUNES, E. T.; OLIVEIRA, P. R.; DENARDI, S. E.; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Morphological, histological, and ultrastructural studies of the ovary of the cattle-tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v.129, n.3-4, p.299-311, 2005.

SANCHES G. S.; BECHARA G. H.; CAMARGO-MATHIAS M. I. Ovary and oocyte maturation of the tick *Amblyomma brasiliense* (Aragão, 1908) (Acari: Ixodidae). **Micron**, v.41, n.1, p.84-89, 2010.

SANKHON, N.; LOCKEY, T.; ROSELL, R. C.; ROTHSCHILD, M.; COONS, L. 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**, v.45, n.8, p.755-761, 1999.

SAPPINGTON, T. W.; RAIKHEL, A. S. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, n.5-6, p.277-300, 1998.

SEIXAS, A.; DOS SANTOS, P. C.; VELLOSO, F. F.; VAZ, I.; MASUDA, A.; HORN, F.; TERMIGNONI, C. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. **Parasitology**, v.126, p.155-163, 2003.

SEIXAS, A.; FRIESEN, K. J.; KAUFMAN, W. R. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. **Journal of Insect Physiology**, v.54, n.7, p.1175-1183, 2008.

SERRANO-PINTO, V.; LANDAIS, I.; OGLIASTRO, M. H.; GUTIERREZ-AYALA, M.; MEJIA-RUIZ, H.; VILLARREAL-COLMENARES, H.; GARCIA-GASCA, A.; VAZQUEZ-BOUCARD, C. Vitellogenin mRNA expression in *Cherax quadricarinatus* during secondary vitellogenesis at first maturation females. **Molecular Reproduction and Development**, v.69, n.1, p.17-21, 2004.

SOBBHY, H.; AGGOUR, M. G.; SONENSHINE, D. E.; BURRIDGR, M. J. Cholesterol esters on the body surfaces of the camel tick, *Hyalomma dromedarii* (Koch, 1844) and the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1860). **Experimental e Applied Acarology**, v.18, p.265-280, 1994.

SONENSHINE, D. E. The Female Reproductive System. In: **Biology of Ticks**. Ed. Oxford University Press: New York, v.1, p.280-304, 1991.

SONENSHINE, E. E.; TIGNER, J. A. Oviposition and hatching in two species of ticks in relation to moisture deficit. **Annals of the Entomological Society of America**, v.62, p.628-640, 1969.

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

TILL, W. M. A contribution to the anatomy and histology of the brown ear tick *Rhipicephalus appendiculatus* (Newman). **Memoirs of the Entomological Society of South Africa** , v.6, p.1-124, 1961.

THOMPSON, D. M.; KHALIL, S. M. S.; JEFFERS, L. A.; SONENSHINE, D. E.; MITCHELL, R. D.; OSGOOD, C. J.; ROE, R. M. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 4, p. 363-374, 2007.

THOMPSON, D.M., KHALIL, S.M.S., JEFFERS, L.A., ANANTHAPADMANABAN, U., SONENSHINE, D., MITCHELL, R.D., OSGOOD, C.J., APPERSON, C.S., ROE, M.R. 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**, v.51, n.10, p.1105-1116, 2005.

URICH, K. **Comparative Animal Biochemistry**. Springer-Verlag, New York. 787 p, 1990.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. Lipídeos. In: **Fundamentos de Bioqímica**. Ed. Artmed, Porto Alegre, p. 219-238, 2000.

VOGEL, W.G.; ZIEVE, L. & CARLETON, R.O. Measurement of serum lecithin, lysolecithin, and sphingomyelin by a simplified chromatographic technique. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.59, p.335-344, 1962.

WYATT, G. R. The fat body as a protein factory. In: LOCKE, M., SMITH, D.S. (Eds.), *Insect Biology in the Future*. **Academic Press**, p.201–225, 1980.