

UFRRJ

INSTITUTO DE VETERINÁRIA

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

DISSERTAÇÃO

**Avaliação Quantitativa e Qualitativa das Proteínas
dos Ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e
Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus (Acari:
Ixodidae) Durante a Oviposição e Embriogênese.**

Vanessa de Almeida Raia

2007



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

**AVALIAÇÃO QUANTITATIVA E QUALITATIVA DAS PROTEÍNAS DOS OVOS
DE RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS E RHIPICEPHALUS (RHIPICEPHALUS)
SANGUINEUS (ACARI: IXODIDAE) DURANTE A OVIPOSIÇÃO E EMBRIOGÊNSE.**

VANESSA DE ALMEIDA RAIÁ

Sob a Orientação da Professora
Kátia Maria Famadas

e Co-orientação do Dr
Walter Flausino

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

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2007

595.42

R149a

T

Raia, Vanessa de Almeida, 1980-

Avaliação quantitativa e qualitativa das proteínas dos ovos de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e *Rhipicephalus* (*Rhipicephalus*) *sanguineus* (Acari: Ixodidae) durante a oviposição e embriogênese / Vanessa de Almeida Raia. - 2007.

55 f. : il.

Orientador: Kátia Maria Famadas.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 33-38.

1. Carrapato - Teses. 2. *Boophilus microplus* - Avaliação - Teses. 3. *Boophilus microplus* - Ovos - Avaliação - Teses. 4. Ovos - Incubação - Teses. 5. Eletroforese - Teses. I. Famadas, Kátia Maria, 1961. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

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

VANESSA DE ALMEIDA RAIA

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

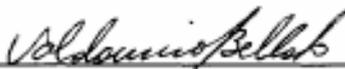
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 26 / 03 /2007



Kátia Maria Famadas. (Ph.D) UFRRJ



Adriana Rayol Pedrenho. (Dr.) UFRRJ



Valdomiro Bellato. (Dr.) UDESC

Dedico às pessoas que estão ao meu lado não importa o rumo que eu siga, as quais amo muito e faço tudo por elas: Minha mãe, Kátia Regina; minha irmã, Viviane; meu amor, Hercules e minha avó Mainha (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

À DEUS, que tornou este trabalho possível quase como um milagre, colocando no lugar e no tempo certo pessoas dispostas a solucionar os problemas encontrados no caminho;

À minha MÃE KÁTIA e IRMÃ VIVIANE, que me amam e torcem por mim, também as amo muito e agradeço todos os dias por vocês estarem comigo;

Ao HERCULES, que desde que nos encontramos está ao meu lado minimizando as dificuldades e dando força pra seguirmos a diante juntos;

À minha SOGRA CIDA e à minha CUNHADA LUCIANA que me aceitaram e me acolheram de braços abertos, muitas vezes cuidando de mim;

À minha orientadora, KÁTIA MARIA FAMADAS, que me abriu as portas na pesquisa, e me orientou desde o segundo período;

Ao WALTER FLAUSINO, pela sua co-orientação, paciência (mesmo quando tenta fingir que é mau) e enorme coração;

À PROF. ADRIANA RAYOL PEDRENHO por ter sido a luz no fim do túnel aos “45 do segundo tempo”;

Ao PROF. JAIRO PINHEIRO por ter estado sempre à disposição para retirar dúvidas e solucionar problemas;

Aos amigos ELIANE PIRANDA e PAULO HENRIQUE CANÇADO (LILI e PAULINHO) por terem me “adotado” na Estação, e com a paciência de quem ensina a um aluno de iniciação me deixaram recorrer a eles em para tudo que foi preciso.

Ao PROF. ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA pelo laboratório cedido prontamente, evitando a perda do experimento;

Ao PROF. CARLOS WILSON GOMES LOPES por ter cedido parte do Laboratório de Coccídios e Coccidioses para realização de parte do experimento;

Ao PROF. CARLOS LUIZ MASSARD pela concessão do freezer para congelamento das amostras;

Às estagiárias e bolsistas do Laboratório de Ixodologia e Morfofisiologia de Ácaros, CARLA UZEDO, TATIANE KAWAMURA e MICHELE BARBOSA;

Aos bolsistas e estagiários do Laboratório de Doença Parasitárias (NATHALIE CUNHA, RENATA MADUREIRA, JANIA RESENDE, FÁBIO JORGE MOREIRA, DANIEL GUEDES, CHARLES PASSOS RANGEL, RAFAELLA CÂMARA) pelo apoio e compreensão em momentos críticos;

Aos estagiários e bolsistas do Laboratório de Coccídios e Coccidioses (GISELE MEIRELES, JANAÍNA DA SOLEDAD, FABIANA VALADÃO e PAULO ROBERTO) pela amizade e companhia às vezes até depois do horário e nos fins de semana;

Aos Colegas do Curso de Pós Graduação em Ciências Veterinárias e em Microbiologia Veterinária (ANA PAULA MORAES, CAMILA OLIVEIRA, RENATA RIBEIRO, RAQUEL MOREIRA, RODNEY KOSLOVSKY e VANESSA DORO), obrigada pelas risadas na escada da Parasito. Obrigada a ISABELE ÂNGELO e MARCOS FRANQUE pelo grupo de estudo antes da seleção, à ARISA MANDARINO, FABÍOLA DO NASCIMENTO, VERÔNICA CARDOSO e GEISI MARINE;

AOS AMIGOS conquistados durante a graduação que acompanharam todo este processo torcendo por mim;

As “DIVAS” que moram ou moraram na mesma casa que eu (RAQUEL LISBOA, RAQUEL MOREIRA, RAQUEL SAUCIER, TAMARA e SOFIA FEJOLA) e seus respectivos namorados/maridos pela compreensão dos dias em que foi necessário maior concentração;

Ao amigo LUIS EDUARDO TAVARES (DUDU) pela ajuda com o programa estatístico;

Ao amigo MARCOS FÁBIO DE LIMA, que iniciou este trabalho e deixou seu caderno particular de protocolos como herança;

A ELZA MIKA SUZUKI, por ter ensinado detalhadamente e com paciência as técnicas

utilizadas;

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;

À professora MARIA PAZ ABRAILA LOPES DE CRESPI e ao funcionário PEDRO TIMOTIO, do Instituto de Zootecnia - Setor de Cunicultura, pela cessão de coelhos;

Aos CIDADÕES BRASILEIROS, que pagam impostos, permitindo que parte deste recurso fosse utilizada 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.

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 Iguaçano 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.

RESUMO

RAIA, Vanessa de Almeida. **Avaliação Quantitativa e Qualitativa das Proteínas dos Ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Acari: Ixodidae) Durante a Oviposição e Embriogênese**. 2007. 44p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Objetivando preencher algumas lacunas sobre mecanismos intrínsecos da biologia da oviposição e embriogênese de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus*, foi avaliada a variabilidade protéica dos ovos por dia de postura e incubação. Para tal, fêmeas ingurgitadas foram colocadas para efetuar postura em estufa biológica sob condições controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase). Após início da postura, amostras diárias de 50 mg de ovos foram coletadas, acondicionadas e preservadas a -20°C , caracterizando o período de postura. A partir de um “pool” de ovos recém colocados, foram obtidas alíquotas de 50 mg que acondicionadas em tubos de “eppendorf” perfurados foram mantidas em estufa biológica nas mesmas condições controladas descritas acima. Desde a separação das alíquotas até o surgimento da primeira larva, diariamente uma amostra foi transferida para freezer à -20°C , obtendo-se assim ovos seqüencialmente em diferentes momentos da embriogênese. Para dosagem das proteínas utilizou-se o método de Bradford, e os perfis eletroforéticos foram traçados através de eletroforese em gel de poliacrilamida. Os dados das concentrações protéicas foram correlacionados com os dias de postura e de embriogênese. Para isso, utilizou-se o coeficiente de correlação de Pearson (r), com os dados da concentração transformados logaritmicamente [$\log (X+1)$]. Os dados foram transformados após o descarte da normalidade (teste de Shapiro-Wilk). De modo geral as concentrações das proteínas nos ovos de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* durante a postura mantiveram-se constantes até os últimos dias quando se observou aumento abrupto das concentrações. Nas duas espécies, foram observadas variações nas concentrações das proteínas durante o período embrionário. Ainda em ambas espécies, na análise das bandas protéicas, o número de bandas detectáveis diminuiu ao longo do período de postura e embriogênese, sendo observado nos últimos dias surgimento de uma nova banda. Pode-se depreender que a variação na concentração das proteínas dos ovos de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* está correlacionada com os dias de postura e incubação, através do aumento na concentração de proteínas à medida que o final da postura e eclosão da larva se aproximam. Devido às diferenças entre os perfis protéicos de *R. (B.) microplus* e *R.(R.) sanguineus* ao longo dos dias de postura, conclui-se que as proteínas disponibilizadas aos ovos durante o período de postura são diferentes entre estas duas espécies e que os zimogramas podem ser utilizados como marcadores fenéticos. Ainda pode-se concluir que, ao longo da embriogênese, devido ao desaparecimento e surgimento de bandas protéicas, as proteínas disponíveis para o embrião de *R. (B.) microplus* e *R.(R.) sanguineus* são biotransformadas de modo que há um perfil de degradação particular para cada espécie.

Palavras-chave: Carrapato, Postura, Eletroforese.

ABSTRACT

RAIA, Vanessa de Almeida. **Quantitative and Qualitative Avaluation of Eggs Proteins of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Acari: Ixodidae) During Oviposition and Embryogenese.** 2007. 44p. Dissertation (Master Sciences Veterinary, Animal Parasitology) Veterinary Institute, Department of Animal Parasitology, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica , RJ, 2007.

To fill some gaps on intrinsic mechanisms of the biology of the oviposition and embryogenesis of *R. (B.) microplus* and *R. (R.) sanguineus*, was evaluated the variability protein in eggs per day of posture and incubation. For this, engorged female laid eggs in controlled environment chamber ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, and darkness). As soon as the female initiated the oviposition, egg samples of 50 mg was collected daily, conditioned in eppendorf tube and preserved in freezer - 20°C , characterizing the period of posture. Samples of 50 mg was removed from a fresh egg mixture and put in perforated eppendorf tube, kept in environment chamber ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, and darkness). Daily, one tube was transferred to freezer -20°C until the first larva hatch. Thus a sequence of different stage of embryogenesis was obtained. The Bradford method was used to measure the protein concentration and subsequently, the electrophoresis profiles was performed in SDS-PAGE. The protein concentrations was correlated with the oviposition and embryogenesis days using the Pearson (r) correlation and for this, the data was transformed in logarithmic value [$\log(X+1)$] after the normality to be discarded (test of Shapiro-Wilk). During oviposition the protein concentrations of the eggs of *R. (B.) microplus* and *R. (R.) sanguineus* remained constant until the last days when abrupt increase was observed. In both of species, variation in the concentration of protein was observed during all embryonic period. The number of detectable bands of proteins decreasing during oviposition and embryogenesis days, but in the last days a new band was found. It can inferred that the proteins variation in the eggs of *R. (B.) microplus* and *R. (R.) sanguineus* is correlated with the days oviposition and incubation. The ticks *R. (B.) microplus* and *R. (R.) sanguineus* have a different oviposition profile proteins model that can be use as phenetic feature. As well, a different way of degradation of protein for each species was characterized.

Key-words: Tick, Posture, Electrophoresis.

LISTA DE TABELAS

	Páginas
Tabela 1. Número e peso médio das fêmeas utilizadas por espécie de Ixodida para obtenção das amostras de ovos.....	14
Tabela 2. Peso total da massa de ovos (mg) e número de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR).....	16
Tabela 3. Peso total da massa de ovos (mg) e número de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR, escotofase).....	18
Tabela 4. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> em relação aos dias de postura sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR, escotofase).....	19
Tabela 5. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> em relação aos dias de postura sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR, escotofase).....	21
Tabela 6. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> por dia de incubação sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR, escotofase).....	23
Tabela 7. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> por dia de incubação sob condições controladas de laboratório (27±1°C, 80±5% UR, escotofase)....	25

LISTA DE FIGURAS

	Páginas
Figura 1. Ritmo de postura diária de fêmeas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	18
Figura 2. Concentrações protéicas em micrograma de proteína por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase); A - concentração de proteínas em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos, B - concentração de proteínas log transformada.....	20
Figura 3. Concentrações protéicas em micrograma de proteína por miligrama de ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> e <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> por dia de incubação sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase); A - concentração de proteínas em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos, B - concentração de proteínas log transformada.....	24
Figura 4. Zimogramas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> ao longo dos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	28
Figura 5. Zimogramas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> ao longo dos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).....	29
Figura 6. Zimogramas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> durante os dias de incubação.....	31
Figura 7. Zimogramas dos ovos de <i>Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus</i> durante os dias de incubação.....	31

SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Anatomia do Sistema Reprodutor Feminino.....	3
2.2 Fisiologia da Oviposição e Embriogênese.....	3
2.2.1 Aspectos Gerais da Fisiologia da Oviposição.....	3
2.2.2 Formação dos grânulos da gema.....	4
2.2.3 Ovulação e maturação final do oócito no trato genital.....	5
2.2.4 Embriogênese.....	5
2.3 Biologia da Oviposição e Embriogênese.....	7
2.4 Proteínas dos Ovos e Hemolinfa de Carrapatos.....	9
2.4.1 Proteínas dos ovos.....	9
2.4.2 Proteínas da hemolinfa.....	11
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Local de Execução.....	13
3.2 Origem e Manutenção dos Ixodídeos no Laboratório.....	13
3.2.1 Origem.....	13
3.2.2 Manutenção das fêmeas ingurgitadas.....	13
3.3 Procedimento para Obtenção dos Ovos de Ixodídeos.....	13
3.3.1 Por dia de postura.....	13
3.3.2 Por dia de incubação.....	14
3.4 Preparo das Amostras para Dosagem das Proteínas Totais e Eletroforese	14
3.5 Coloração, Descoloração, Análise e Montagem do Gel.....	15
3.6 Análise dos Dados.....	15
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
4.1 Parâmetros Biológicos.....	16
4.2 Dosagem das Proteínas Totais na Oviposição.....	19
4.3 Dosagem das Proteínas Totais na Embriogênese.....	22
4.4 Análise dos Géis de Acordo com o Dia de Postura.....	26
4.5 Análise dos Géis Durante a Embriogênese.....	30
5 CONCLUSÕES.....	32
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXOS.....	39
A – Fórmula do tampão fosfato pH 7,4.....	40
B – Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado.....	41
C – Fórmula do tampão de amostra cinco vezes concentrado.....	42
D – Fórmula do “Staking” gel 5%.....	43
E – Fórmula do “Resolving” gel 10%.....	44

1 INTRODUÇÃO

Carrapato é o segundo artrópode mais importante quando o enfoque é potencial de transmissão de agentes patogênicos. Além disso, em se tratando de carrapatos de animais domésticos, dentro de sistemas de produção com cunho comercial, sua presença tem gerado prejuízos de grande magnitude, seja de maneira direta, gerando queda de produtividade, morbidade ou mesmo mortalidade, ou indireta, devido aos gastos com produtos acaricidas ou na terapia de doenças causadas por agentes transmitidos por eles. A exemplo disto foi estimado que o carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887), pode causar prejuízos anuais acima de dois bilhões de dólares.

Grande parte das pesquisas produzidas sobre carrapatos converge para um ponto comum, seu controle, já que até então os métodos utilizados nem sempre têm produzido resultados esperados quando se pensa na relação custo/benefício.

Carrapatos são ovíparos, e em se tratando dos ixodídeos, evoluíram segundo um processo de seleção-r, onde utilizam como estratégia para perpetuação da espécie, a produção de um grande número de zigotos, levando a oviposição de milhares de ovos que irão resultar na eclosão de inúmeras larvas. 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. Como parasita obrigatório e hematófago, a fêmea Ixodida necessita do alimento como fonte de nutrientes para desenvolvimento dos oócitos. Visto que a vitelina que nutre o embrião em desenvolvimento e, em seguida a larva recém eclodida dos ovos, é resultante da digestão da hemoglobina do sangue do hospedeiro.

Fêmeas de ixodídeos depois de acasaladas, ingerem grande quantidade de sangue de seus hospedeiros, cuja maior porção de proteína é representada pela hemoglobina. Na luz do intestino médio, a hemoglobina é lisada e absorvida pelas células intestinais onde ocorre uma degradação lenta das proteínas do sangue do hospedeiro, que são convertidas em proteínas da hemolinfa.

As proteínas da hemolinfa vão para o corpo gorduroso, que é o órgão responsável pela síntese da vitelogenina, que liberada na hemolinfa é seletivamente absorvida pelo oócito em desenvolvimento via micropinocitose. Nos oócitos, a vitelogenina é estocada como vitelina nos grânulos da gema, que é a fonte nutricional para o desenvolvimento do embrião.

A vitelogenina é um complexo protéico formado por oito subunidades de proteína e é considerada uma reserva de heme (parte da hemoglobina que contém ferro). No entanto, a distribuição da vitelogenina pela hemolinfa e sua internalização nos oócitos maduros não é feita de maneira simultânea, pois a síntese do material necessário para formação dos grânulos da gema não é realizada em quantidade suficiente para suprir e chegar a todos os oócitos ao mesmo tempo. Esta pode ser a explicação para o fato do desenvolvimento e maturação dos oócitos no ovário não serem sincronizados, sendo observados num mesmo momento, oócitos em diferentes estágios de desenvolvimento.

Estudos sobre a biologia da oviposição e fatores abióticos que influenciam a postura e eclodibilidade larval são bem desenvolvidos, contribuindo para utilização de mecanismos estratégicos de controle. Contudo, ainda existem lacunas no conhecimento dos fatores fisiológicos que podem explicar a biologia destas fases do ciclo dos carrapatos.

Uma das questões fisiológicas que necessita ser elucidada diz respeito ao fator intrínseco responsável pela menor taxa de eclodibilidade larval nos ovos dos primeiros e dos últimos dias de postura. Embora escassos, estudos apontam para a baixa disponibilidade de proteínas e outros nutrientes fornecidos pela fêmea, bem como espermatozóides insuficientes para fertilização. Merece destaque que esses estudos não puderam explicar as menores taxas

de eclosão nas posturas dos primeiros dias, quando a fêmea está repleta de nutrientes e de espermatozoides em seu receptáculo.

Estudos isolados têm focado sobre a ação das diferentes enzimas que degradam a vitelina durante a embriogênese, como por exemplo, a tirosina fosfatase, cujo objetivo principal reside na busca de mecanismos que possam ser utilizados como forma de controle alternativo e, portanto, não analisando a questão fisiológica dentro do fenômeno biológico. Nestes, foram traçados perfis individuais de degradação da vitelina para cada enzima, não se obtendo, portanto, o perfil das alterações que ocorrem nas proteínas totais ao longo da embriogênese.

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.

Assim, dando seqüência aos estudos de biologia desenvolvidos pelo grupo de pesquisa Acarologia Veterinária e objetivando preencher algumas lacunas sobre mecanismos intrínsecos da biologia da oviposição e embriogênese, foi proposto avaliar a variabilidade protéica durante o processo de oviposição e embriogênese, através da dosagem e dos perfis eletroforéticos das proteínas contidas nos ovos de *R. (B.) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* (Latreille, 1786).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Anatomia do Sistema Reprodutor Feminino

De acordo com Sonenshine (1991), o sistema reprodutor feminino dos ixodídeos consiste de um ovário simples, ovidutos pareados, útero, vagina subdividida em região cervical e vestibular, e um grande receptáculo seminal.

O ovário consiste de uma alça em forma de “U”, ou “U” invertido, dependendo da espécie examinada e do estágio de desenvolvimento. O ovário é escavado, cujo lúmen é revestido por uma fina parede de células epiteliais, oogônias e oócitos em vários estágios de desenvolvimento. Correndo ao longo da superfície dorsal está o sulco longitudinal onde se concentram as oogônias e oócitos primários. No lado oposto ao sulco longitudinal, os oócitos que estão em estágio de desenvolvimento mais avançado se conectam ao ovário através de um fino funículo e sua projeção na parede em direção a hemocele confere ao ovário o aspecto de cachos de uva (OBENCHAIN; GALUN, 1982; SONENSHINE, 1991).

O útero é relativamente curto e não evidente em Metastriata. Mais à frente, um curto, e curvado tubo conector descende do útero para a vagina cervical, que é um tubo muscular espesso e fortificado. Acima da vagina cervical está a vagina vestibular, alinhada com uma densa camada de cutícula, a qual conecta o sistema reprodutivo com o poro genital externo. A vagina vestibular alarga-se durante a oviposição e prolapsa através do poro, facilitando a deposição de ovos. Assim, a vagina vestibular serve como um ovipositor. Na junção das regiões cervical e vestibular da vagina encontra-se a glândula acessória tri-lobada. Esta glândula se expande durante a alimentação das fêmeas, como resultado de crescimento e proliferação celular, secretando uma substância antioxidante para os ovos durante sua passagem pela vagina. O órgão de Gené está localizado na cavidade dorsal do corpo e localiza-se completamente separado dos órgãos do trato reprodutivo da fêmea. Compreende de duas a quatro estruturas saculares, alinhadas com a cutícula, estes sáculos evertem durante a oviposição, formando projeções em forma de dedos que revestem cada ovo com um lubrificante ou graxa semi-sólido, encerando assim os ovos (SONENSHINE, 1991).

2.2 Fisiologia da Oviposição e Embriogênese

2.2.1 Aspectos Gerais da Fisiologia da Oviposição

Para garantir o sucesso de sua reprodução, ixodídeos necessitam ingerir uma enorme quantidade de sangue durante o repasto sanguíneo. 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).

De acordo com Obenchain e Galun (1982), para acomodar a grande quantidade de sangue ingerida, ocorre à expansão da cutícula, com considerável aumento da mesma durante as últimas fases do ingurgitamento.

Para maximizar a quantidade de sangue ingerido, fêmeas de carrapatos ixodídeos concentram o sangue ingerido através da eliminação de excesso de água e íons através da secreção das glândulas salivares. O sangue ingerido é digerido intracelularmente, sendo a maioria das proteínas do sangue ingerida convertida em vitelogenina através de células intestinais e/ou corpo gorduroso celular (OBENCHAIN; GALUN, 1982), ou ainda, somente pelo corpo gorduroso (SONENSHINE, 1991).

Vitelogeninas são glicolipohemoproteínas, as quais depois de sintetizadas, são liberadas na hemolinfa e transportadas para o ovário onde são seletivamente capturadas e

estocadas pelo oócito (OBENCHAIN; GALUN, 1982). Estas proteínas são a origem de diversos metabólitos durante a embriogênese e podem ser detectadas em larvas depois de até quatro meses de eclodidas (CHINZEI; YANO, 1985).

Depois da cópula, ixodídeos estocam o endosperma, contendo espermatozoides dos machos, em um grande útero ou em uma expansão na porção cervical da vagina (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

O período de grande crescimento citoplasmático no oócito pré-vitelogênico, começa com o início da hematofagia na fase adulta e termina com o aparecimento do primeiro grânulo da gema no citoplasma, geralmente poucos dias após o início da alimentação. A fase vitelogênica do oócito começa com o aparecimento dos primeiros grânulos da gema e termina com a ovulação. O ingurgitamento e descanso (período de pré-postura) são pré-requisitos para completar a vitelogênese (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

2.2.2 Formação dos grânulos da gema

A gema parece ser formada tanto de recursos intracelulares quanto extracelulares (AESCHLIMANN; HECKER, 1967; DIEHL, 1969, 1970; BRINTON; OLIVER, 1971; JENNI, 1971). O material da gema de origem extracelular é internalizado em vesículas ou em tubos micropinocitóticos (BRINTON; OLIVER, 1971). Essas vesículas subsequentemente se fusionam com outras formando os corpos multivesiculares que gradualmente perdem suas membranas internas e, através de repetidas fusões, são transformados em grandes e homogêneos grânulos da gema. Usando técnicas histoquímicas, Diehl (1970) demonstrou que os grânulos da gema de *Ornithodoros moubata* são compostos de hemo-glico-lipoproteínas.

A lâmina basal e o desenvolvimento precoce da casca do ovo formam barreiras mecânicas que separam o oócito da hemolinfa. Ainda assim, a lâmina basal e a casca do ovo permanecem permeáveis, mesmo para moléculas grandes como hemoglobina, proteínas da gema, e possivelmente precursores da casca, os quais podem ser retirados da hemolinfa através de micropinocitose (LEES; BEAMENT, 1948).

Os oócitos do ovário do carrapato não têm desenvolvimento sincrônico durante a vitelogênese, oócitos em estágios muito diferentes de desenvolvimento podem ser encontrados ao mesmo tempo. Em Ixodida, os oócitos menos avançados são encontrados geralmente no sulco longitudinal, os mais avançados estão mais distantes da fenda. Este mecanismo garante que o período de vitelogênese, ovulação e oviposição no carrapato sejam prolongados por dias ou semanas. Este prolongamento tem algumas vantagens definidas, pois o recurso extracelular do material da gema presumivelmente não pode ser sintetizado e exportado a precursores da gema a uma taxa no qual permite a vitelogênese nos locais de todos os oócitos ao mesmo tempo. Além disso, sob o ponto de vista do espaço restrito dentro do ducto genital e do tempo gasto necessário para a manipulação individual dos ovos durante a sua impermeabilização através do órgão de Gené, esta prolongação mínima da vitelogênese e ovulação deve ser uma vantagem seletiva para a eficiência reprodutiva de um grande grupo de ovos e, portanto, para o aumento da probabilidade da sobrevivência da população de carrapatos (SONENSHINE, 1991).

Vários autores estudaram as proteínas dos grânulos da gema e a separação de diversas proteínas através de técnicas de eletroforese e filtração em gel (BREMNER, 1959; RICK, 1959; DIEHL, 1970; TATCHELL, 1971; BOCTOR; KAMEL, 1976; ARAMAN, 1979). Todos estes autores apontam para a presença de vitelina na gema (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

Proteínas da gema contendo ferro, relatadas sob forma de heme-derivadas oriundas da digestão da hemoglobina, foram primeiro detectadas por Wigglesworth (1943) em ovos de *O. moubata* e *Ixodes ricinus*. Bremner (1959) constatou que 5% do ferro ingerido passa para os

ovos de *B. microplus* (= *R. (B.) microplus*) enquanto Kitaoka (1961) obteve estimativas da ordem de 10%. Araman (1979) relatou que aproximadamente 6% do ferro ingerido é transferido para os ovos de *R. sanguineus* (= *R. (R.) sanguineus*).

Estudos histoquímicos com *O. moubata* sugeriram que as proteínas da gema são hemo-glico-lipoproteínas (DIEHL, 1970) e igual composto foi também relatado de ovos de *Dermacentor andersoni* (BOCTOR; KAMEL, 1976), *Hyalomma dromedarii* (BASSAL; HEFNAWY, 1972), e *R. sanguineus* (ARAMAN, 1979).

Recursos exógenos de vitelina são os mais documentados no desenvolvimento da gema. Proteínas da hemolinfa (TATCHELL, 1971) e grandes proteínas como as hemoglobinas (LEES; BEAMENT, 1948) são facilmente incorporadas ao desenvolvimento dos oócitos, demonstrando a capacidade de levar proteínas exógenas através da lâmina basal permeável e da casca do ovo em desenvolvimento.

Hemo-glico-lipoproteínas podem ser demonstradas na hemolinfa de fêmeas durante a digestão onde estas são eletroforéticamente e imunologicamente similares as da vitelina dos ovos (DIEHL, 1970; ARAMAN, 1979).

2.2.3 Ovulação e maturação final 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 uma formação de cordão de pérolas.

Espermas maduros acumulam-se preferencialmente no terço inferior dos ovidutos, e alguns autores acreditam que como o oócito ovulado desce até a região mais baixa do oviduto a região acrossômica de um dos espermatozóides viáveis dissolve a porção proteinácea da casca dos ovos em formação e libera seu núcleo dentro do oócito (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

Em *O. moubata*, o volume do oócito aumenta consideravelmente (cerca de 89%) após a passagem pela ampola devido à absorção de água (DIEHL, 1970).

Uma indicação externa da iminência da oviposição em fêmeas ingurgitadas de ixodídeos é a mudança na forma do idiossoma (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

Além das proteínas da gema, existem outras estruturas nos ovos que dependem da presença de proteínas para sua formação, como por exemplo, a casca, que em *R. sanguineus* é composta principalmente de outras proteínas e talvez algumas pequenas áreas espalhadas de quitina (OBENCHAIN; GALUN, 1982).

2.2.4 Embriogênese

O óvulo não fertilizado é uma grande célula com núcleo central, citoplasma tomado por inúmeros grânulos da gema dispersados dentro de um retículo protoplasmático difuso. O óvulo é cercado por uma membrana de vitelina e a casca dos ovos é coberta por uma camada de cera (SONENSHINE, 1991).

Segundo Balashov (1968), a fertilização dos carrapatos ocorre na parte ampular do oviduto das teleóginas, onde os espermióforos se acumulam. Após o oócito primário entrar na ampola do oviduto, uma porção da espessa membrana externa do oócito é dissolvida pelo espermióforo 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 após a postura dos ovos.

A clivagem é superficial, como em outros acarinos. A divisão nuclear resulta da migração do núcleo para o citoplasma marginal. Nesta fase, ocorre o aumento do número de células, sem que haja aumento do volume total do ovo e as células originadas das divisões celulares ocorridas nos ovos são denominados blastômeros, esses blastômeros cercam uma blastocele central, preenchida com grânulos da gema. A união dos blastômeros com a blastocele central forma a chamada periblástula, o que caracteriza o estágio de blástula (SONENSHINE, 1991). Este estágio ocorre após 24 horas de embriogênese, quando sete a oito ciclos mitóticos foram completados. Durante o oitavo ou nono ciclo mitótico, cada blastômero diferencia-se em macrômero interno, que contém os glóbulos da gema e é considerado o endoderma primário; e um micrômero externo, uma camada fina de micrômeros livres da gema. Alguns macrômeros estão implicados na formação do epitélio do intestino médio, que surge por volta do sexto dia (FAGOTTO et al., 1988).

A agregação das células blastodérmicas forma o lado ventral do embrião, este conjunto de células forma o disco germinal, em forma de funil, o qual migra unidirecionalmente estabelecendo o eixo de simetria bilateral. O disco germinativo forma a lâmina endomesodérmica, enquanto o blastoderma periférico forma o ectoderma do embrião. A formação dessas lâminas caracteriza a fase de gastrulação do embrião (SONENSHINE, 1991). O disco germinal migra para trás estabelecendo o eixo definitivo de simetria bilateral (pólo cefálico e pólo caudal), determinando, portanto, a simetria dorso-ventral e céfalo-caudal do embrião. A formação da banda germinativa e a subsequente metamerização foram observadas aos quatro dias após a postura (SHIRAISHI et al., 1990).

A metamerização ocorre depois da formação da gástrula. Esta fase é marcada pela separação da banda germinativa em duas metades para formação do sulco ventral. Na parte anterior ao sulco os metâmeros formam o acron, pedipalpos, quelíceras, e as pernas começam a serem formadas, enquanto na parte posterior, a banda germinal se divide em cinco segmentos opistossomais e um telson terminal (SONENSHINE, 1991).

A contração longitudinal da banda germinativa constitui mais uma etapa no desenvolvimento dos ovos de ixodídeos, denominada blastocinese. Aeschlimann (1958), afirma ser este o fenômeno que possibilita a futura larva adquirir sua forma definitiva, de acordo com os eixos simétricos e polares já anteriormente estabelecidos.

Ao final da blastocinese, quelíceras, pedipalpos e os primeiros três pares de patas crescem em direção ao centro da superfície ventral, enquanto as inserções das coxas adotam posição mais lateral. Podossoma e opistossoma formam, então, uma unidade morfológica, o idiossoma, enquanto os metâmeros anteriores e o ácron formam o gnatossoma (AESCHLIMANN; HESS, 1984). Outro evento desta fase são as expansões coxais dos pedipalpos direcionadas medialmente que surgem depois da contração da banda germinativa.

O processo final que define as estruturas internas da futura larva é denominado organogênese. Nesta fase o cordão do gânglio ventral se contrai, originando o singânglio situado definitivamente sobre a seção antero-ventral da banda germinativa. O saco retal desenvolve a partir da invaginação do proctodeu dentro do telson e os túbulos pareados de Malpighi se originam como uma dupla evaginação lateral do saco retal. Tanto os túbulos de Malpighi, quanto a ampola retal estão ativos no embrião desde o aparecimento de excrementos de cristais brancos de guanina (AESCHLIMANN; HESS, 1984). O acúmulo de guanina no saco retal e a diferenciação das glândulas salivares foram observados por Shiraishi et al. (1990), no oitavo dia de incubação dos ovos. No décimo segundo dia, foi observado o desenvolvimento da larva com segmentação das pernas e formação das unhas. No décimo quarto dia, foi observado o desaparecimento do quarto par de patas rudimentares e a conclusão da cutícula, quando finalmente no décimo sétimo dia, ocorreu a eclosão larval.

2.3 Biologia da Oviposição e Embriogênese

Dipeolu (1991) ao estudar sobre a oviposição, tamanho e forma dos ovos e desenvolvimento embrionário de *Dermacentor variabilis*, *R. sanguineus* e *Amblyomma maculatum*, observou que o modelo de oviposição de *R. sanguineus* foi caracterizado por duas curvas ao longo dos dias de postura. 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, e então, entra em decréscimo até atingir o final da oviposição. A curva do tipo II foi caracterizada pelo pico de postura no primeiro dia da oviposição, com diminuição até o final da oviposição. 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.

Visando avaliar o efeito de diferentes temperaturas no desenvolvimento de *R. sanguineus*, Bellato e Daemon (1997) observaram 21 fêmeas sob temperatura de $27 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa superior a 80%, estas fêmeas tiveram seu período de postura com duração média de $13,71 \pm 0,49$ dias com amplitude de variação de 9 a 18 dias. O peso inicial dessas fêmeas foi em média $178,8 \pm 6,10$ ($128,5 - 236,00$) mg, com duração total do ciclo variando de 68 a 111 com média de 83,09 dias, o ritmo de postura foi caracterizado por uma curva do tipo II conforme descrito por Dipeolu (1991).

A avaliação de parâmetros biológicos ligados a oviposição sob as condições oferecidas por Bellato e Daemon (1997) também foi empregada para *B. microplus* (LOUZADA; DAEMON, 2003) no grupo controle durante a avaliação do efeito de diferentes tempos de imersão de teleóginas em água destilada sendo, o peso inicial das fêmeas em média de 170, $18 \pm 29,29$ mg, o período médio de pré-postura de $2,33 \pm 0,48$ dias, o período médio de postura $11,26 \pm 2,86$ dias, enquanto o período de incubação de $24,53 \pm 0,83$ dias. O IER (Índice de Eficiência Reprodutiva) e IEN (Índice de Eficiência Nutricional) médios foram $53,44 \pm 7,19$ e $82,82 \pm 4,54$, respectivamente. O percentual de eclosão médio observado foi $74,0 \pm 31,35\%$. Com relação à curva de oviposição, esta começou baixa e subiu lentamente até que houve um pico no 3º dia de postura, seguido por uma queda no 4º dia e um segundo pico maior no 5º dia de postura, a partir de então, houve uma queda progressiva até o fim do período de oviposição.

Gallardo e Morales (1999) estudaram parâmetros relativos a pré-oviposição, oviposição, incubação dos ovos e geotropismo de *B. microplus* a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, $85 \pm 10\%$ de UR, e 12:12 (D:N) horas de fotoperíodo. E com relação ao período de incubação foram observados que a emergência das larvas seguiu uma ordem cronológica inversa, eclodindo primeiro os “pools” de ovos postos pelas teleóginas no sexto dia. Devido à inversão da ordem cronológica de emergência das larvas, as médias dos valores obtidos para período de incubação foram 37,57 e 42,12 dias para os dias seis e um respectivamente. A partir do sexto ao décimo quarto dia, a emergência da larva ocorreu em uma seqüência lógica com um tempo médio de 37,60 dias para cada “pool” de ovos. A partir do dia 14 ao dia 21, o tempo médio mínimo de eclosão aumentou progressivamente entre 37,75 e 39,83 dias. Finalmente, entre os dias 21 e 24, o tempo mínimo obtido esteve entre 39,83 e 38,0 dias. Em geral, o tempo médio mínimo de eclosão foi de 38,46 dias. A duração do tempo médio de oviposição da teleóquina foi de 23,39 dias com uma amplitude de 14 a 34 dias durante os quais depositou uma média de 3.022 ovos. O pico máximo de oviposição ocorreu cinco dias depois de iniciado o processo com uma média de 286 ovos/ dia/ teleóquina o qual representou 9,51% da ovoposição total. Depois do dia cinco a taxa de oviposição diminuiu progressivamente e aos 13,14 dias as teleóginas

havia alcançado os 90% da oviposição total. O tempo médio de duração da fase não parasitária de *B. microplus* correspondente a pré-oviposição, tempo mínimo de eclosão e geotropismo negativo foi de 49,2 dias. A duração média dos períodos de pré-oviposição, tempo mínimo de eclosão e geotropismo negativo do carrapato *B. microplus* foi de 4,74, 38,46 e seis dias, respectivamente, para um total do ciclo não parasitário de 49,2 dias.

Borges et al. (2001), avaliou a influência do peso inicial e da estação do ano na conversão de ovos em fêmeas *B. microplus* e verificou que há uma relação curvilínea entre o peso das fêmeas e o IER. Fêmeas 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%). O peso das fêmeas não apresentou distribuição sazonal, variando de 175 a 262mg. A capacidade de converter o peso em ovos foi maior nos meses do período seco (abril a setembro, 47,6% a 58,3%) do que nos meses de período chuvoso (outubro a março 40,2% a 43,6%). Para avaliação da influência da estação do ano na conversão de ovos em fêmeas de *B. microplus* foram utilizadas apenas fêmeas pesando entre 151 e 360mg.

Prata (2002), avaliou o período de incubação e o percentual de eclosão de *Amblyomma cajennense* em diferentes temperaturas de acordo com o dia em que os ovos foram postos, detectando diferenças significativas entre esses períodos. Em relação à temperatura constante de 27°C, em que fêmeas e ovos foram mantidos, verificou que os ovos postos nos primeiros cinco dias e, a partir do 21º dia após o dia de início de postura, necessitaram de um período de incubação significativamente maior (acima de 30 dias) do que os ovos provenientes da fase intermediária de postura (28 a 29 dias). Com relação ao percentual de eclosão, constatou que a eclosão larval em ovos provenientes do final da postura (a partir do 26º dia após o dia de início) foi significativamente mais baixa que as demais, chegando a zero nos ovos correspondentes aos últimos dias da postura. Verificou-se também que a eclosão também foi menos eficiente em relação aos ovos do primeiro e segundo dias após o início da postura (85 e 86,25%, respectivamente) em comparação aos ovos postos na fase intermediária (acima de 90%). Estas observações já foram feitas em outras espécies por outros autores (HITCHCOCK, 1955; BENNETT, 1974; LONDT, 1977; CAMPBELL; HARRIS, 1979).

Como no trabalho de Prata (2002) 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 uma 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. Estas informações encontram paralelo em experimentos realizados com outras espécies de Ixodídeos, em que foi destacada que a perda de água devido a uma impermeabilização deficiente ou à submissão a um ambiente de baixa saturação é a maior responsável por falhas no processo de eclosão (SAUER; HAIR, 1971; LONDT, 1977; MORAES et al., 1987; STREY et al., 1996; SUTHERST et al., 1999).

Em relação a *D. variabilis*, a emergência de larvas foi reduzida nos ovos dos últimos dias de oviposição. A razão para esta diminuição pode ser devido à teleóginas diminuírem o nível de nutrientes disponibilizados aos ovos e/ou o estoque de espermatozoides diminuírem para os últimos poucos ovos produzidos (SONENSHINE; TIGNER, 1969; CAMPBELL; HARRIS, 1979).

Cançado (2004) ao observar o efeito de diferentes agregações sobre os processos de muda para ninfa e adultos em *Haemaphysalis leporispalustris* e *R. sanguineus* concluiu que para as duas espécies estudadas o grau de agregação dos espécimes influencia parâmetros

biológicos como a ecdise ninfal e de adultos, mas não o percentual de ecdise nas duas espécies estudadas.

Carvalho (2005) avaliou o efeito da umidade relativa na embriogênese de *A. cajennense*, *R. sanguineus*, *B. microplus* e *Anocentor nitens*. Observando que existem perdas no conteúdo dos ovos de *A. cajennense*, *B. microplus* e *A. nitens* ao longo da embriogênese somente em umidades relativas inferiores a 70%, aumentando assim o número de ovos por mg ao longo do período embrionário. Sendo o estágio embrionário o mais afetado pela umidade relativa.

2.4 Proteínas dos Ovos e Hemolinfa de Carrapatos

2.4.1 Proteínas dos ovos

Estudos visando a caracterização e fisiologia da degradação da vitelina em carrapatos foram realizados por Boctor e Kamel (1976), que caracterizaram dois tipos de lipovitelinas dos ovos de *D. andersoni*, com um dia de postura, através da mobilidade eletroforética das mesmas.

Iwuala et al. (1981) realizaram estudos quantitativos das proteínas, ácidos graxos livres e glicogênio dos ovos de *Amblyomma variegatum* e *Boophilus decoloratus* ao longo do período de postura, verificando que o conteúdo protéico dos ovos postos inicialmente é comparativamente mais elevado que os dos ovos postos durante o período de declínio da postura. No entanto, vale ressaltar, que nos ovos dos últimos dias de postura houve uma elevação do conteúdo protéico, que atingiu níveis próximos àqueles do início da postura. Os autores então sugeriram um modelo de curva em forma de “U” para representar os níveis protéicos durante a oviposição. Iwuala et al. (1981) não puderam encontrar explicações para este fenômeno, mas levantaram hipóteses baseadas na fase de quebra das proteínas obtidas da alimentação no hospedeiro e utilização das mesmas na síntese das glicolipoproteínas durante a ovogênese e da quebra das proteínas em aminoácidos até o ponto de início da organogênese e formação da larva, quando haveria um déficit entre o processo anabólico e catabólico.

Rosell e Coons (1991) purificaram e caracterizaram a vitelina de ovos do carrapato *D. variabilis* usando filtração em gel e cromatografia de transferência iônica, onde duas proteínas da vitelina foram identificadas e nomeadas vitelina A 480 KDa e vitelina B 370 KDa.

De acordo com Chinzei (1983), das proteínas totais dos ovos de *O. moubata*, 80% são proteínas da gema. James e Oliver (1997) purificaram e caracterizaram parcialmente a vitelina dos ovos frescos de *Ixodes scapularis*. A proteína purificada teve peso total de 480KDa. Em gel de eletroforese desnaturante, a vitelina mostrou-se composta por sete subunidades polipeptídicas com 154, 135, 87, 78, 67, 64 e 35 KDa cada. Também foram detectados lipídios através de cromatografia de camada fina (TLC), estes foram triglicérides, ácidos graxos livres e colesterol, além de proteínas, carboidratos e componentes heme, mostrando que como em outros carrapatos, a vitelina de *I. scapularis* é também uma hemoglicolipoproteína. Imunologicamente foi observado que a vitelina de *I. scapularis* é semelhante ao seu precursor, a vitelogenina, sendo que através da cromatografia e técnicas eletroforéticas os resultados indicaram que a vitelogenina isolada do corpo gorduroso possui seis polipeptídeos, enquanto a vitelina nos ovos possui sete polipeptídeos.

Estudos da degradação das proteínas ao longo do desenvolvimento embrionário de ovos de *B. microplus* foram realizados por Logullo et al. (1998), através do acompanhamento da ação das proteases, especificamente da enzima *Boophilus* Yolk Cathepsin (BYC), a qual pode ser uma precursora de uma proteinase aspártica (executa a função de degradar vitelina). Através deste estudo, os autores descreveram o isolamento e parcial caracterização da BYC, e forneceram evidências sugerindo que esta enzima executa uma função no desenvolvimento

embrionário de carrapatos. Através de eletroforese, puderam observar que a enzima é composta de duas bandas protéicas de 54 e 49 KDa.

Andreotti et al., (2001) purificaram e caracterizaram bioquimicamente inibidores de serina proteinase durante o desenvolvimento dos ovos de *B. microplus*. Extratos crus das amostras foram analisados por SDS-PAGE, e mostraram três maiores bandas de proteínas com 42, 62 e 85 KDa em ovos de cinco dias. Os resultados mostraram uma pequena diferença no padrão de proteínas, com uma banda de proteína de 20 KDa nas amostras de ovos com 5 e 15 dias, que não foi observada nas amostras com 26 dias de idade.

Para estudar os mecanismos de ligação e armazenamento da vitelina do carrapato *B. microplus*, Logullo et al. (2002) descreveram a purificação e parcial caracterização da mesma. Evidenciaram que esta molécula é uma proteína ligadora de heme que funciona como um estoque de heme e como antioxidante para o desenvolvimento do embrião, pois imediatamente após a oviposição, a vitelina de *B. microplus* contém aproximadamente um mol de heme por mol de proteínas e durante o desenvolvimento embrionário cerca de um terço da vitelina dos ovos é degradada. Talvez, devido à degradação de parte da vitelina durante a embriogênese, o perfil de proteínas que compõem a vitelina foi alterado, com substancial perda de quatro apoproteínas ao longo da embriogênese, duas dessas apoproteínas tiveram seus pesos moleculares identificados que foram 205 e 116 KDa, simultaneamente houve o aparecimento de novas bandas de proteínas de pesos moleculares 60 e 30 KDa aproximadamente. A explicação dos autores para estes resultados é que a vitelina de *B. microplus* é processada através de uma proteólise limitada durante o desenvolvimento e os polipeptídeos produzidos permanecem ligados às partículas de lipoproteínas, levando à uma diminuição relativamente modesta da massa molecular das proteínas presentes nos ovos frescos. Deste modo, os autores concluíram que a degradação da vitelina inicia-se imediatamente depois da oviposição e durante o período de embrionamento 40% da vitelina original é consumida. Entretanto, a quantidade total de heme presente nos ovos permanece extraordinariamente constante através do desenvolvimento embrionário e larval. Estes resultados sugerem que a maioria das moléculas heme liberadas pela degradação da gema nos cinco primeiros dias não são usadas pelo embrião, permanecendo ligadas a moléculas de vitelina que sobram. No fim do desenvolvimento, uma vez completa a organogênese, o sistema digestivo seqüestra a gema e por isso o aumento na taxa de degradação da vitelina é observado na última semana, podendo ser considerado como uma digestão *in natura* (digestão natural).

Seixas et al. (2003), purificaram e caracterizaram uma cisteína endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE) dos ovos do 1º ao 12º dia de oviposição, do carrapato *B. microplus*. A enzima purificada foi confirmada através de capilaridade e gel de eletroforese nativo, o SDS-PAGE sugeriu que a enzima é um dímero (2 subunidades) de 17 e 22 KDa unidos através de ligação não covalente por pontes de dissulfeto. Esta enzima é estreitamente associada com a vitelina. Como proteases de subclasse das cisteínas endopeptidases frequentemente participam da degradação da gema dos ovos de artrópodes, os autores deste trabalho acreditam que o substrato fisiológico para VTDCE é a vitelina, e que a VTDCE é a maior enzima envolvida no processamento da gema durante o desenvolvimento embrionário de *B. microplus*.

Abreu et al. (2004), caracterizaram a função da Boophilus Yolk Cathepsin (BYC), anteriormente identificada por Logullo et al. (1998), no consumo da vitelina durante o período de acidificação cortical que ocorre na embriogênese em ovos de *B. microplus*. Seu peso molecular é de 54 KDa e esta proteinase é ativada *in vitro* através da auto-proteólise quando incubada em pH ácido, sendo convertida para um polipeptídeo de peso molecular 47 KDa que pode ser detectado *in vivo*, durante a embriogênese. O autor sugere que a acidificação dos grânulos da gema começam acerca do quarto dia de embriogênese, como consequência do

aumento da atividade da H^+ - ATPase. Este evento permite a ativação da BYC local, que irá degradar a vitelina durante este período.

Silveira et al. (2006), observaram uma enzima de peso molecular 45 KDa chamada tirosina fosfatase nos ovos de *B. microplus* durante a embriogênese. Esta enzima é responsável pela degradação dos resíduos de fosfotirosina da vitelina. A defosforilação dos resíduos de fosfotirosina da vitelina permite que a vitelina seja degradada por enzimas proteolíticas.

2.4.2 Proteínas da hemolinfa

Gudderra et al. (2002), em uma revisão de literatura sobre as proteínas da hemolinfa em carrapatos reuniram diversos achados sobre as proteínas em ixodídeos.

Em insetos, como em carrapatos, a vitelogenina circulante na hemolinfa é precursora da proteína vitelina da gema do ovo. Durante a vitelogenese, a vitelogenina é sintetizada através do corpo gorduroso e liberada na hemolinfa. Uma vez na hemolinfa, a vitelogenina é seletivamente absorvida através do oócito em desenvolvimento via endocitose mediada por receptores, onde ela é estocada como vitelina e serve como um recurso nutricional para o desenvolvimento embrionário (RAIKHEL, 1992; SAPPINGTON et al., 1995).

Gudderra et al. (2002), ainda estudaram as proteínas da hemolinfa de carrapatos, com o intuito de conhecer como as proteínas do sangue são degradadas e convertidas em proteínas da hemolinfa. Em *D. variabilis*, a vitelina A tem um peso molecular de 480 KDa e a vitelina B 370 KDa (ROSELL; COONS, 1991), enquanto em *I. scapularis*, a vitelina tem 480 KDa e contém oito subunidades com peso molecular de 48 a 145 KDa (JAMES; OLIVER, 1997, 1999b). Em geral, a composição de carboidratos, lipídios e aminoácidos da vitelina é similar em insetos e carrapatos, mas as proteínas dos carrapatos (vitelina e vitelogenina) são hemeglicolipo-proteínas (CHINZEI et al., 1983; ROSELL; COONS, 1992; JAMES; OLIVER, 1996, 1999a; TAYLOR; CHINZEI, 2001).

Hemoproteínas ou hemoglicoproteínas associadas com a vitelogenese têm sido descritas em *R. sanguineus*, *O. moubata* e *B. microplus* (ARAMAN, 1979; DIEHL, 1969, 1970; TATCHELL, 1971). Shanbaky et al. (1990) relataram hemoglicoproteínas na hemolinfa de *Argas (Argas) hermanni* adultos. Proteínas encontradas na hemolinfa também ocorrem na glândula salivar ou saliva de *Rhipicephalus appendiculatus* (WANG; NUTTALL, 1994).

SDS-PAGE de extratos do corpo de carrapatos, larvas, ninfas e adultos parcialmente alimentados revelou cinco proteínas (68, 57, 50, 47 e 43 KDa) comuns para duas espécies diferentes de carrapatos, *Hyalomma anatolicum* e *B. microplus* (GOSH; KHAN, 2000). Proteínas (98 e 93.5 K) não associadas com a vitelogenese ocorrem na hemolinfa de *H. dromedarii* adultos (SCHRIFER, 1991). Similarmente, uma proteína de 270 KDa com duas subunidades (98 e 93 KDa) é a proteína mais abundante na hemolinfa da fêmea de *D. variabilis* (SULLIVAN et al., 1999).

Um novo membro da família das α -2-macroglobulinas (α 2M) inibidores de proteases tem sido identificado no plasma de *O. moubata* (KOPACEK et al., 2000). ? a-macroglobulina dos carrapatos (TAM) é uma glicoproteína com um peso molecular de 420 KDa pelo PAGE e 500 KDa através da filtração do gel. TAM migra como uma única banda de 190 KDa sob condições não reduzidas e através do SDS-PAGE sob condições reduzidas, TAM consistiu de duas subunidades, de 75 e 92 KDa.

A principal proteína da hemolinfa de *B. microplus* é a chamada HeLp (heme lipoprotein from the hemolymph), testes indicam que esta proteína é responsável pelo transporte de heme da hemolinfa aos tecidos, e que possui um peso molecular aparente de 354KDa com duas apoproteínas (103 e 92 KDa) encontradas em igual quantidade. Esta

mesma proteína possui duas moléculas heme, e é capaz de se ligar a seis moléculas heme adicionais (MAYA – MONTEIRO et al., 2000).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Local de Execução

Todo o procedimento de colonização das teleóginas para obtenção das posturas foi realizado no Laboratório de Ixodologia e o congelamento dos ovos a -20°C no Laboratório de Hemoparasitos ambos localizados na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz do Departamento de Parasitologia Animal / Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As análises bioquímicas iniciais das proteínas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular e posteriormente, a eletroforese em gel de poliacrilamida no Laboratório de Coccídios e Coccidioses, todos pertencentes ao Departamento de Parasitologia Animal da UFRRJ localizada na Rodovia BR 465, Km 7, Rio de Janeiro – Brasil.

3.2 Origem e Manutenção dos Ixodídeos no Laboratório

3.2.1 Origem

Teleóginas de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* foram obtidas através de infestações artificiais em bovinos e coelhos, respectivamente, sendo os espécimes de *R. (B.) microplus* proveniente da segunda geração de colônia mantida no Laboratório de Fungos Entomopatogênicos (DPA/IV/UFRRJ) e *R. (R.) sanguineus* oriundos da quinta geração da colônia mantida no Laboratório de Ixodologia.

3.2.2 Manutenção das fêmeas ingurgitadas

Fêmeas de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* foram lavadas em solução de hipoclorito a 1%, enxaguadas em água corrente e, secas em papel toalha. Após o procedimento de limpeza, as fêmeas foram coladas com esparadrapo em decúbito dorsal em placas de Petri, essas placas foram acondicionadas em estufa biológica para postura sob condições controladas ($27 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR, escotofase).

Em virtude do objetivo proposto, foi necessário que houvesse sincronismo do início da oviposição das fêmeas de cada espécie e como consequência disso, o número de exemplares utilizados para compor o “pool” variou como mostrado na Tabela 01. O peso médio das fêmeas utilizadas esteve dentro do observado na literatura (BELLATO; DAEMON, 1997; BORGES et al., 2001; LOUZADA; DAEMON, 2003). 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, e que os ovos congelados diariamente para avaliação da embriogênese estivessem com a mesma idade ao terem seu desenvolvimento embrionário interrompido.

3.3 Procedimento para Obtenção dos Ovos de Ixodídeos

3.3.1 Por dia de postura

Iniciada a postura e até seu término, amostras diárias de 50 mg foram recolhidas e acondicionadas em tubos tipo eppendorf, identificadas e preservadas a -20°C . Nos últimos dias que antecedem o final da postura devido ao decréscimo natural da oviposição, as posturas diárias de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* não atingiram os 50 mg coletados no início

da oviposição, mesmo assim as amostras diárias foram coletadas, pesadas, identificadas e acondicionadas conforme mencionado anteriormente.

Tabela 1. Número e peso médio das fêmeas utilizadas por espécie de Ixodida para obtenção das amostras de ovos.

ESPÉCIE	Nº. DE EXEMPLARES	PESO MÉDIO (mg)
<i>R. (B.) microplus</i>	57	217,9 ± 44,2
<i>R. (R.) sanguineus</i>	69	127,9 ± 30,1

3.3.2 Por dia de incubação

“Pools” de ovos do terceiro e quarto dias de postura de cada espécie foram separados em alíquotas de 50 mg. Estas alíquotas foram acondicionadas em tubos tipo “eppendorf” com furos na tampa, e mantidas em estufa biológica sob as condições de temperatura e umidade já descritas. Diariamente, uma das alíquotas foi congelada a -20°C . A última alíquota congelada continha a primeira larva eclodida, caracterizando o final do período embrionário.

O terceiro dia de postura foi escolhido como o dia zero de desenvolvimento embrionário, pois é relatado na literatura como dia de pico de postura em espécies de ixodídeos e, com percentual de eclodibilidade em torno de 100% (PRATA, 2002; LOUZADA; DAEMON, 2003). O quarto dia de postura, também foi separado em alíquotas caso o terceiro dia não compreendesse todo o período de embriogênese.

3.4 Preparo das Amostras para Dosagem das Proteínas Totais e Eletroforese

Para obtenção de extrato protéico e dosagem das proteínas totais, os ovos armazenados por dia de postura e incubação à -20°C foram descongelados em temperatura ambiente de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, lavados com tampão fosfato pH 7,4 (Anexo A) e em seguida macerados entre gral e pistilo estéreis com 1ml de solução de tampão de lise diluído (Anexo B). A solução formada foi filtrada em membrana de milipore de 0,45 μm .

Após filtração, a desnaturação química foi realizada através da adição de 100 μl de tampão de amostra cinco vezes concentrado (Anexo C) em 500 μl da solução de amostra filtrada. Em seguida, para a realização da desnaturação física, as amostras foram colocadas em água fervente por três minutos utilizando-se um suporte de isopor, para que não ficassem totalmente imersas e corresse o risco de abrir devido a pressão formada dentro do “eppendorf”, perdendo assim as amostras. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em temperatura ambiente de $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, e novamente congeladas a -20°C .

A técnica utilizada para dosagem de proteínas totais dos ovos de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* foi a descrita por Bradford (1976), onde cada amostra de ovos por dia de postura e incubação foi dosada em triplicata. A concentração final das proteínas foi expressa pela média das três dosagens. Para realização das dosagens, as amostras desnaturadas foram cinco vezes diluídas. Após a obtenção da curva padrão, a concentração protéica de cada amostra foi calculada em mg/ml, posteriormente essa concentração foi convertida para μg de proteínas em mg de ovos. Obtida a concentração das proteínas totais de cada amostra, foi calculado o volume de extrato para que a quantidade de proteína utilizada em cada poço do gel de poliácridamida fosse de 30 μg (LAEMMLI, 1970).

O sistema utilizado para eletroforese foi o sistema vertical de gel descontínuo (em duas camadas), onde as amostras sofreram uma primeira corrida, no gel de empilhamento

denominado “staging gel” 5% (Anexo D), à corrente de 80 volts, 25mA e 20 Watts. Quando o padrão de peso molecular (BioLabs[®]) se encontrou no limite entre os géis, realizou-se a corrida de resolução, no denominado “resolving gel” 10% (Anexo E). Nesta segunda camada de gel a corrida foi realizada sob corrente de 100 volts, 30mA e 20 Watts. O padrão de peso molecular teve abrangência de 32.5 – 175 KDa.

3.5 Coloração, Descoloração, Análise e Montagem do Gel

Efetuada a corrida de eletroforese, os géis foram mergulhados em solução de pré-fixação (50ml de metanol, 7ml de ácido acético e 43ml de água destilada) por quinze minutos; depois em solução corante (500ml de metanol, 70ml de ácido acético, 430ml de água destilada e 0,5g de Azul Brilhante de Commasie) por 45 minutos. Em seguida a descoloração foi realizada dividindo-se a solução de metanol 25%, ácido acético 10% e água destilada 65% em duas partes de 500ml. Desta forma o gel permaneceu na primeira parte durante toda noite e na segunda durante 15 minutos, onde resíduos de coloração foram retirados para completa revelação do zimograma. Posteriormente os géis foram mergulhados na solução de fixação pós-coloração (ácido acético a 5%) durante trinta minutos.

Os géis foram montados entre papel especial de celofane poroso, para conservação e realização de análises. Para calcular o peso molecular das bandas protéicas, os géis foram analisados pelo programa *Quantity one* (Bio Rad[®]). As estimativas dos pesos moleculares das bandas protéicas dos zimogramas foram obtidas tendo como parâmetro a curva de calibração do padrão de peso molecular corrido paralelo às amostras em cada gel.

3.6 Análise dos Dados

Os parâmetros biológicos foram observados de acordo com Bellato e Daemon (1997), estes foram períodos de pré-postura, de postura e de incubação. O ritmo de postura foi observado segundo Prata (2002). Os Índices de Eficiência Reprodutiva e Nutricional de *R. (R.) sanguineus* foram calculados segundo Bennett (1974). Para *R. (B.) microplus*, Índice de Eficiência Reprodutiva foi calculado considerando a massa total de ovos em relação ao peso total das fêmeas, e o Índice de Eficiência Nutricional através da massa total de ovos sobre a diferença entre o peso total das fêmeas ingurgitadas e quenógenas.

Os dados das concentrações protéicas foram analisados através de correlação com os dias de postura e os dias de embriogênese. Para isso, foi utilizado o coeficiente de correlação de Pearson (r), com os dados de concentração transformados logaritmicamente [$\log (X+1)$]. Os dados foram transformados após o descarte da normalidade (teste de Shapiro-Wilk) (Ayres et al. 2005).

Após análise do peso molecular das bandas protéicas, os géis foram verificados para ausência ou presença das bandas nos zimogramas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Parâmetros Biológicos

Considerando que para efeito de análise os parâmetros e índices referentes à biologia da oviposição são importantes para detectar fontes de variação devido a fatores abióticos, estes foram registrados e comparados com os dados da literatura da fase não parasitária das fêmeas utilizadas.

O período pré-postura de todas as 57 fêmeas de *R. (B.) microplus* utilizadas neste experimento foi de dois dias. Quanto ao período de postura expresso na Tabela 2, observa-se que algumas fêmeas chegaram até o 21º dia em oviposição, com valores médios de $13,23 \pm 5,52$ dias. O período embrionário estendeu-se até o 35º dia, quando as primeiras larvas eclodidas foram observadas.

Tabela 2. Peso total da massa de ovos (mg) e número de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 5\%$ UR).

DIA DE POSTURA	% DE FÊMEAS EM POSTURA	NÚMERO DE FÊMEAS	PESO DA MASSA DE OVOS (mg)
1	100	57	288,7
2	100	57	945,4
3	100	57	1.219,6
4	100	57	1.231,8
5	78,95	45	1.387,8
6	77,19	44	822,8
7	77,19	44	452,9
8	77,19	44	524,0
9	77,19	44	280,2
10	77,19	44	164,3
11	71,93	41	92,4
12	71,93	41	46,0
13	71,93	41	26,9
14	63,16	36	15,1
15	56,14	32	9,3
16	42,10	24	3,8
17	31,58	18	2,4
18	10,53	6	0,8
19	8,77	5	0,4
20	3,51	2	0,2
21	5,26	3	0,2

Em *R. (B.) microplus*, os valores calculados de IER e IEN foram 60,51% e 80, 02% respectivamente. Estas observações estão de acordo com os achados de Louzada e Daemon (2003), que utilizaram as mesmas condições de temperatura e umidade do presente experimento. O IER das fêmeas de *R. (B.) microplus* (60,51%) está de acordo com Borges et al. (2001), que observaram que as fêmeas coletadas no período seco (abril a setembro) pesando entre 151 e 360mg e colocadas sob as mesmas condições controladas do presente

experimento possuíam maior IER variando de 47,6 a 58,3%, neste mesmo período foram realizadas as coletas do presente experimento.

Os períodos de pré-postura e postura do presente experimento diferem dos observados por Gallardo e Morales (1999), que utilizaram diferentes condições experimentais ($23 \pm 1^\circ\text{C}$, fotoperíodo 12 h), observando período de pré-postura de 4,74 dias e período de postura de 23,39 dias em *B. microplus*.

Embora fossem esperados um pico de postura e um período de incubação condizente com os achados de Louzada e Daemon (2003), que utilizaram as mesmas condições de umidade e temperatura do presente experimento para *R. (B.) microplus* e onde o pico de postura ocorreu no terceiro dia de oviposição, os parâmetros do presente experimento concordam com as observações de Gallardo e Morales (1999), que utilizaram diferentes condições experimentais e observaram o pico de postura no quinto dia após início da postura e período de incubação médio de 38,46 dias em *B. microplus*. O pico de postura do presente experimento ocorreu no quinto dia após início da postura (Figura 1).

O mesmo dia de pico observado por Gallardo e Morales (1999) ocorreu em *A. cajennense*, quando as fêmeas foram colocadas em $27 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de pré-postura e a $32 \pm 1^\circ\text{C}$ durante o período de postura, este mesmo pico foi observado quando as temperaturas acima citadas foram invertidas durante estes processos biológicos (PRATA, 2002).

O tempo de embriogênese observado no presente experimento para *R. (B.) microplus* e por Gallardo e Morales (1999), pode ter sido devido a diminuição da massa de ovos, pois neste trabalho, a massa de ovos foi separada em alíquotas de 50 mg; enquanto no experimento de Gallardo e Morales (1999), a incubação foi observada em “pools” de ovos separados por dia de postura. Desta maneira, suspeita-se que houve um menor fator de agregação nos ovos separados em grupos de 50mg (CANÇADO, 2004), aumentando assim o período de incubação normalmente observado a 27°C .

Em relação a *R. (R.) sanguineus* as fêmeas tiveram um período de pré-postura de $3,91 \pm 0,70$ dias, período médio de postura de $14,83 \pm 2,62$ dias (Tabela 3). O pico de postura ocorreu no quarto dia após início da oviposição (Figura 1) e o período embrionário estendeu-se até o 41º dia. O IER médio foi de $65,68 \pm 10,72$ %, enquanto o IEN foi de $80,75 \pm 8,04$ %, calculados de acordo com Bennett (1974).

O modelo de ritmo de oviposição observado para *R. (R.) sanguineus*, cuja produção de ovos inicialmente baixa foi rapidamente elevada atingindo o pico no 4º dia de postura (Figura 1), enquadra-se no tipo I representativo para a espécie conforme Dipeolu (1991). Vale ressaltar que a curva de oviposição observada por Bellato e Daemon (1997) para *R. sanguineus*, apresentou modelo distinto em virtude de suas observações, que ao invés de diárias foram a cada três dias. O período médio de postura está de acordo com o observado por Bellato e Daemon (1997), embora o período de incubação de 41 dias tenha extrapolado em 23 dias a média do período de incubação encontrado pelos mesmos autores. Da mesma forma que para *R. (B.) microplus*, essa diferença pode ser explicada pela desagregação da massa de ovos frescos em alíquotas de 50mg, que pode ter interferido na manutenção das condições microclimáticas necessárias ao desenvolvimento do embrião quando em agregados maiores (CANÇADO, 2004).

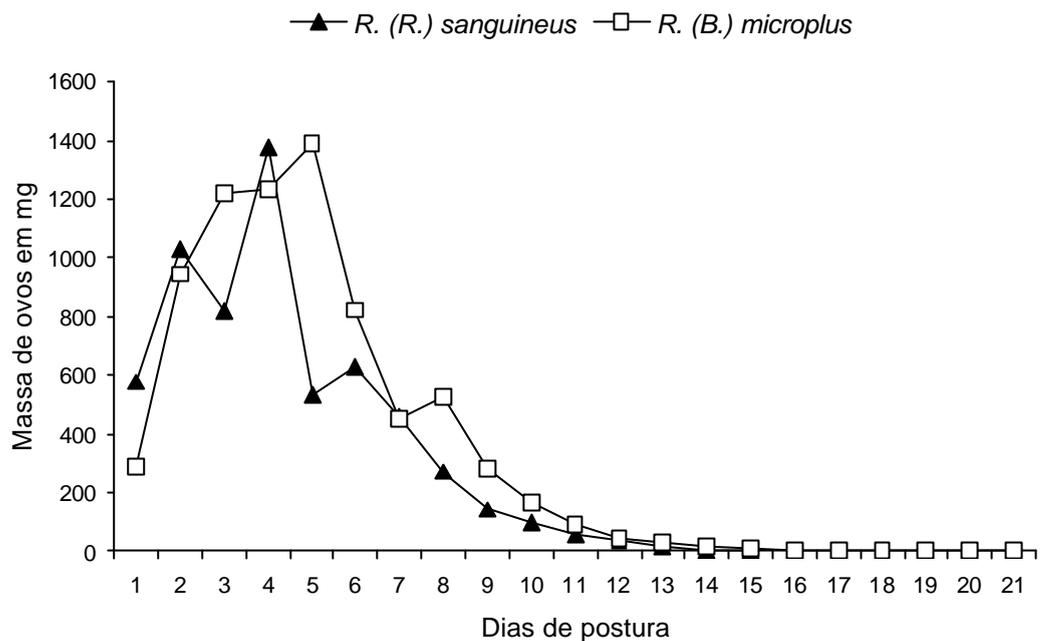


Figura 1. Ritmo de postura diária de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

Tabela 3. Peso total da massa de ovos (mg) e número de fêmeas de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

DIA DA POSTURA	% DE FÊMEAS EM POSTURA	NÚMERO DE FÊMEAS	PESO DA MASSA DE OVOS (mg)
1	100	69	578,2
2	100	69	1.028,6
3	100	69	816,7
4	100	69	1.377,8
5	100	69	531,3
6	100	69	630,4
7	98,55	68	459,9
8	97,10	67	271,3
9	94,20	65	142,2
10	94,20	65	96,1
11	91,30	63	59,1
12	86,96	60	33,3
13	84,06	58	18,4
14	71,01	49	5,6
15	56,52	39	2,3
16	40,58	28	60*
17	15,94	11	19*
18	13,04	9	12*
19	4,35	3	5*

* número de ovos

4.2 Dosagem das Proteínas Totais na Oviposição

As médias das concentrações protéicas dos ovos de *R. (B.) microplus* por dia de postura estão apresentados na Tabela 4. De acordo com a análise estatística, existe correlação positiva entre os dias de postura e a concentração de proteínas dos ovos de *R. (B.) microplus* ($r= 0,857$; $p<0,01$). Na Figura 2 pode-se observar que a concentração protéica dos ovos foi constante durante o período de postura inicial, sofrendo uma pequena elevação entre os dias seis e 13. A partir do 14^o dia, observa-se um rápido aumento na concentração de proteínas, atingindo a concentração máxima no último dia de postura.

Tabela 4. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em relação aos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

DIA DA POSTURA	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos)
1	246,62
2	240,26
3	266,24
4	297,54
5	242,9
6	334,66
7	312,92
8	334,66
9	352,16
10	320,34
11	334,66
12	298,54
13	329,26
14	467,15
15	658,67
16	1.165,39
17	1.712,62
18	4.773,25
19	10.143,00
20	14.585,00
21	15.513,00

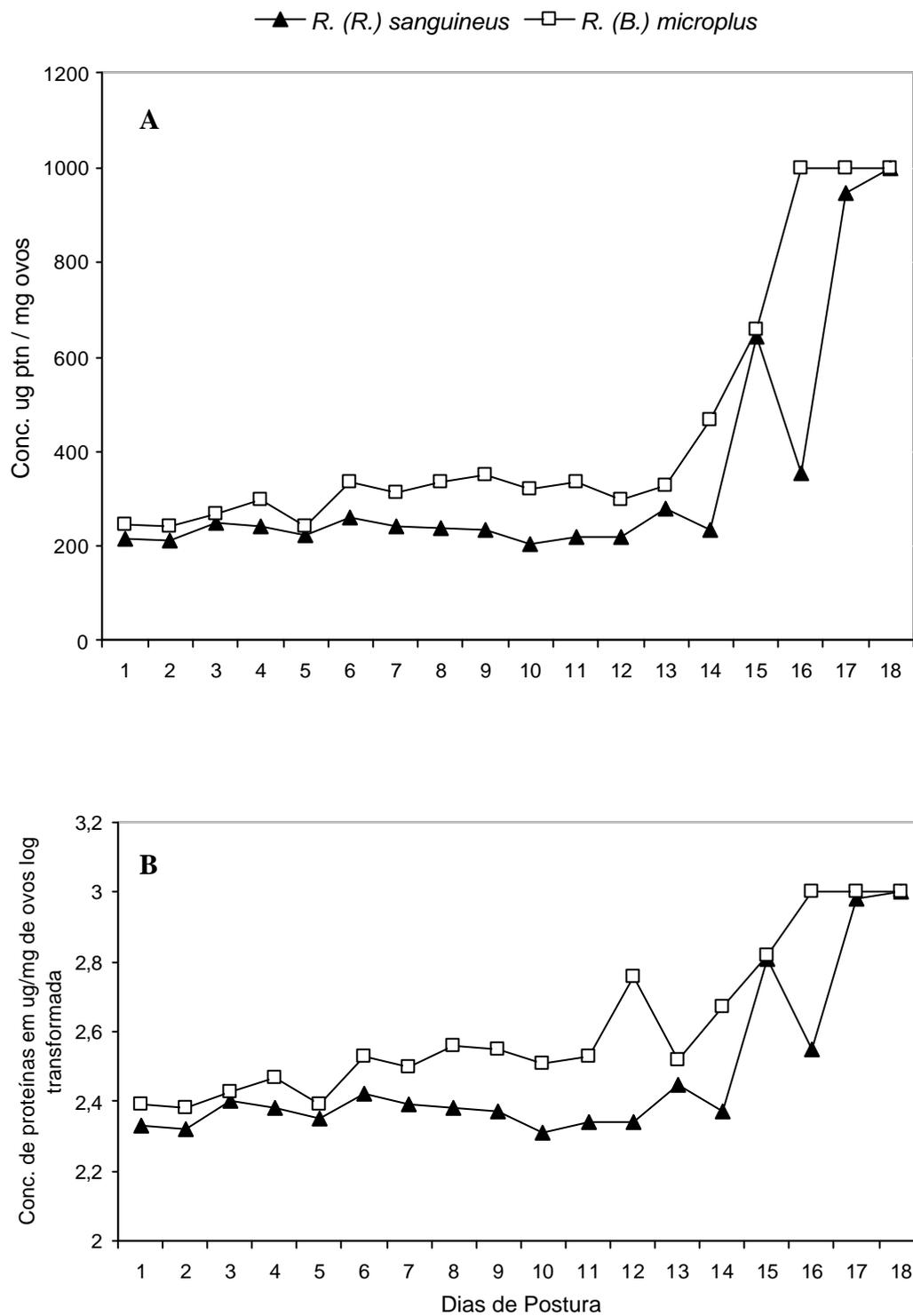


Figura 2. Concentrações protéicas em micrograma de proteína por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* por dia de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase); **A** - concentração de proteínas em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos, **B** - concentração de proteínas log transformada.

As médias das concentrações protéicas dos ovos de *R. (R.) sanguineus* por dia de postura estão expressos na Tabela 5. Através da correlação de Pearson, observa-se que existe correlação positiva entre a concentração de proteínas e os dias de postura de *R. (R.) sanguineus* ($r=0,696$; $p<0,01$). Ainda na Figura 2, observa-se que a concentração de proteínas não se altera até o 14º dia de oviposição, do 15º ao 19º dia, há um rápido aumento nas concentrações até atingir pico no último dia da postura.

Os achados relativos às duas espécies estudadas diferem dos de Iwuala et al. (1981), que realizaram estudos quantitativos das proteínas dos ovos de *A. variegatum* e *B. decoloratus* ao longo do período de postura. Os autores observaram que a concentração de proteínas nos ovos durante o período inicial e final de postura é mais elevada do que a dos ovos do período intermediário de postura. Podendo ser utilizado um modelo de curva em “U”, para representar as variações na concentração de proteínas durante a oviposição. Sendo que nos ovos dos últimos dias, a concentração de proteínas não é tão elevada quanto nos dias de início da postura, embora chegue a níveis próximos. As diferenças entre o presente trabalho e Iwuala et al. (1981) podem ser explicadas pelo uso de diferentes metodologias quanto ao armazenamento dos ovos até o momento da dosagem, pois Iwuala et al. (1981) não deixa claro se houve interrupção da embriogênese ou se a concentração de proteínas foi dosada em ovos frescos. No atual experimento, observa-se que a concentração das proteínas nos ovos aumenta ao longo do período de incubação, desta forma, as concentrações de proteínas dos ovos dos primeiros dias de postura do experimento de Iwuala et al. (1981) podem ter sido alteradas caso os ovos não tenham tido seu desenvolvimento embrionário interrompidos no dia em que foram postos. Sendo assim, uma comparação mais eficaz entre os dois experimentos se torna inviável, uma vez que existem hipóteses não confirmadas para a influência da metodologia na concentração das proteínas nos ovos utilizados no trabalho de Iwuala et al. (1981).

Tabela 5. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* em relação aos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

DIA DA POSTURA	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos)
1	215,62
2	210,98
3	248,10
4	241,36
5	223,22
6	261,6
7	242,2
8	238,4
9	235,02
10	204,64
11	217,72
12	218,8
13	280,16
14	235,37
15	644,36
16	354,40
17	947,32
18	2.420,76
19	19.454,92

4.3 Dosagem das Proteínas Totais na Embriogênese

As médias das concentrações protéicas nos ovos de *R. (B.) microplus* de acordo com o dia de incubação compõem a Tabela 6. Através da análise de Pearson, verificou-se que existe correlação positiva entre as concentrações das proteínas e o período de embriogênese dos ovos de *R. (B.) microplus* ($r=0,567$; $p<0,01$) e *R. (R.) sanguineus* ($r=0,547$; $p<0,01$) (Figura 3). Esta correlação não pode ser explicada pela dessecação natural dos ovos, aumentando a concentração das proteínas ao longo da embriogênese (CARVALHO, 2005), pois, todos os “pools” de 50 mg foram oriundos do terceiro e quarto dia de oviposição e separados imediatamente após a coleta, antes de serem colocados em condições controladas, evitando que fatores ambientais alterassem a massa de ovos e conseqüentemente, as concentrações de proteínas dos ovos frescos. As médias das concentrações protéicas nos ovos de *R. (R.) sanguineus* de acordo com o período embrionário são encontrados na Tabela 7.

Tabela 6. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por dia de incubação sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

DIA DE INCUBAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS ($\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos)
1	250,33
2	283,74
3	239,72
4	321,40
5	162,29
6	247,15
7	291,70
8	362,23
9	228,05
10	216,91
11	319,28
12	343,67
13	275,26
14	228,05
15	181,91
16	346,32
17	277,38
18	252,45
19	282,68
20	317,68
21	295,41
22	357,99
23	299,65
24	315,03
25	321,93
26	349,51
27	321,40
28	304,96
29	359,05
30	374,96
31	259,88
32	316,09
33	350,04
34	357,99
35	321,93

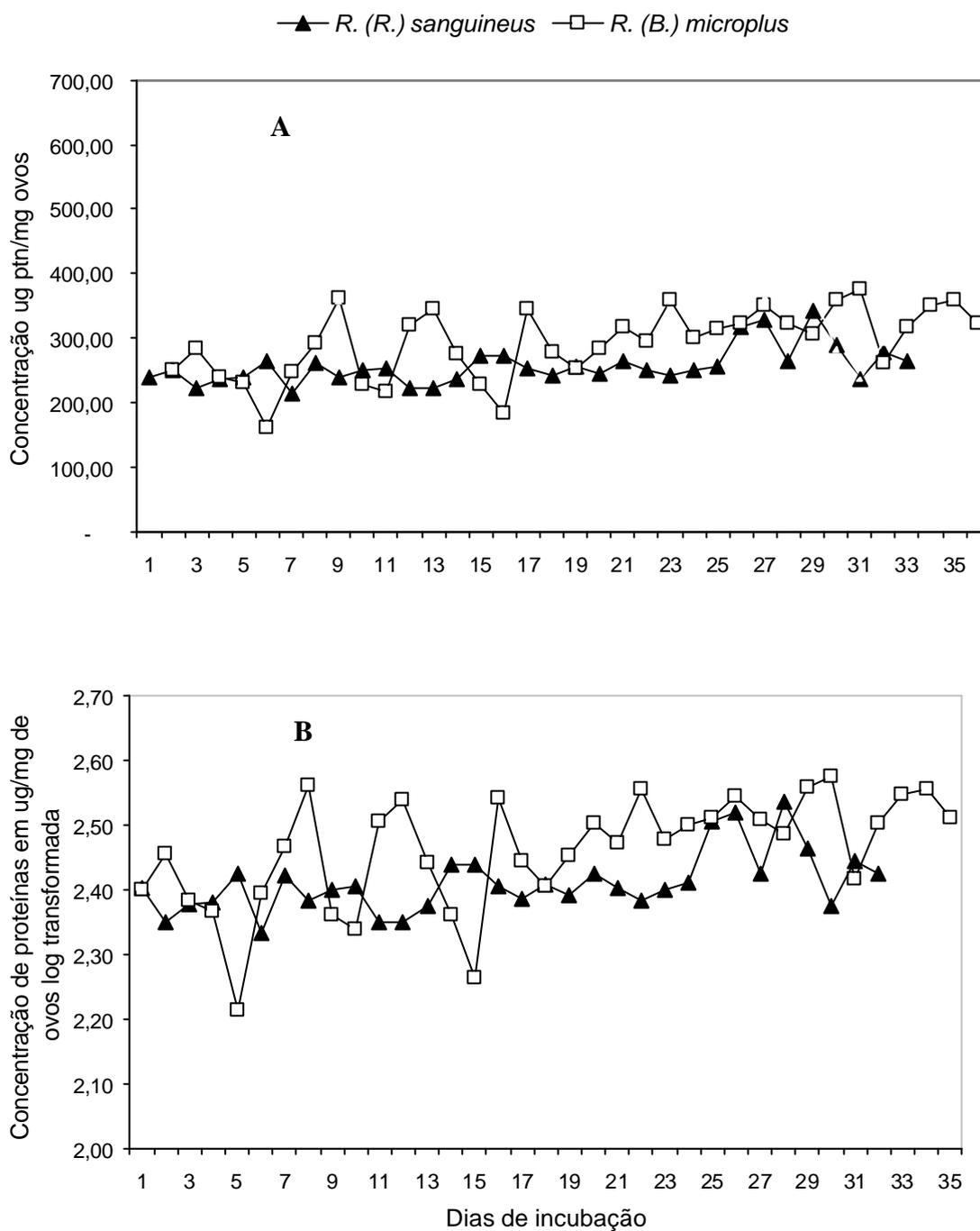


Figura 3. Concentrações protéicas em micrograma de proteína por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* por dia de incubação sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase); **A** - concentração de proteínas em $\mu\text{g}/\text{mg}$ de ovos, **B** - concentração de proteínas log transformada.

Tabela 7. Concentração das proteínas totais em micrograma por miligrama de ovos de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* por dia de incubação sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^\circ\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

DIA DE INCUBAÇÃO	CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS EM $\mu\text{g}/\text{mg}$ DE OVOS
0	240,09
1	250,64
2	222,79
3	237,14
4	239,25
5	263,72
6	213,51
7	262,45
8	240,09
9	250,22
10	252,33
11	222,37
12	221,95
13	236,29
14	273,85
15	273,42
16	253,59
17	241,78
18	254,86
19	244,31
20	264,98
21	251,06
22	240,93
23	249,37
24	255,70
25	317,73
26	329,54
27	264,56
28	343,05
29	289,88
30	263,30
31	277,22
32	263,72

4.4 Análise dos Géis de Acordo com o Dia de Postura

Nos zimogramas relativos à *R. (B.) microplus* foram evidenciadas 15 bandas protéicas cujos pesos moleculares aproximados são: 226, 160, 123, 101, 83, 74, 69, 64, 59, 56, 51, 49, 38, 36, 33 e 31 KDa (Figura 4).

As bandas de 226, 49, 38 e 36 KDa foram detectadas até o 17º dia de postura, enquanto a banda de 123 KDa foi detectada até o 20º dia de postura, a banda de 101 KDa apareceu somente nos dias mais próximos do final da postura 15, 18, 19, 20 e 21. Bandas com peso de 69, 56 e 51 KDa não foram detectadas após o 18º dia de postura e a banda de 64 KDa foi visível no gel até o 19º dia após início de postura. As bandas com 31 e 33 KDa foram detectadas até o 14º e 15º dias de postura respectivamente. As demais bandas estavam presentes em todos os dias de postura. Nota-se que durante o período de maior postura todas as bandas, com exceção da banda de 101 KDa, foram detectadas.

Em *R. (R.) sanguineus*, foram evidenciadas 11 bandas protéicas cujos pesos moleculares aproximados são: 215, 139, 112, 91, 81, 75, 65, 54, 38, 31 e 29 KDa (Figura 5). As bandas com 139 e 75 KDa estiveram presentes até o 18º dia de postura, as bandas de 112 e 54 KDa foram evidenciadas até o 17º dia de postura. A banda de 91 KDa foi detectada somente no segundo dia de oviposição, enquanto a banda de 29 KDa apareceu apenas no 14º dia de oviposição. A banda de 38 KDa, apareceu até o 17º dia de postura, sendo que nos dias quatro, cinco, seis e sete estava muito clara e não foi detectada pelo programa. As demais bandas estavam presentes em todos os dias de postura. As variações na detecção de bandas durante o período de postura das duas espécies Ixodida estudadas, podem ser características das alterações na disponibilidade das proteínas aos ovos pelas fêmeas. Uma maneira de compensar a falta de algumas proteínas nos ovos dos últimos dias de postura pode ser o aumento da disponibilidade das proteínas metabolizadas em maior quantidade pelo corpo gorduroso e consequentemente mais abundantes na hemolinfa das fêmeas em oviposição.

Estudos anteriores, como o de James e Oliver (1997), que purificaram e caracterizaram parcialmente a vitelina dos ovos de *I. scapularis*, observando que a vitelina nos ovos desta espécie possui um peso total de 480 Kda e sete sub-unidades com valores próximos aos detectados no presente experimento, enquanto James e Oliver (1999b), concluíram que a vitelina contém oito sub-unidades com pesos moleculares entre 48 e 145 KDa. Dessa forma, as bandas protéicas entre 49 e 160 KDa observadas nos zimogramas de *R. (B.) microplus* e as bandas entre 54 e 139 KDa observadas nos zimogramas de *R. (R.) sanguineus* no presente experimento, podem ser subunidades de vitelina. Observou-se que algumas das bandas protéicas que não estão presentes até o final da postura são supostamente subunidades de vitelina.

Estudos sobre a degradação das proteínas ao longo do desenvolvimento embrionário, realizados por Logullo et al. (1998), detectaram em *B. microplus* a presença de uma enzima chamada BYC, precursora de uma proteinase aspártica com função de degradar a vitelina. Esta enzima, quando analisada através de eletroforese, mostrou-se composta por duas bandas protéicas de pesos moleculares 54 e 49 KDa. Abreu et al. (2004) sugeriram que esta enzima possui peso molecular de 54 KDa, e que através da acidificação dos grânulos da gema, por volta do quarto dia de embrionamento, é convertida para um polipeptídeo de peso molecular 47 KDa, que pode ser detectado *in vivo*, durante a embriogênese. Deste modo, com base na literatura, pode-se sugerir que as bandas observadas no presente trabalho com pesos moleculares aproximados de 49 e 51 ou 56 KDa em ovos de *R. (B.) microplus*, podem ser subunidades da enzima BYC. Nos ovos de *R. (R.) sanguineus*, não foram observadas bandas com pesos moleculares próximos a 47 KDa, a banda de 54 KDa presente durante o período de postura pode ser a enzima BYC encontrada anteriormente em ovos de *B. microplus* antes do

quarto dia de embriogênese (ABREU et al., 2004), uma vez que no presente experimento a embriogênese foi interrompida no dia em que foi realizada a postura.

Seixas et al. (2003), purificaram e caracterizaram uma enzima cisteína endopeptidase degradadora de vitelina (VTDCE), dos ovos do 1º ao décimo segundo dia de oviposição de *B. microplus*. Através de SDS-PAGE, os autores sugeriram que esta enzima é um dímero de subunidades com peso de 17 e 22 KDa. Embora os autores anteriormente citados acreditem que esta é a maior enzima degradadora de vitelina nos ovos de *B. microplus*, não podemos comparar os resultados do presente experimento com os resultados do autor acima citado. Pois no atual experimento a proteína de menor peso molecular do padrão possui 32.5 KDa, inviabilizando a identificação de bandas com pesos moleculares próximos aos observados por Seixas et al. (2003).

O SDS-PAGE de extratos do corpo de larvas, ninfas e adultos parcialmente alimentados revelou cinco proteínas (68, 57, 50, 47 e 43 KDa) comuns para duas espécies diferentes de carrapatos, *H. anaticum* e *B. microplus* (GOSH; KHAN, 2000). Nas análises do perfil das proteínas no presente experimento, durante a postura em *R. (B.) microplus*, foram encontradas proteínas com pesos moleculares muito próximos as observadas por estes autores, o que não ocorreu em *R. (R.) sanguineus*, onde apenas duas proteínas dos ovos tiveram pesos moleculares próximos aqueles observados em *H. anaticum* e *B. microplus* por Gosh e Khan (2000). Sendo assim, pode-se especular que as proteínas detectadas nos extratos de *R. (B.) microplus* são proteínas da hemolinfa, disponibilizada aos ovos pelas fêmeas durante a oogênese, ou que algumas bandas de proteínas presentes nos ovos, têm a maior parte de seu conteúdo direcionados metabolicamente para a composição de estruturas em larvas, ninfas e adultos desta espécie de carrapato.

Em fêmeas de *D. variabilis*, a proteína mais abundante na hemolinfa tem um peso molecular de 270 KDa, com duas subunidades de 98 e 93 KDa (SULLIVAN et al., 1999). No presente experimento, Em *R. (B.) microplus*, não foram detectadas proteínas que pudessem estar relacionadas com este dímero observado por Sullivan et al. (1999). Em *R. (R.) sanguineus*, uma banda de 91 KDa foi detectada somente no segundo dia de oviposição e não foram observadas bandas com peso próximo a 98 KDa, não se relacionando então às proteínas dessas duas espécies de ixodídeos. Pode-se especular que cada espécie tenha seus perfis de proteínas diferenciados quando diz respeito às proteínas que não fazem parte da estrutura da vitelina.

Maya – Monteiro et al. (2000), observaram que a principal proteína da hemolinfa de *B. microplus*, HeLp (heme lipoprotein from the hemolymph), tem um peso molecular de 354 KDa e contém duas apoproteínas de 103 e 92 KDa. Através de testes, foi observado que esta proteína é responsável pelo transporte de heme da hemolinfa aos tecidos. Como no presente experimento, somente uma banda apresentou peso molecular próximo a uma das apoproteínas da HeLp, supõe-se que a HeLp está presente somente na hemolinfa de carrapatos alimentados, não sendo disponibilizada para os ovos durante a oviposição, ou somente uma das apoproteínas está presente nos ovos. Deste modo a apoproteína de peso molecular 103 KDa seria obtida através da alimentação no hospedeiro, ligando-se após repasto sanguíneo a outra apoproteína, que foi disponibilizada aos ovos e está presente no carrapato adulto.

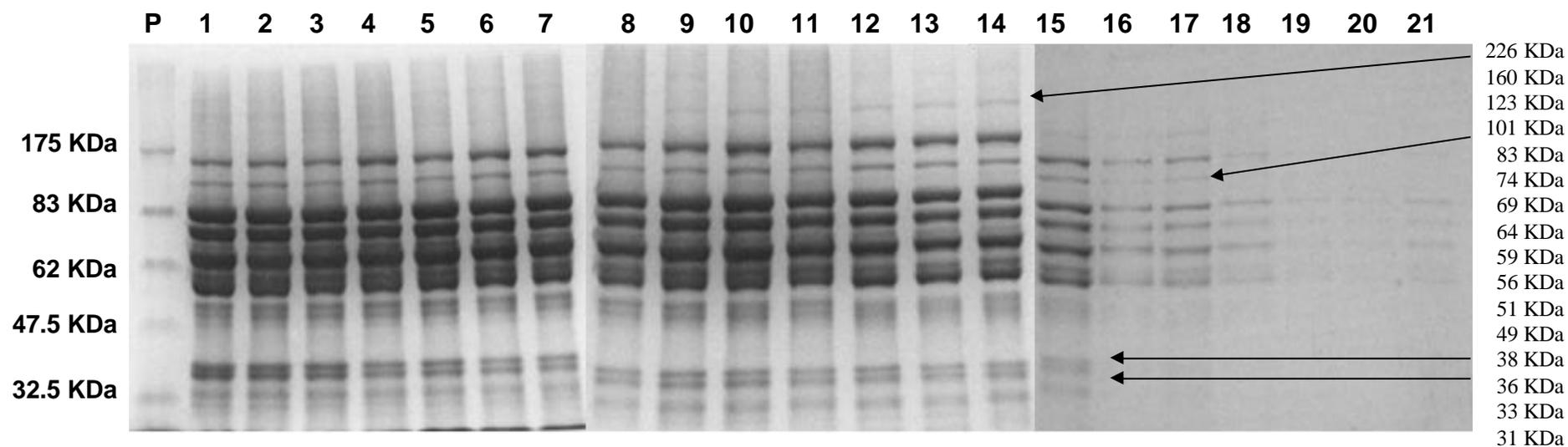


Figura 4. Zimogramas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ao longo dos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

P - Padrão de peso molecular de proteínas; **1 a 21** - Dias de postura; **32.5 a 175 KDa** - Peso das bandas do padrão de proteínas; **31 a 226 KDa** - Peso das bandas detectadas de acordo com sua posição no gel.

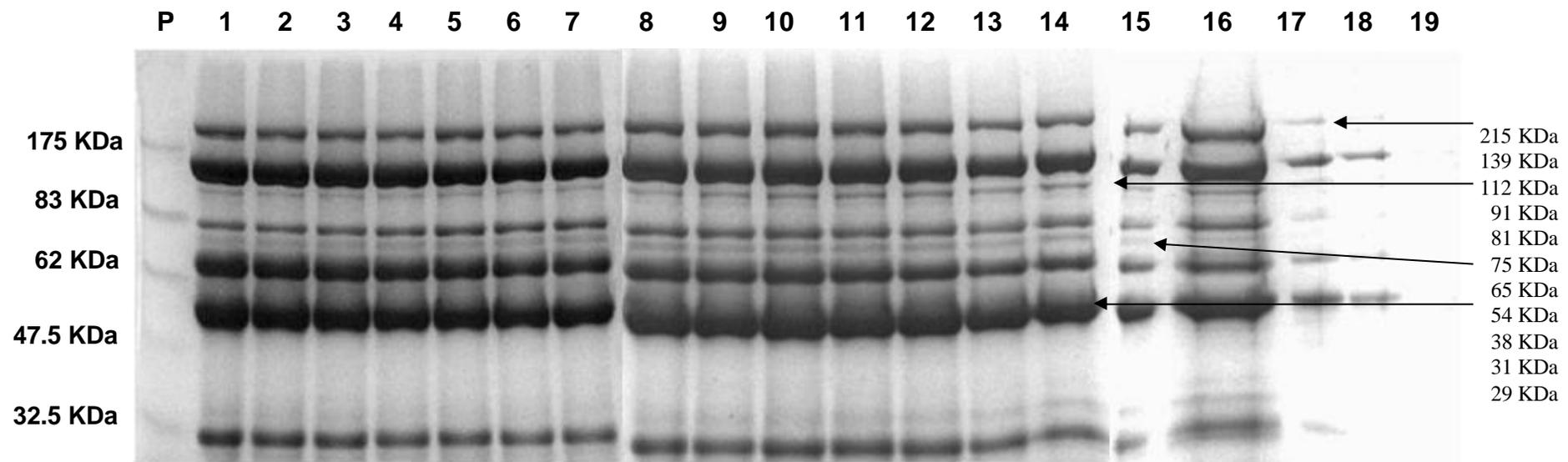


Figura 5. Zimogramas dos ovos de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* ao longo dos dias de postura sob condições controladas de laboratório ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $80\pm 5\%$ UR, escotofase).

P - Padrão do peso molecular de proteínas; **1 a 19** - Dias de postura; **32.5 a 175 KDa** - Peso das bandas do padrão de proteínas; **29 a 215 KDa** - Peso das bandas detectadas de acordo com sua posição no gel.

4.5 Análise dos Géis Durante a Embriogênese

Foram evidenciadas 13 bandas protéicas nos zimogramas relativos a *R. (B.) microplus* cujos pesos moleculares aproximados são: 146, 116, 87, 75, 63, 57, 56, 52, 51, 44, 37, 36 e 34 KDa (Figura 6). As bandas com pesos moleculares de 146, 51, 116, 57 e 63 KDa, foram detectadas até os dias de desenvolvimento 7, 10, 15, 20 e 30, respectivamente. De acordo com estas observações, pode-se sugerir que o perfil apresentado por estas bandas representa subunidades de vitelina utilizadas para nutrição do embrião. Do 25^o ao 35^o dia, uma banda de 44 KDa foi detectada nos zimogramas. De acordo com Silveira et al. (2006), esta banda de 44KDa, pode ser a enzima tirosina fosfatase, responsável pela degradação dos resíduos de tirosina da vitelina para que a mesma seja degradada por enzimas proteolíticas durante a embriogênese, não havendo explicação para o não aparecimento desta banda nos zimogramas relativos aos primeiros dias de incubação.

Em relação a *R. (R.) sanguineus*, foram evidenciadas nove bandas protéicas cujos pesos moleculares aproximados são: 243, 169, 129, 93, 82, 69, 58, 38 e 34 KDa (Figura 7). A banda de 243 KDa, somente foi visível até o décimo dia de incubação, enquanto a banda de 129 KDa se tornou substancialmente mais concentrada do sétimo dia de embrionamento em diante. Estas alterações no perfil das proteínas não podem ser comparadas com os fenômenos embriológicos registrados na literatura, ocorridos durante a incubação, pois no presente estudo, a embriogênese extrapola o período de tempo registrado necessário para a eclodibilidade larval.

Bandas com pesos moleculares de 42, 62 e 85 KDa foram observadas por Andreotti et al. (2001) em ovos de cinco dias de *B. microplus*. Além dessas bandas, os autores detectaram uma banda com peso molecular de 20 KDa não observada no presente experimento. Logullo et al. (2002) observou o aparecimento de duas bandas com pesos moleculares de 60 e 30 KDa na fase final da embriogênese de *B. microplus*. Com base na detecção dessas duas proteínas no final do período de incubação, os autores concluíram que a degradação da vitelina inicia-se imediatamente após a oviposição, e que durante o embrionamento, cerca de 40% da quantidade de vitelina original é consumida. Depois de completa a organogênese, o sistema digestivo seqüestra a gema dos ovos, levando a um aumento na taxa de degradação da vitelina. Isto ocorre principalmente durante a última semana de incubação, nesse período ocorre o que os autores consideram uma digestão *in natura*. Desta forma, as bandas protéicas de 44 KDa em *R. (B.) microplus* e 129 KDa em *R. (R.) sanguineus*, observadas no presente experimento, seriam produtos do metabolismo do embrião na fase final de incubação.

Com base em uma visão geral das observações feitas durante este estudo, podemos sugerir que as proteínas disponibilizadas pelas fêmeas aos ovos sofrem alterações durante o período de postura, com diminuição da variedade das proteínas durante este período, embora a concentração de proteínas seja maior nos ovos do final da postura. As proteínas de pesos moleculares mais baixos são encontradas somente nos primeiros dias de postura, sugerindo esgotamento destes recursos ou inabilidade da fêmea em quebrar as proteínas em moléculas menores, de melhor acesso às enzimas degradadoras de vitelina do embrião. Ainda, existe a possibilidade de algumas bandas ausentes nos últimos dias de postura serem enzimas que degradam a vitelina. Para esclarecimento dessas e de outras questões a respeito da diminuição da eclodibilidade larval relacionada aos últimos dias de postura, são necessários mais estudos das variações dos componentes dos ovos durante a oviposição. Durante a embriogênese, muitos fatores são capazes de afetar as transformações ocorridas no interior dos ovos. Por isso, mais estudos sobre as alterações moleculares desta fase do ciclo dos carrapatos são necessários para que se possam relacionar estas alterações com as etapas da embriologia dos Ixodida.

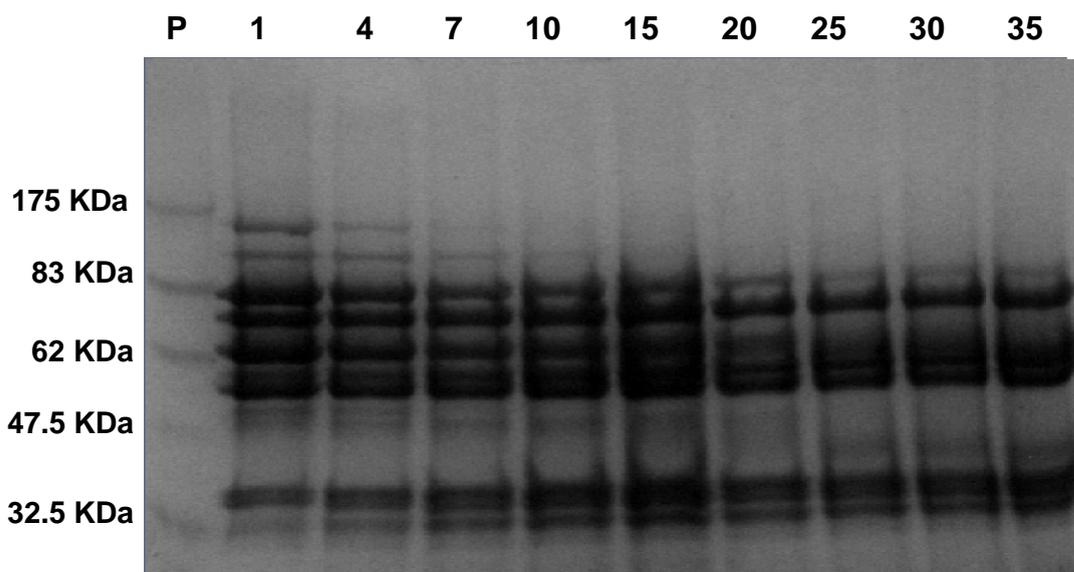


Figura 6. Zimogramas dos ovos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* durante os dias de incubação.

P - Padrão do peso molecular de proteínas; **1 a 35** - Dias de incubação; **32.5 a 175 KDa** - Peso das bandas do padrão de proteínas.

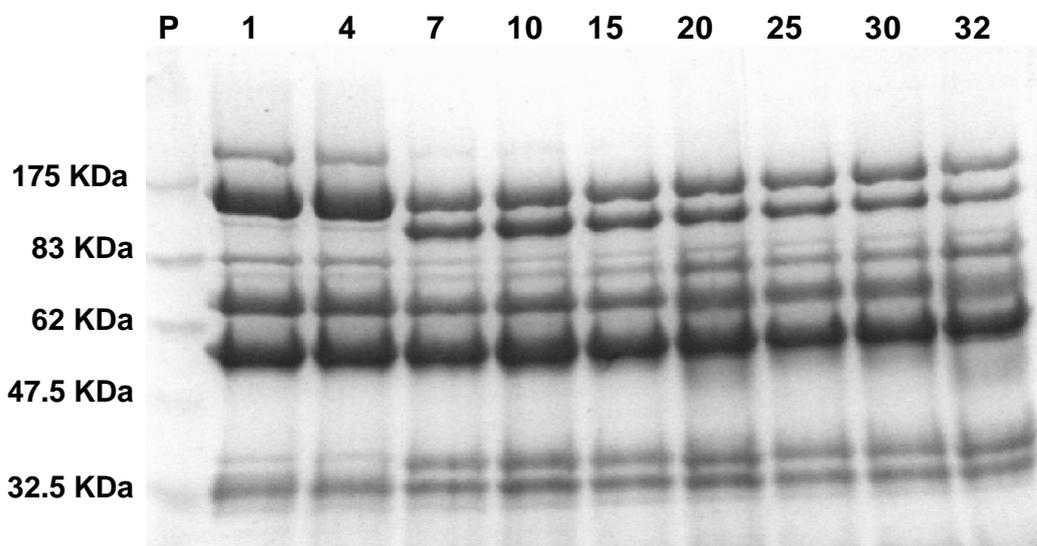


Figura 7. Zimogramas dos ovos de *Rhipicephalus (Rhipicephalus) sanguineus* durante os dias de incubação.

P - Padrão de peso molecular de proteínas; **1 a 32** - Dias de incubação; **32.5 a 175 KDa** - Peso das bandas do padrão de proteínas.

5 CONCLUSÕES

A variação na concentração das proteínas dos ovos de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* está correlacionada com os dias de postura e incubação, através do aumento na concentração de proteínas à medida que o final da postura e eclosão da larva se aproximam.

Ao longo dos dias de postura, devido a diferença nos perfis protéicos entre *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* pode-se concluir que as proteínas disponibilizadas aos ovos durante o período de postura são diferentes entre estas duas espécies.

Ao longo da embriogênese, devido ao desaparecimento e surgimento de bandas protéicas, pode-se concluir que as proteínas disponíveis para o embrião de *R. (B.) microplus* e *R. (R.) sanguineus* são biotransformadas de modo que há um perfil de degradação particular para cada espécie.

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.
- AESCHLIMANN, A. Développement embryonnaire d' *Ornithodoros moubata* (Murray) et transmission transovarienne de *Borrelia dutoni*. **Acta Tropica**, v. 15, n. 1, p. 15-64, 1958.
- AESCHLIMANN, A.; HECKER, H. Observations préliminaires sur l'ultrastructure de l'ovocyte en développement chez *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodidae : Argasidae). **Acta Tropica**, v. 24, n. 3, p. 225-243, 1967.
- AESCHLIMANN, A.; HESS, E. What is our current knowledge of acarine embryology? In: GRIFFITHS, D. A.; BOWMAN, C. E. **Acarology VI**, v. 1, p. 90-99, 1984.
- ANDREOTTI, R.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; TORQUATO, R. J. S.; GOMES, A.; TANAKA, A. S. Serine proteinase inhibitors from eggs and larvae of tick *Boophilus microplus*: purification and biochemical characterization. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 5, p. 337-343, 2001.
- ARAMAN, S. F. Protein digestion and synthesis in ixodid females. In: J. G. R. RODRIGUEZ. **Recent Advances in Acarology**, ed. Academic Press: New York, pp. 385-395, 1979.
- AYRES, M.; AYRES Jr., M.; AYRES, D. L. Bioestat 4.0, 2005. Disponível em: <[http ; //www.mamiraua.org.br/](http://www.mamiraua.org.br/)>. Acesso em: 30 jan. 2007, 14:41:12.
- 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.
- BASSAL, T. T. M.; HEFNAWY, T. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodidae). The effect on unfed female weight on feeding and oviposition of *Hyalomma (H.) dromedarii* Koch (Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 58, p. 984-988, 1972.
- 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. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarida: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.
- BOCTOR, F. N.; KAMEL, M. Y. Purification and characterization of two lipovitellins from eggs of the tick *Dermacentor andersoni*. **Insect Biochemistry**, v. 6, p. 233-240, 1976.
- 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.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREMNER, K. C. Studies on "Haemixodovin", the pigment in the eggs of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acarina : Ixodidae). **Australian Journal of Biological Sciences**, n.12, p. 263-273, 1959.

BRINTON, L. P.; OLIVER, J. H. Jr. Fine structure of oognialand oocyte development in *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 57, p. 720-747, 1971.

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.

CANÇADO, P. H. D. Efeito de Diferentes Agregações sobre os Processos de Muda para Ninfas e para Adultos de Duas Espécies de Ixodídeos em Condições Laboratoriais. Dissertação de Mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Brasil. 25p., 2004.

CARVALHO, F. E. S. Efeito da Umidade Relativa na Embriogênese da *Amblyomma cajenense*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Boophilus microplus* e *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae). Dissertação de Mestrado do curso de Pós-graduação em Ciências Veterinárias – Parasitologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Seropédica, RJ. Brasil. 43p., 2005.

CHINZEI, Y.; CHINO, H.; TAKAHASHI, K. Purification and properties of vitellogenin and vitellin from a tick, *Ornithodoros moubata*. **Journal of Comparative Physiology**, v. 152, n. 2, p. 13-21, 1983.

CHINZEI, Y. YANO, I. Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick. **Experientia**. n. 41, p. 948-950, 1985.

DIEHL, P. A. Haemolymphproteine und vitellogenese bei *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea: Argasidae). **Bulletin De La Societe Entomologique Suisse**, v. 42, p. 117-125, 1969.

DIEHL, P. A. Zur oogenese bei *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea: Argasidae) unter besonderer Berücksichtigung der vitellogenese. **Acta Tropica**, v. 27, p. 302-355, 1970.

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.

FAGOTTO, F.; HESS, E.; AESCHLIMANN, A. The early embryonic development of the Argasid tick *Ornithodoros moubata* (Acarina: Ixodoidea: Argasidae). **Entomologia Generalis**, v. 13, n. 1-2, p. 001-008, 1988.

GALLARDO, J. S. V.; MORALES, J. S. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. **Bioagro**, v. 11, n. 3, p. 77-87, 1999.

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.

GOSH, S.; KAHN, M. H.. Sharing of common proteins by the stages of the tick, *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Boophilus microplus*. **Indian Animal Sciences**, n. 70, p. 19-21, 2000,

GUDDERRA, N. P.; SONENSHINE, D. E.; APPERSON, C. S.; ROE, R. M. Hemolymph proteins in ticks. **Journal of Insect Physiology**, v. 48, p. 269-278, 2002.

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

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) (Tics, Ixodoidea : Ixodidae). **Acarologia**, v. 22, n. 2, p.133-143, 1981.

JAMES, A. M.; OLIVER, J. H. Vitellogenin concentrations in the hemolymph and ovaries of *Ixodes scapularis* ticks during vitellogenesis. **Experimental and Applied Acarology**, v. 20, n. 11, p. 639-647, 1996.

JAMES, A. M.; OLIVER, J. H. Purification and partial characterization of vitellin from the black-legged tick, *Ixodes scapularis*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 27, n. 7, p. 639-649, 1997.

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

JAMES, A. M.; OLIVER, J. H. Vitellogenesis and its hormonal regulation in ixodida: preliminary result. In : NEEDHAM, G. R., MITCHEL, R., HORN, D. J., WELBOURN, W. C. (Eds), *Acarology IX*, v. 2, Symposia, July 17-22. 1994. **Ohio Biological Survey**, Columbus, Ohio. pp. 471-476, 1999b.

JENNI, L. Synthese und Aunahme von Proteiinen während der Vitellogenese in Ovocyten von *Ornithodoros moubata*, Murray (Ixodoidea: Argasidae). **Acta Tropica**, v, 28, p. 105-163, 1971.

KITAOKA, S. Phydiological and ecological studies on some ticks. IV Rate of digestion of blood meal and nitrogen, iron, and sterol economy during the ovipositing process in the tick. **National Institute of Animal Health Quarterly (Tokyo)**, n.1, p. 105-112, 1961.

KOPACEK, P.; WEISE, C.; SARAVANAN, T.; VITOVA, K; GRUBHOFFER, L. Characterization of an α -macroglobulin-like glycoprotein isolated from the plasma of the soft tick *Ornithodoros moubata*. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 2, p. 465-475, 2000.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of the structural proteins during the assemblage of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 7, p. 680-685, 1970.

LEES, A. D.; BEAMENT, J. W. L. An egg waxing organ in ticks. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v. 89, n. 2, p. 291-332, 1948.

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.; MORAES, J.; VAZ, I. S.; MASUDA, A. Binding and storage of heme by vitellin from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, n. 12, p. 1805 – 1811, 2002.

LONDT, J. M. L. Oviposition and incubation in *Boophilus decoloratus* (Koch, 1844) (Acarina: Ixodidae). **Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, v. 44, n. 1, p. 13-20, 1977.

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.

MAYA-MONTEIRO, C. M.; DAFFRE, S.; LOGULLO, C.; LARA, F. A.; ALVES, E. W.; CAPURRO, M. L.; ZINGALI, R.; ALMEIDA, I. C.; OLIVEIRA, P. L. Help, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 47, p. 36584-36589, 2000.

MORAES, F. R.; SILVA, V. M. S.; MORAES, J. R. E.; FREITAS, J. C. M.; ROCHA, U. F. Ecologia de carrapatos. XX. Influência do abaixamento brusco da temperatura, e de sua manutenção por cinco dias, sobre o desenvolvimento embrionário e eclosão larval de *Boophilus microplus* (Canestrini). **Ars Veterinária**, v. 3, n. 1, p. 89-95, 1987.

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

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

RAIKHEL, A. S. Vitellogenesis in mosquitoes. **Advances in Disease Vector Research** n. 9, p. 1-39, 1992.

RICK, R. F. Studies on the reactions of animals to infestation with ticks. IV. The Protein components of ticks extracts. **Australian Journal of Agricultural Research**, n. 10, p. 6604-613, 1959.

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, 1991.

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.

SAUER, J. R.; HAIR, J. A. Water balance in the lone star tick (Acarina: Ixodidae): the effects of relative humidity and temperature on weight changes and total water content. **Journal of Medical Entomology**, v. 8, n. 5, p. 479-485, 1971.

SAPPINGTON, T. W.; HAYS, A. R., RAIKHEL, A. S. Mosquito vitellogenin receptor: purification, developmental and biochemical characterization. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 25, n. 7, p. 807-817, 1995.

SCHIRIFER, M. E. Vitellogenesis in *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae): a model for analysis of endocrine regulation in ixodid ticks. Ph. D. dissertation. Old Dominion University. Norfolk, Virginia. USA. 1991.

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.

SHIRAIISHI, S.; YANO, Y.; UCHIDA, T. A. Embryogenesis in cattle tick, *Haemaphysalis longicornis*. **Journal of the Faculty of Agriculture, Kyushu University**, v. 34, n. 3, p. 265-272, 1990.

SILVEIRA, A. B.; SANTOS, J. C.; SENNA, R.; LOGULLO, C.; FIALHO, E.; NETO, M. A. C. S. Tick vitellin is dephosphorylated by a protein tyrosine phosphatase during egg development: Effect of dephosphorylation on VT proteolysis. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 3, p. 200-209, 2006.

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.

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

STREY, O. F.; TEEL, P. D.; LONGNECKER, M. T.; NEEDHAM, G. R. Survival and water-balance characteristics of unfed adult *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 63-73, 1996.

SULLIVAN, C. D.; ROSELL, R. C.; COONS, L. B.; Partial characterization of vitellogenin from the ixodid *Dermacentor variabilis*: Preliminary results. In: NEEDHAN, G. R.; MITCHEL, R., HORN, D.J.; WELBOURN, W.C. (Eds.), *Acarology IX, volume 2, Symposia, July 17-22, 1994. Ohio Biological Sourvey, Columbus, Ohio.* pp.477-480, 1999.

SUTHERST, R. W.; BOURNE, A. S.; SUTHERLAND, I. D. Production and survival of eggs of the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae) in the wet and dry tropics of north Queensland. **Australian Journal of Entomology**, v. 38, n. 4, p. 340-347, 1999.

TATCHELL, R. J. Eletrophoretic studies on the proteins of the hemolymph, saliva, and eggs of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Insect Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 47-55, 1971.

TAYLOR, D.; CHINZEL,Y. Vitellogenim and its syntesis in the soft ticks. In: HALLIDAY, R. B.; WALTER, D. E.; PROCTOR, H. C.; NORTON, R. A. COLLOFF, M. J. **Acarology: Proceedings of the 10th International Congress, Canberra, Australia, july 5-10, 1998.** ed. CSIRO publishing: Collingwood, Australia. p. 622-627, 2001.

WANG, H.; NUTTALL, P.A. Comparison of the proteins in salivary glands, saliva and hemolymph of *Rhipicephalus appendiculatus* female ticks during feeding. **Parasitology**, v. 109, n. 6, p. 517-523, 1994.

WIGGLESWORTH, V. B. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (hemiptera) and other bloodsucking arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B:Biological Sciences**, v. 131, p. 313-339, 1943.

ANEXOS

Anexo A – Fórmula do tampão fosfato pH 7,4.

Anexo B – Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado.

Anexo C – Fórmula do tampão de amostra cinco vezes concentrado.

Anexo D – Fórmula do “Staking” gel 5%.

Anexo E – Fórmula do “Resolving” gel 10%.

Anexo A – Fórmula do tampão fosfato pH 7,4.

Fosfato de Sódio Monobásico, Monohidratado ($\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{H}_2\text{O}$).....	7,8g
Fosfato de Sódio Dibásico, Heptahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....	38,6g
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).....	2,0g
H ₂ O deionizada.....	q.s.p 1000ml

Anexo B – Fórmula do tampão de lise duas vezes concentrado.

Trishydroxymethylaminomethane (TRIS).....	1,21g
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA).....	0,372g
Nonidet P-40.....	4,0ml
N-tosyl-L-lysine-chloromethylketone (TLCK).....	2,0ml
Phenylmethanesulphonyl fluoride (PMSF).....	2,0ml
H ₂ O destilada.....	q.s.p 200ml

Anexo C – Fórmula do tampão de amostra cinco vezes concentrado.

Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) 2M pH 6,8.....	700µl
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS).....	0,5g
H ₂ O destilada.....	480µl
Glicerol.....	2,5ml

Aquecer até quase ferver e depois acrescentar:

2-Mercaptoetanol.....	1,25ml
Azul de Bromofenol.....	0,5mg

Anexo D – Fórmula do “Staking” gel 5%.

H ₂ O destilada.....	4,0ml
Acrilamida 30%.....	3,3ml
Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) 1,5 M pH 8,8.....	2,5ml
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%.....	0,1ml
Ammonium persulfate (APS) 10%.....	0,1ml
N, N, N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED).....	0,004ml

Anexo E – Fórmula do “Resolving” gel 10%.

H ₂ O destilada.....	4,1ml
Acrilamida 30%.....	1,0ml
Trishydroxymethylaminomethane (TRIS) 1,0 M pH 6,8.....	0,75ml
Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) 10%.....	0,06ml
Ammonium persulfate (APS) 10%.....	0,06ml
N, N, N'- Tetramethylethylenediamine (TEMED).....	0,006ml