



Endocrinologia e controle da vitelogenese em carrapatos*

Endocrinology and control of tick vitellogenesis

Adriana Seixas^{1,2}, Daiane Patricia Oldiges^{2,3}, Itabajara da Silva Vaz Jr.^{1,2,4} & Carlos Termignoni^{1,2,5}

ABSTRACT

Background: Ticks are distributed worldwide, with impacts on human and animal health. The cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is the main parasite that affects livestock in tropical and subtropical regions of the world, causing large economical losses. Tick control methods are based on the application of chemical acaricides, which has resulted in selection of resistant ticks and a potential risk of environmental pollution and food contamination. Vaccines have showed to be a feasible tick control method that offers a cost-effective, environmental friendly alternative to chemical control. However, more than ten years after the commercialization of the first vaccine against ticks, the identification of tick-protective antigens remains a limiting step in the development of an efficient formulation that would avoid the use of chemical acaricides. So, the study of parasite biology and understanding physiological mechanisms could be a good strategy to find new targets for an efficient vaccine.

Review: It was reviewed the main insights about the reproductive process in ticks, emphasizing the hormonal control of vitellogenesis and enzymes involved in vitellin processing during embryogenesis. The processes of vitellogenesis and embryogenesis have been studied in various organisms, particularly in cockroaches, flies and ticks. Although the roles of 20-hydroxyecdysone (20E) and juvenile hormone have been well characterized for vitellogenesis in insects, we know much less about the hormonal control of vitellogenesis in ticks. Initially, it was hypothesized that juvenile hormone was involved in tick vitellogenin-synthesis. However, more critical studies uncovered no evidence for the occurrence of juvenile hormone or juvenile hormone-like molecules in several tick species. Current research shows that in ticks, it appears that ecdysteroids, and not juvenile hormone, regulate the expression of the vitellogenin gene and the synthesis and release of vitellogenin protein into the hemolymph. In general, the carbohydrate, lipid and amino acid composition of tick vitellogenin is similar to that of insect vitellogenin. Once in the hemolymph, oocytes uptake vitellogenin through receptor-mediated endocytosis. However, there are different strategies to control vitellogenin synthesis and uptake by ovary in ixodid ticks. In the oocytes, vitellogenin is partially processed in the endosomal compartment and then stored as vitellin, the main reserve of protein for embryo development, in specialized organelles, the yolk granules. Embryo development depends on the availability of yolk material stored into oocytes. So, the characterization of molecules involved in vitellogenesis and embryo development contribute to a better understanding of the tick parasite physiology. During embryogenesis, acidic enzymes are responsible for the availability of this material and embryo nutrition. The Vitellin-Degrading Cysteine Endopeptidase (VTDCE), *Boophilus* Yolk Pro-Cathepsin (BYC) and Tick Heme Binding Aspartic Proteinase (THAP) are enzymes involved in vitellin hydrolysis in *R. microplus* eggs. These enzymes are produced by gut and fat body and transported through the hemolymph to be internalized into the oocytes and then play their role in tick embryo nutrition. As VTDCE, BYC and THAP are involved in an important physiological process, their potential as targets in an anti-tick vaccine is an attractive research topic. With this objective, various enzymes have been tested in native or recombinant forms as candidate immunogens to a multiantigenic anti-tick vaccine.

Conclusion: Significant advancements have been made in recent years on understanding the tick reproductive process, and some molecules that can be possible targets for development of new tick control strategies have been characterized.

Keywords: tick, vitellogenesis, embryogenesis, hormones, enzymes.

Descritores: carrapato, vitelogenese, embriogenese, hormônios, enzimas.

Received: September 2009

www.ufrgs.br/actavet

Accepted: November 2009

*Trabalho realizado com apoio financeiro do PRONEX, FAPERGS, CAPES, CNPq e INCT- Entomologia Molecular. ¹Centro de Biotecnologia do Estado do Rio Grande do Sul (CBIOT), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Av. Bento Gonçalves n. 9500, Prédio 43421, Campus do Vale, Cx.P. 15005, Bairro Agronomia, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil. ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular – INCT-EM, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. ³Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Porto Alegre, Brasil. ⁴Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. ⁵Departamento de Bioquímica, UFRGS, Porto Alegre, Brasil. CORRESPONDÊNCIA: A. Seixas [adriana@cbiot.ufrgs.br – Fax: + 55 (51) 3308-7309].

I. INTRODUÇÃO

II. VITELOGÊNESE

III. OÓGENESE

IV. RECEPTORES DE VITELOGENINA NO OVÁRIO

V. CONTROLE HORMONAL DA VITELOGÊNESE EM CARRAPATOS

1. Papel dos hormônios ecdisteríodes e do hormônio juvenil
2. Sistema neuroendócrino

VI. FATORES QUE REGULAM A REPRODUÇÃO EM CARRAPATOS

1. Fator capacitor de esperma (SCF)
2. Fator estimulador de vitelogênese (VSF)
3. Fator masculino (MF)
4. Fator de ingurgitamento (EF)
5. Fator indutor de vitelogênese (VIF)
6. Fator estimulador do corpo gorduroso (FSF)

VII. PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA REPRODUÇÃO DE ARTRÓPODES

VIII. EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO HEMATÓFAGA NOS CARRAPATOS

IX. A UTILIZAÇÃO DO VITELO NA EMBRIOGÊNESE

X. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE VT EM *R. MICROPLUS*

1. BYC

2. THAP

3. VTDCE

4. RmLCE

XI. CONCLUSÃO

XII. REFERÊNCIAS

I. INTRODUÇÃO

Carrapatos são ácaros hematófagos encontrados em todas as regiões terrestres do planeta [99]. Estes parasitos constituem importantes vetores de doenças humanas e animais. Por sua grande importância biomédica e econômica, os carrapatos são objeto de muitos estudos científicos [78]. Impulsionadas pela descoberta da transmissão de doenças por carrapatos como a “Texas cattle fever” e a “Rocky Mountain spotted fever” [99], numerosas investigações passaram a reportar detalhes da sistemática, morfologia e ecologia destes parasitos. Nas últimas décadas do século 20, em particular, foram muitos os relatos descrevendo os fundamentos da genética, ultraestrutura, fisiologia e bioquímica dos carrapatos.

Estudos recentes sobre taxonomia de carrapatos [42] mostraram que 80% dos carrapatos do mundo pertence à família Ixodidae (carrapatos duros; 683 espécies) e, com exceção de uma espécie da família Nuttalliellidae, o restante pertence à família

Argasidae (carrapatos moles; 183 espécies). Os Argasidae estão divididos em quatro gêneros: *Argas* (140 espécies), *Carios* (4 espécies), *Ornithodoros* (90 espécies) e *Otobius* (2 espécies).

Os Ixodidae são divididos em dois grandes grupos, Prostriata e Metastriata. Prostriata contém somente o gênero *Ixodes* com 250 espécies; todos os demais carrapatos Ixodidae são classificados como Metastriata. Os mais importantes carrapatos Metastriatas encontram-se nos gêneros *Amblyomma* (100 espécies), *Dermacentor* (31 espécies), *Haemaphysalis* (150 espécies), *Hyalomma* (21 espécies), *Rhipicephalus* (68 espécies). Em 2003, foi proposto que as cinco espécies do gênero *Boophilus* fossem agrupadas ao gênero *Rhipicephalus* por apresentarem características filogenéticas muito relacionadas, sendo considerados gêneros monofiléticos [69, 42]. Estes autores sugerem que *Boophilus* seja mantido como subgênero de *Rhipicephalus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*). Entretanto, alguns pesquisadores con-

tinuam mantendo a distinção, já que os carrapatos do gênero *Boophilus* estão entre os mais conhecidos do mundo.

O *Rhipicephalus microplus* é uma espécie originária do sudeste da Ásia, que se disseminou para todas as regiões tropicais e subtropicais não desérticas do globo, sendo encontrado na Oceania, leste e sul da África, Américas do Norte, Central e do Sul. Esta espécie tem uma grande importância econômica na pecuária bovina, pois além de causar significativa expoliação que resulta na diminuição da produção de carne e leite, depreciação do couro do hospedeiro, é vetor dos agentes causadores da tristeza parasitária bovina (*Babesia bovis*, *Babesia bigemia*, *Anaplasma marginale*) [67].

Os carrapatos têm se tornado um problema cada vez mais grave, visto que o uso indiscriminado de produtos químicos tem levado, cada vez mais, ao desenvolvimento de populações resistentes [88]. Visando a desenvolver novos métodos de controle que sejam eficazes contra esses parasitos, aspectos moleculares e bioquímicos dos carrapatos têm sido alvo de investigação [78]. Os avanços recentes no entendimento do processo reprodutivo dos carrapatos (Acari: Ixodida) são significativos [25,86]. Estes estudos incluem avanços no entendimento da biologia molecular das vitelogeninas (Vg), a proteína precursora do principal nutriente para o desenvolvimento dos artrópodes denominada vitelina (Vt). São investigados seus sítios de síntese e papel no sequestro de heme, assim como a caracterização dos receptores de Vg no ovário [67,104]. Também foram realizados estudos para caracterizar o hormônio juvenil e ecdisteróides em carrapatos, estudar a regulação da reprodução das fêmeas por hormônios peptídicos e determinar o mecanismo de regulação hormonal da síntese de Vg. Enzimas, normalmente proteases acídicas, envolvidas na disponibilização desta proteína de reserva para os embriões em desenvolvimento têm sido descritas [57,95,101].

No presente artigo, analisamos dados da literatura a fim de oferecer uma revisão geral dos processos de vitelogenese e embriogenese em carrapatos, com enfoque no controle hormonal.

II. VITELOGÊNESE

O termo vitelogenese é normalmente usado para descrever tanto a síntese de Vg como a capta-

ção desta proteína pelos oócitos. Em carrapatos, como na maioria dos artrópodes, a síntese de Vg ocorre em maior parte fora do ovário. Nos ovários, são as células foliculares, as quais circundam os oócitos, as responsáveis pela síntese de Vg [73]. Outros sítios de síntese de Vg nos carrapatos são o corpo gorduroso Argaside [12] e o intestino em carrapatos Ixodide [87]. Depois de sintetizada, a Vg é liberada na hemolinfa para posterior captação pelos ovários, via receptor específico. Nos oócitos a Vg é acumulada na forma de grânulos de vitelo. Uma vez incorporada nos grânulos, esta proteína é referida como Vt [24].

III. OOGÊNESE

A oogênese de carrapatos está dividida em 5 estágios distintos, segundo Balashov [4]. Oócitos primários, estágio I de Balashov, estão no período de pré-vitelogenese inicial (baixo crescimento do citoplasma). Este estágio ocorre em ninfas alimentadas. Neste período, o volume dos oócitos aumenta pouco. Após o início da alimentação hematófaga da fêmea adulta, os oócitos entram no estágio II, pré-vitelogenese tardia, fase de grande aumento do citoplasma e do núcleo, resultando na exposição dos oócitos na hemolinfa. No final deste estágio, o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi estão bastante desenvolvidos e o oócito contém várias mitocôndrias. A membrana celular neste estágio possui microvilosidades.

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

A classificação proposta por Balashov [4] é aceita até hoje para caracterizar o desenvolvimento de oócitos individuais. Entretanto, uma classificação mais abrangente, que compreenda as características do ovário num todo, faz-se necessária uma vez que,

em ovários de carrapato, o desenvolvimento não é uniforme. Assim que a captação de Vg tem início, oócitos de diferentes estágios de desenvolvimento são processados simultaneamente e assincronicamente, fazendo com que oócitos em todos os estágios de desenvolvimento sejam encontrados ao mesmo tempo no ovário. Por este motivo, um novo sistema foi proposto para classificar o desenvolvimento dos ovários [94]. Este novo sistema está claramente baseado no sistema de Balashov e denomina-se “Fase de Crescimento Ovariano” (ou “Ovarian Grow Phase – OGP”; Figura 1). Este sistema, com graduação de OGP 1 à OGP 5, leva em consideração tanto o grau de desenvolvimento dos oócitos quanto o tamanho e características do ovário.

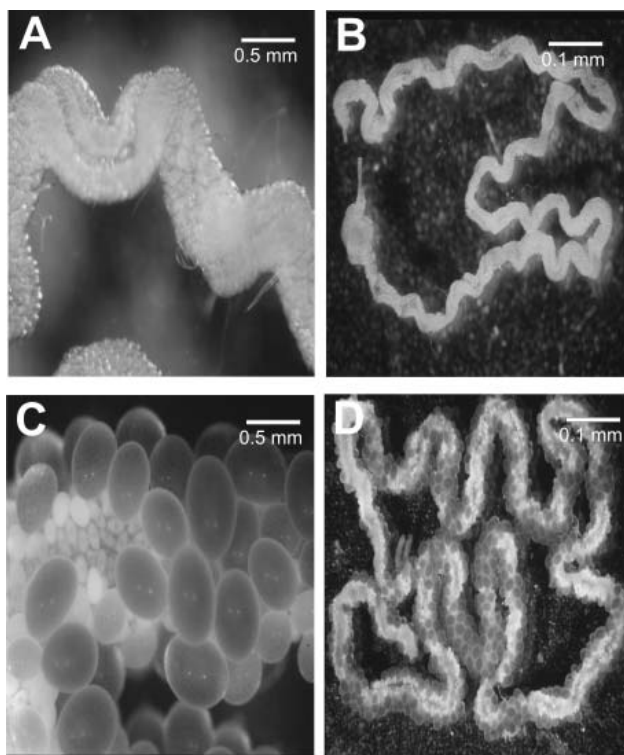


Figura 1. Fase de Crescimento Ovariano em *Amblyomma hebraeum*. Imagem de dois dos quatro estágios. Detalhe (A) e vista geral (B) do OGP 1 – ovário cristalino com oócitos pouco desenvolvidos. Detalhe (C) e vista geral (D) do OGP 4 – ovário, ainda não fecundado, já apresentando oócitos grandes e cheios de vitelo armazenado em grânulos definidos (coloração marrom característica).

IV. OS RECEPTORES DE VG NO OVÁRIO

A captação da Vg pelos oócitos ocorre por um processo de endocitose mediada por receptor [82, 91]. A presença de um receptor específico de Vg (VgR) na membrana dos oócitos foi demonstrada em

diferentes espécies, incluindo vertebrados e invertebrados. Os VgRs descritos para nematódeos, insetos, peixes, sapos e pássaros são homólogos e pertencem à mesma superfamília de receptores de lipoproteínas LDLR (“Low density lipoprotein receptors”). A análise das sequências de aminoácidos dos VgRs conhecidos tem revelado que estes receptores possuem cinco regiões distintas bem conservadas: 1) domínio de ligação; 2) domínio similar ao domínio do fator de crescimento epitelial (EGF-like); 3) elemento ligador de cálcio (YWTD; tirosina-triptofano-treonina-ácido aspártico) juntamente com o domínio LDLR_B forma um domínio b; 4) domínio ancorador transmembrana e 5) domínio citoplasmático, contendo no mínimo uma cópia da sequência de aminoácidos NPXY (asparagina-prolina-aminoácido qualquer-tirosina), a qual está envolvida na internalização de proteínas via vesículas cobertas de clatrina.

Em insetos, VgRs foram caracterizados na mosca *Drosophila melanogaster* [92], no mosquito *Aedes aegypti* [91], na formiga *Solenopsis invicta* [9] e nas baratas *Blatella germanica*, *Leucophea maderae* e *Periplaneta americana* [105], entre outros. Em carrapatos, este tipo de receptor foi caracterizado molecularmente apenas em *Dermacentor variabilis* [67] (GenBank número de acesso DQ 103506.4) e *Haemaphysalis longicornis* [5] (GenBank número de acesso AB299015). Em *A. hebraeum*, Friesen e Kaufman [36] mostraram a presença de uma proteína ligadora de Vt em ovários de fêmeas, possivelmente o VgR desta espécie. No entanto, a sequência desta proteína ainda não foi determinada.

O mRNA do VgR de *D. variabilis* possui 5673 pb que codificam para uma proteína com 1798 aminoácidos (aa). Após a remoção do peptídeo sinal de 20 aa, a proteína madura tem uma massa molecular predita de 196,6 kDa. Esta molécula possui alta similaridade com VgRs de *Periplaneta americana*, *Leucophea maderae*, *Blatella germanica* e *Aedes aegypti*. Comparando os domínios funcionais, o motivo LDLR_A mostrou-se o mais conservado, seguido pelo domínio EGF-like e o LDLR_B, que ocorrem em posições similares nos demais organismos estudados. A expressão do VgR nesse carrapato é estágio, sexo e tecido específicos, estando presente em ovários de fêmeas maduras e ausente em fêmeas virgens e machos. A expressão do VgR é essencial para que ocorra captação de Vg e desenvolvimento dos ovos nesta espécie [67].

Em *H. longicornis*, por análise do cDNA, foi verificado que a HIVgR possui 1782 aminoácidos. À semelhança dos VgRs de insetos, essa proteína possui dois domínios com quatro repetições ricas em cisteína (repetições tipo classe A) no primeiro domínio e oito no segundo domínio. O mRNA de VgR está presente durante todo o desenvolvimento do ovário, sendo que o nível mais alto de transcrição ocorre no período pré-vitelogênico. HIVgR é uma proteína de 197 kDa, transmembrana que se localiza na superfície externa dos oócitos. Fêmeas que tiveram a expressão deste receptor silenciada por RNA de interferência (iRNA) não apresentaram desenvolvimento normal dos oócitos e realizaram a postura de ovos anômalos [5]. O silenciamento do HIVgR também parece afetar a transmissão de *Babesia sp.* Em oócitos de fêmeas de carrapato injetadas com VgR-RNAi e alimentadas em hospedeiros infectados com *Babesia gibsoni*, não foi possível detectar DNA de *Babesia*, diferentemente daquelas do grupo controle, injetadas com solução salina [6].

V. CONTROLE HORMONAL DA VITELOGÊNESE EM CARRAPATOS

1. Papel dos hormônios juvenis e ecdisteróides

Os sistemas hormonais de insetos e crustáceos são os mais bem compreendidos dentre os artrópodes [106]. Em outras classes de artrópodes, as informações sobre identificação e significância funcional dos hormônios são fragmentadas ou não existentes [84]. No entanto, avanços significativos têm sido feitos para entender a regulação endócrina da reprodução em carrapatos [8,86].

Em insetos, a síntese de Vg é controlada por hormônios juvenis (JHs) e ecdiesteróides [73], (Figura 2). JHs são terpenóides derivados do ácido farnesóico. Cinco formas estruturalmente relacionadas foram identificadas em insetos: JH-0, JH-I, JH-II, JH-III e 4-metil JH-I. Os ecdiesteróides, por sua vez, são derivados de esteróis, 20-hidroxiecdisona (20E) e seu pró-hormônio, ecdisona, são as formas mais comuns em insetos e outros artrópodes, sendo que mais de 60 ecdiesteróides foram identificados em artrópodes [73]. Em dípteros, 20E estimula a síntese e a liberação de Vg na hemolinfa [73]. Na maioria dos outros insetos, o JH, liberado dos *corpora allata*, é o responsável por este estímulo.

Outro papel importante do JH em insetos é estimular o processo de patência. Neste processo, o JH atua nas células foliculares que circundam os oócitos em desenvolvimento, estimulando enzimas do tipo Na/K-ATPase. Pela ação destas enzimas é gerada perda de fluido e conseqüente redução do tamanho destas células [20,52]. A redução de tamanho das células foliculares ocasiona a formação de espaços entre elas, possibilitando que a Vg tenha acesso aos oócitos.

O desenvolvimento de ovos normais de mosquito necessita que os ovários de mosquitos que recém sofreram muda sejam expostos ao JH. O JH faz com que os oócitos se tornem competentes para iniciar a captação do vitelo, estimulando os seguintes processos: 1 – patência do epitélio folicular, 2 – indução de um estado quiescente nos folículos primários em preparação para a vitelogênese e 3 – diferenciação da maquinaria celular relacionada à síntese protéica e endocitose [53]. No entanto, muito menos é conhecido sobre o controle da vitelogênese em outros artrópodes.

Comprovar a presença do hormônio JH em carrapatos permanece um desafio. O produto de uma extração feita com hexano, do corpo inteiro do carrapato *R. microplus*, é capaz de inibir a muda do besouro *Tenebrio molitor* e a oviposição do carrapato *O. moubata*, sugerindo a presença de um composto similar ao JH [17]. No entanto, a presença de JH ou moléculas relacionadas não foi detectada, mesmo quando foram usadas técnicas bastante sensíveis, tais

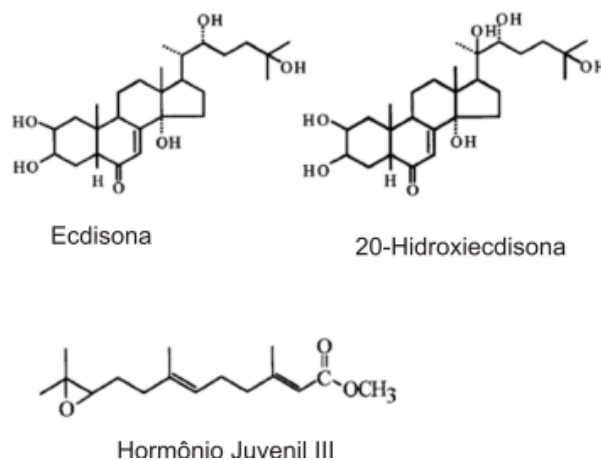


Figura 2. Estrutura química dos hormônios ecdiesteróides (Ecdisona e 20-hidroxiecdisona) e do hormônio juvenil III, a forma mais comum em insetos.

como cromatografia gasosa e espectrometria de massas [17,71].

Por sua vez, a administração exógena de ecdiesteróide e a correlação das mudanças com títulos deste hormônio, de acordo com a ocorrência de eventos fisiológicos, sugerem que a função dos ecdiesteróides em carrapatos seja muito similar à já descrita para insetos e crustáceos. O papel fisiológico dos ecdiesteróides em carrapatos foi revisado por vários autores [24,60,84,99]. Cabrera e colaboradores [8] propuseram um modelo unificador para a regulação da reprodução em fêmeas de ácaros no qual são os hormônios ecdiesteróides e não os hormônios juvenis que regulam a vitelogênese.

Há evidências consistentes de que estes hormônios, principalmente ecdisona, regulem a muda em carrapatos [84]. Em todas as espécies de carrapato investigadas, em fases onde os títulos de ecdiesteróides se encontravam altos, o principal hormônio encontrado foi 20-hidroxiecdisona (20E) acompanhado pela ecdisona [22,99]. Em carrapatos, assim como em insetos, a capacidade de transformar ecdisona em 20E é amplamente distribuída nos tecidos, incluindo o intestino [24] e corpo gorduroso [109].

Injeções de 20-hidroxiecdisona (20E) em fêmeas parcialmente ingurgitadas estimulam o aumento do corpo gorduroso, um indicador indireto de estímulo da síntese de Vg [61]. Curiosamente, este aumento na síntese de Vg em *A. hebraeum* não resulta em um aumento na captação de Vg pelo ovário [36, 37,62]. Esta incapacidade de captar Vg não é explicada pela falta de um receptor para a captação desta proteína [36]. Assim, o processo pelo qual a captação de Vg nos ovários de carrapato é desencadeada ainda não é conhecido. A hipótese atualmente mais considerada é de que a captação de Vg em *A. hebraeum* necessite de um fator desconhecido, denominado “fator de captação de Vg”, em adição ao 20E [36, 94]. Existem indícios de que este fator esteja presente na hemolinfa de fêmeas alimentadas, visto que ovários de fêmeas parcialmente alimentadas, quando transplantados para a hemocele de fêmeas ingurgitadas, acumulam uma grande quantidade de Vt, fato que demonstra que os ovários de fêmeas parcialmente alimentadas são competentes e capazes de se desenvolver quando colocados nas condições hormonais de uma fêmea vitelogênica [61].

Thompson e colaboradores [103] desenvolveram uma técnica para injetar 20E em fêmeas vir-

gens de *D. variabilis*, enquanto elas ainda estão fixadas no hospedeiro. Esta técnica tem a clara vantagem de que a alimentação do carrapato não é interrompida durante o tratamento com hormônio. Nestas condições, apesar dos carrapatos não terem ingurgitado completamente, em quatro dias as fêmeas apresentaram desenvolvimento do ovário com captação de Vt pelo oócitos. Também foi mostrado que os níveis do mRNA de Vg estão aumentados durante o tratamento com 20E. Nesta espécie, apenas 20E é sinal suficiente para iniciar tanto a síntese de vitelogenina como a captação desta proteína pelo ovário.

Em 2008, Seixas e colaboradores [95] verificaram os efeitos do 20E sobre a captação de Vg em fêmeas virgens de *A. hebraeum*, comparando as técnicas de Friesen e Kaufman [36] e a de Thompson e colaboradores [103]. Foi verificado que 20E é capaz de induzir a síntese de Vg e o consequente aumento dos títulos deste hormônio na hemolinfa de fêmeas de *A. hebraeum*. No entanto, 20E não é capaz de induzir a captação desta proteína pelos oócitos. Isso demonstra que existem diferentes estratégias de controle da captação de Vg pelo ovário, dentro do grupo dos carrapatos Ixodide.

Para explicar esses achados, foi levantada a hipótese de que a captação de Vg nos oócitos de *A. hebraeum* é desencadeada por 20E juntamente com um fator adicional, denominado fator de captação de vitelogenina (“Vitellogenin Uptake Factor”, VUF). Esta molécula estaria presente na hemolinfa de fêmeas desta espécie, uma vez que em fêmeas que receberam 20E associado com hemolinfa há aumento significativo no tamanho do ovário, dos oócitos e do conteúdo de Vt no ovário [95].

2. O sistema neuroendócrino

O principal órgão do sistema neurológico dos carrapatos é o singânglio. Poucas informações sobre as moléculas produzidas por esse sistema são disponíveis [60, 84]. No singânglio de *D. variabilis* e *O. parkeri*, 18 centros secretores de neuropeptídeos foram identificados [80]. Três desses 18 centros secretores reagem com soro anti-insulina, indicando a produção de moléculas tipo insulina nessas regiões [111]. Foi proposto que neuropeptídeos participem da regulação da vitelogênese e oogênese [84]. Em *B. mori* foi encontrado um neuropeptídeo, denominado bombixina, que reage com anti-insulina e estimula a sín-

tese de ecdiesteróides [45]. Neuroreatividade com anti-insulina também foi identificada em *D. variabilis* [21]. No entanto, Friesen e Kaufman ao avaliar fêmeas de *A. hebraeum* que receberam injeções de insulina não verificaram aumento nos níveis de Vg na hemolinfa, desenvolvimento dos oócitos e nem mesmo degeneração das glândulas salivares, indicativo de aumento nos níveis de ecdiesteróides [36]. Em *R. microplus*, usando uma linhagem de células embrionárias, foi observado que a administração de insulina exógena afeta o nível de glicogênio durante a embriogênese, sendo especulada a função da insulina no crescimento celular e embriogênese do carrapato [2].

Recentemente, foi realizada a primeira análise peptidômica de uma espécie de carrapato. Usando a técnica de espectrometria de massas (MALDI-TOF) e análise direta do tecido, foram identificados 20 neuropeptídeos e 12 precursores do singânglio de *D. variabilis* [72]. Entretanto, não foi feita nenhuma investigação que demonstrasse as ações imputadas a essas moléculas.

VI. FATORES QUE REGULAM A REPRODUÇÃO DE CARRAPATOS

Em carrapatos, existem no mínimo quatro proteínas masculinas reprodutivas conhecidas como fatores de acasalamento [51]:

1. Fator capacitador de esperma (SCF) [97]

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

2. Fator estimulador de vitelogênese (VSF) [89]

Este fator, estudado apenas em *O. moubata*, é sintetizado pelos espermatóforos, mantido no pró-esperma e liberado no trato genital da fêmea durante a capacitação.

3. Fator masculino (MF) [40,59]

Este fator é produzido no testículo e é capaz

de influenciar a degeneração das glândulas salivares e o desenvolvimento dos ovos na fêmea.

4. Fator de ingurgitamento (EF) [77]

Também produzido nos testículos, estimula a fêmea a se alimentar até o ingurgitamento completo. Existem boas razões para se acreditar que o MF e o EF sejam a mesma proteína, recentemente denominada de “voraxina” [98,108].

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

5. Fator indutor de vitelogênese (VIF) [10]

Supõe-se que este seja o iniciador do processo de vitelogênese. É um neuropeptídeo produzido pelo singânglio da fêmea e parece iniciar a síntese de Vg agindo em tecidos ainda desconhecidos e induzir a produção do FSF. Foi descrito no carrapato Argasíde *O. moubata*.

6. Fator estimulador do corpo gorduroso (FSF) [11]

Atua no corpo gorduroso induzindo a síntese de Vg. É conhecido como hormônio vitelogênico [75]. Presente em *O. moubata* e em vários carrapatos Ixodíde [35,36,46], provavelmente é um hormônio ecdiesteróide.

VII. PAPEL DAS PROSTAGLANDINAS NA REPRODUÇÃO DE ARTRÓPODES

Prostaglandinas (PGs) e outros eicosanóides são metabólitos oxigenados do ácido araquidônico. Estes compostos são bem conhecidos por suas ações na fisiologia e em disfunções de mamíferos. No entanto, trabalhos recentes revelam tanto a presença quanto mostram funções biológicas de eicosanóides em insetos e outros invertebrados [102].

Em insetos, os eicosanóides são mediadores da imunidade celular. Foi demonstrado que alguns micro-organismos infecciosos a insetos secretam fatores capazes de inibir a biossíntese de eicosanóides [103]. Os eicosanóides também agem na reprodução e hemostase de insetos, na fisiologia do transporte de íons, em resposta a infecções e também na exocitose de proteínas na glândula salivar. Outra função importante das prostaglandinas descrita nos insetos é a capacidade de induzir a captação da proteína do vitelo de *Rhodinus prolixus* pelo ovário [64]. Esses trabalhos mostram que os eicosanóides, além de agirem a nível comportamental, por exemplo, induzindo o comportamento de postura, também agem

a nível celular, influenciando a captação de proteínas pelo ovário.

A maioria dos estudos relacionados às prostaglandinas em carrapatos concentra-se no papel destas moléculas na interação parasito-hospedeiro [1, 6]. Isto devido as suas propriedades farmacológicas: anti-hemostática, vasodilatadora, imunossupressora, e anti-inflamatória. Sua síntese em carrapatos ocorre a partir do ácido araquidônico ingerido na alimentação hematófaga. As prostaglandinas são encontradas na saliva de carrapatos em concentrações que vão de 10 a 100 vezes maiores do que aquelas presentes em exudatos inflamatórios de mamíferos [6].

Existe apenas um estudo descrevendo o papel das prostaglandinas em órgãos reprodutivos de carrapatos [96]. Neste trabalho, foram medidos os níveis endógenos de prostaglandina (PG) e prostaglandina E₂ (PGE₂) em diferentes tecidos (testículos, ovários e glândula salivar de fêmeas e machos) de *H. anatolicum excavatum*. A verificação de que esses tecidos são capazes de sintetizar PG e PGE₂ *in vitro* e de que a injeção de extrato de glândula salivar na hemocele de fêmeas virgens de *O. parkeri* estimula a oviposição e, quando injetado na vagina, estimula maturação dos oócitos levou à sugestão de que a saliva do macho tem papel no desenvolvimento dos oócitos devido ao seu alto conteúdo de PG [76].

VIII. EFEITOS DA ALIMENTAÇÃO HEMATÓFAGA NOS CARRAPATOS

Para todos os artrópodes hematófagos, a ingestão de sangue constitui um sinal para profundas mudanças fisiológicas e de desenvolvimento [51]. Alguns carrapatos como, por exemplo, o carrapato Argasídeo *O. moubata*, alimentam-se por aproximadamente 30-60 min [48,49] e realizam postura por

diversas vezes, cada uma dependente de um repasto sanguíneo. Por outro lado, os carrapatos Ixodídeos permanecem fixados ao hospedeiro de 5 a 15 dias, dependendo da espécie, estado fisiológico e outros fatores. Em todos os carrapatos o acasalamento causa mudanças fisiológicas importantes [60].

O período de alimentação é dividido em três fases: (1) fase preparatória – compreende de um a dois dias; é a fase em que a fêmea ancora no hospedeiro, libera o cimento e forma a lesão. (2) Fase lenta – ocorre nos quatro a oito dias seguintes; é quando a fêmea acasala e aumenta de tamanho cerca de 10 vezes. (3) Fase rápida – dura cerca de 24 horas; a fêmea aumenta de tamanho em mais de 10 vezes ainda e então se solta do hospedeiro.

Esses processos fisiológicos estão bem descritos para o carrapato *A. hebraeum* pelos trabalhos de Kaufman e colaboradores. Cerca de quatro dias após o ingurgitamento, as glândulas salivares do carrapato *A. hebraeum* degeneram [39] por um processo controlado por 20E [41,50,63]. Nesta espécie, a maturação dos oócitos ocorre durante o período de alimentação, sendo que a captação de vitelo ocorre no quarto dia após o ingurgitamento, e somente no décimo dia começa a oviposição que dura cerca de 3 semanas, quando a fêmea morre [35]. Já em *R. microplus*, que é uma espécie de um único hospedeiro, a postura dos ovos tem início no terceiro dia após o ingurgitamento.

A transição entre as fases lenta e rápida de alimentação ocorre quando a fêmea atinge um aumento de 10 vezes no seu peso. Esse momento é bastante importante, pois marca o início das últimas 24 horas de alimentação e é conhecido como peso crítico (“critical weight” – CW; Figura 3) [40]. Esse momento é chamado de “crítico” porque as fêmeas



Figura 3. Esquema ilustrando a alimentação em *Amblyomma hebraeum* e o conceito de peso crítico definido por Harris & Kaufman [40]. Imagem adaptada de Friesen [PhD Thesis (2003), comunicação pessoal].

que forem removidas do hospedeiro antes dele não realizam a postura, são capazes de se fixar novamente ao hospedeiro caso tenham oportunidade e suas glândulas salivares não degeneram. Entretanto, se a fêmea for removida acima do peso crítico, ela não volta a se fixar, mas realiza postura e sofre degeneração das glândulas salivares [51].

Existem diferenças sutis entre o peso crítico para a refixação, degeneração das glândulas e desenvolvimento dos ovos [107]. Ultrapassar o peso crítico é pré-requisito para a degeneração das glândulas salivares e vitelogênese. No entanto, outro fator importante na determinação destes eventos fisiológicos é o desprendimento da fêmea do hospedeiro [37].

IX. A UTILIZAÇÃO DO VITelo NA EMBRIOGÊNESE DOS CARRAPATOS

Os grânulos de vitelo são como lisossomos modificados, pois além de armazenarem as substâncias de reserva, possuem a maquinaria enzimática necessária para a disponibilização destes nutrientes. Diferentemente dos lisossomos clássicos, que são organelas hidrolíticas vorazes, capazes de hidrolisar rapidamente praticamente toda e qualquer proteína, incluindo glicoproteínas a aminoácidos, açúcares e outros produtos menores, os grânulos de vitelo atuam na degradação dos componentes do seu conteúdo interno de maneira controlada [31]. Esta regulação na utilização do vitelo é essencial para que sejam providenciados nutrientes coordenadamente de acordo com as necessidades do desenvolvimento do embrião, garantindo assim a sua sobrevivência até se tornar um organismo apto a fazer uma refeição. Dois fatores têm-se mostrado responsáveis pela regulação deste processo: pH e latência enzimática [3,31].

Foram descritas algumas enzimas que atuam em pH ácido e que, muito provavelmente, estão envolvidas neste processo. Em *Drosophila sp.* foi encontrada uma cisteína proteinase tipo catepsina B que se apresenta fortemente associada às proteínas do vitelo. Nesta condição, esta enzima possui uma massa molecular de 1000 kDa e durante o desenvolvimento ocorre uma dissociação mediada pela ação de uma serino proteinase neutra, também presente nos ovos, o que resulta na liberação da enzima livre (com massa molecular de 39 kDa). Esta enzima é capaz de

degradar as proteínas do vitelo em pH ácido (3,5 – 5,0) [65].

Foi encontrada uma cisteína proteinase de *Blatella germanica* que inicia a degradação de Vt nos ovos. Esta protease contém três polipeptídeos (de 27, 29 e 31 kDa) gerados durante o desenvolvimento embrionário [56]. Uma cisteína proteinase, distinta das anteriores, é encontrada em ovos do bicho da seda (*B. mori*) [47]. Esta enzima também é ativada em pH ácido e hidrolisa vários substratos, como as proteínas hemoglobina e lipoforina. A maior atividade detectada foi sobre Vg e Vt em pH 3,0 a 3,5. Esta cisteína proteinase de *B. mori* é encontrada na hemolinfa das fêmeas e, em maior quantidade, em ovos maduros. A conversão da forma latente à forma ativa ocorre por autoproteólise, reduzindo a massa molecular de 47 kDa para 39 kDa [47]. *Musca domestica* é mais um inseto no qual foi identificada atividade cisteína endopeptidásica ativada por autoproteólise em pH ácido [85].

Em extrato bruto de ovos do carrapato *O. moubata*, níveis máximos de degradação de Vt ocorrem em pH 3,0 a 3,5 e não é detectada proteólise em pH neutro. Esta atividade proteolítica é atribuída a uma cisteína proteinase do tipo catepsina L de 37 a 39 kDa. Em pH neutro esta enzima é capaz de se ligar à vitelina [28]. No mosquito *Aedes aegypti* foram descritas duas proteinases ácidas funcionalmente diferentes, uma serino carboxipeptidase [13] sintetizada no corpo gorduroso e acumulada nos oócitos, e uma arpartico proteinase tipo catepsina D, cuja síntese também ocorre no corpo gorduroso, mas é restrita à fase de vitelogênese [14]. O mRNA desta aspartico proteinase se acumula no corpo gorduroso 24h após o início da síntese de Vg e precede, em 12h, o surgimento da atividade proteásica [15].

Como visto neste conjunto de dados, os estudos têm estabelecido quase conclusivamente que um sistema geral para degradação de vitelo durante o desenvolvimento embrionário, em uma ampla faixa de espécies de artrópodes, envolve a ativação de pró-cisteína proteinases que se apresentam associadas a proteínas de reserva [38]. Menos conhecido é o mecanismo que leva à ativação destas enzimas. Além da ativação por acidificação, como citado anteriormente, existem outras hipóteses como o controle transcricional das enzimas responsáveis por esta hidrólise [44]; a proteólise limitada das pró-pro-

teinasas latentes, ou a remoção de inibidores específicos [31]. A fosforilação da vitelina parece ser um fator controlador de sua suscetibilidade à proteólise, sendo que em *B. mori* a fosforilação da Vt aumenta sua degradação por cisteíno proteinase [38].

Entretanto, a hipótese mais amplamente difundida e fundamentada ainda é a de que uma acidificação regulada dos grânulos de vitelo durante o desenvolvimento seja o principal fator responsável pela ativação das proteases durante a embriogênese. Esta ativação ocorreria por hidrólise do pró-peptídeo. Esta hipótese é corroborada por estudos realizados com diversos modelos como carrapato – *O. moubata* [30] e *R. microplus* [3], barata – *Blatella germanica* [74], ouriço do mar – *Strongilocentrotus purpuratus* e *Lytechinus pictus* [62] e sapo – *Xenopus laevis* [32, 33]. Em todos eles, foi constatado que no início do desenvolvimento o pH dos grânulos de vitelo é neutro ou ligeiramente ácido e durante a embriogênese ocorre uma acidificação regulada dos grânulos, que desencadeia a degradação do vitelo.

Esta ativação também poderia ocorrer pela separação da pró-enzima de um inibidor. Esta segunda hipótese está fundamentada no fato de que, como descrito acima, algumas destas enzimas apresentam-se associadas a uma grande proteína, normalmente uma proteína de vitelo [31] que poderia estar atuando como inibidor, já que é descrito que proteínas de vitelo possuem atividade inibitória de tripsina e quimiotripsina [90,27]. No entanto, ainda é necessário demonstrar que estas proteínas efetivamente inibem proteinases, como cisteíno proteinases, e desempenham papel determinante na regulação da degradação do vitelo [31].

X. ENZIMAS ENVOLVIDAS NA DEGRADAÇÃO DE VT EM *R. MICROPLUS*

Foram descritas quatro enzimas envolvidas na degradação de vitelina em *R. microplus*. Três delas em ovos, BYC (*Boophilus* Yolk Pro-Catepsin) [57], THAP (Tick Heme Binding Aspartic Proteinase) [101] e VTDCE (Vitellin Degrading Cysteine-Endopeptidase) [93]; e uma em larvas, RmLCE (*R. microplus* larvae Cysteine-endopeptidase) [26].

1. BYC

BYC foi purificada de ovos de 1º dia de *R. microplus* na forma de uma pró-aspártico proteinase

de 54 kDa, que é ativada em pH 3,5 por autoproteólise, passando à forma madura da enzima, com 47 kDa, sensível à pepstatina A. Esta enzima é sintetizada no intestino e no corpo gorduroso do carrapato, é secretada na hemolinfa e capturada pelos oócitos. Foi verificado que a BYC tem ação proteolítica sobre Vt em extrato de ovos de *R. microplus*, através de um experimento em que o extrato foi incubado em pH 3,5 a 37°C por 24 h, na presença e ausência de pepstatina A [57].

Bovinos vacinados com BYC nativa [19] ou na forma recombinante [55] mostraram que esta proteína confere proteção parcial contra carrapatos.

A análise da sequência do gene desta enzima mostrou que ela possui alta similaridade com outras aspártico proteinases [70]. No entanto, a sequência de aminoácidos da BYC apresenta uma diferença importante em relação a outras enzimas desta classe: a falta do segundo resíduo de ácido aspártico envolvido no processo de catálise. Esta modificação pode ser responsável pela baixa atividade que esta enzima apresenta sobre vitelina, e isto pode ser uma estratégia de conservação do substrato para posterior utilização pela larva [70].

2. THAP

THAP é uma aspártico proteinase tipo catepsina D de aproximadamente 35 kDa. O pH ótimo de atuação é 3,5 e a atividade desta enzima, tanto sobre peptídeo sintético como sobre proteínas, é inibida por pepstatina A. Esta enzima possui um sítio de ligação à heme e se liga a esta molécula na proporção de 1:1, com uma constante de dissociação de 190 nM. Por reconhecimento do heme, a THAP é capaz de se ligar a Vt, que é uma hemeproteína. Esta aspártico proteinase está presente nos grânulos de vitelo e apresenta atividade proteolítica sobre Vt. Esta atividade é modulada pela quantidade de heme. Um excesso de heme livre compete com o heme da Vt, fazendo com que THAP deixe de se ligar a Vt e, conseqüentemente, hidrolisá-la. Quando a concentração de heme livre é baixa, a enzima volta a ficar ativa, hidrolisando Vt. Estas observações sugerem que esta enzima está envolvida na disponibilização de heme e no controle de danos oxidativos [101]. THAP é expressa no corpo gorduroso, intestino e ovário, nos estágios de partenógina e teleógina. Níveis mais altos de expressão são alcançados em fêmeas vitelo-

gênicas. Esta enzima foi clonada e expressa em *E. coli* e a THAP recombinante teve sua atividade sobre vitelina confirmada [79].

3. VTDCE

Foi purificada de ovos de 0 – 10 dias de *R. microplus*, na forma de um dímero contendo uma subunidade de 17 e outra de 22 kDa [93]. Possui pH ótimo 4,0 e temperatura ótima de 50°C. É completamente inibida por E-64, pertencendo à classe das cisteíno endopeptidases. A VTDCE é uma protease fortemente associada ao vitelo, nenhum dos métodos testados foi capaz de separá-la da VT. Por este motivo, o processo de purificação inclui uma etapa de autólise em pH ácido, na qual a Vt é completamente degradada e a enzima é recuperada no sobrenadante da preparação. Neste mesmo protocolo fazem parte: uma cromatografia de troca aniônica em pH neutro, uma gel filtração e outra cromatografia de troca aniônica, ambas em pH ácido. Após a etapa de autólise, a enzima torna-se instável e pode ser inativada irreversivelmente, caso volte a condições de pH maior que 7,5. Por isso, ela deve ser mantida em pH ácido até a obtenção do preparado final. A VTDCE tem atividade proteolítica sobre hemoglobina e albumina, além da Vt. Das enzimas descritas envolvidas na degradação de vitelina em carrapatos, a VTDCE mostrou-se como a mais ativa, confirmando sua importância no processo reprodutivo deste parasito [94]. Bovinos vacinados com VTDCE nativa [95] mostraram que esta proteína confere proteção parcial contra carrapatos.

A VTDCE foi testada como antígeno vacinal em experimento de imunização de bovinos e desafio com *R. microplus*. Efetivamente, o uso da VTDCE como antígeno conferiu proteção parcial aos bovinos contra carrapatos, sendo um antígeno indutor de resposta humoral e memória imunológica [94].

4. RmLCE

A RmLCE foi parcialmente purificada de larvas de 0 – 12 dias de *R. microplus* e teve sua atividade caracterizada [26]. Esta enzima possui temperatura ótima (37°C) e pH ótimo (5) e, assim como a VTDCE, torna-se instável em pH maior que 7,5. Com o passar dos dias após a eclosão da larva, esta atividade proteolítica aumenta. Considerando que esta enzima apresenta a capacidade de degradar Vt, os autores sugere-

rem que ela seja responsável pela nutrição da larva até o início da alimentação hematófaga.

XI. CONCLUSÃO

O entendimento das rotas de síntese e ação de hormônios responsáveis pelas alterações fisiológicas durante o processo reprodutivo em carrapatos ainda requer mais estudos. No entanto, os avanços nesta área têm sido significativos se considerarmos que até há alguns anos atrás resultados encontrados em insetos eram extrapolados diretamente e tidos como válidos também para carrapatos. Neste contexto, cada vez mais, os estudos confirmam que a fisiologia dos carrapatos apresenta diferenças importantes em relação aos insetos e demais grupos de artrópodes, de modo que os carrapatos apresentam características bastante particulares. Um bom exemplo é o fato de os carrapatos, diferentemente dos insetos hematófagos e demais animais estudados, não possuírem a capacidade de produzir heme e terem a habilidade de aproveitar o heme proveniente da ingestão de sangue do hospedeiro para suas funções vitais [7]. Outro exemplo importante é a provável ausência de JH em carrapatos [25]. Estudos mais antigos [17,100] mostram claramente o conflito de informações obtidas por pesquisadores que buscavam encontrar moléculas tipo JH, ou efeitos destas, em fêmeas de carrapato. Entretanto, é cada vez mais evidente que o controle da vitelogênese em carrapatos é realizado por hormônios ecdisteróides e não JH [25]. As diferenças se estendem até mesmo entre espécies de carrapatos da mesma família, como *D. variabilis* e *A. hebraeum*, dois carrapatos Ixodidae nos quais o controle da síntese e captação de vitelogenina pelos oócitos parece ser regulado de forma diferente [94].

Por outro lado, os mecanismos de degradação de vitelina e controle da embriogênese estão melhor estabelecidos e apresentam similaridade entre insetos e carrapatos. Desde os estudos de Fagotto e colaboradores [28-30], vem sendo estruturado um modelo de como ocorre a nutrição dos embriões de carrapato. Este modelo baseia-se em enzimas ácidas, que estão confinadas juntamente com o material de reserva em vesículas especializadas denominadas grânulos de vitelo e sofrem ativação pela acidificação do pH desses grânulos. Ativadas, essas enzimas atuam na degradação de Vt, fornecendo assim ami-

noácidos para nutrir o embrião em desenvolvimento. Este modelo também é válido para insetos e está muito bem caracterizado, tanto a nível celular quanto molecular [83]. Enzimas envolvidas no processamento do material de reserva presente nos ovos foram descritas em diferentes organismos [56,57,65, 94,101], e se mostram como possíveis alvos no controle dos carrapatos [19,55,95].

Não existem dúvidas de que o genoma completo, de ao menos duas espécies representativas de carrapato, facilitaria muito o entendimento dos

processos fisiológicos desses parasitos. No entanto, enquanto os trabalhos de genômica estão em andamento, há avanços no entendimento do processo reprodutivo dos carrapatos e seu controle hormonal. Estudos como os descritos acima, levam a conhecer os detalhes destes sistemas em carrapato e abrem caminhos para o desenvolvimento de novas estratégias para interferir nessas rotas, seja com o uso de inibidores, seja com o uso de anticorpos, visando a controlar as populações desses importantes parasitos e vetores de doenças tanto para humanos quanto para animais.

XII. REFERÊNCIAS

1. **Aljamali M., Bowman A.S., Dillwith J.W., Tucker J.S., Yates G.W., Essenberg R.C. & Sauer J.R. 2002.** Identity and synthesis of prostaglandins in the lone star tick, *Amblyomma americanum* (L.), as assessed by radio-immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 32(3): 331-341.
2. **Abreu L.A., Fabres A., Esteves E., Masuda A., Silva Vaz Jr. I., Daffre S. & Logullo C. 2009.** Exogenous insulin stimulates glycogen accumulation in *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus embryo cell line BME26 via PI3K/AKT pathway. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 153: 185-190.
3. **Abreu L.A., Valle D., Manso P.P., Façanha A.R., Pelajo-Machado M., Masuda H., Masuda A., Vaz I. Jr., Lenzi H., Oliveira P.L. & Logullo C. 2004.** Proteolytic activity of *Boophilus* microplus Yolk pro-Cathepsin D (BYC) is coincident with cortical acidification during embryogenesis. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 34(5): 443-449.
4. **Balashov Y.S. 1972.** Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - vectors of diseases of man and animals. *Journal of Medical Entomology*. 26: 243-246.
5. **Boldbaatar D., Battsetseg B., Matsuo T., Hatta T., Umemiya-Shirafuji R., Xuan X. & Fujisaki K. 2008.** Tick vitellogenin receptor reveals critical role in oocyte development and transovarial transmission of *Babesia* parasite. *Biochemistry and Cell Biology*. 86(4): 331-344.
6. **Bowman A.S., Dillwith J.W. & Sauer J.R. (1996).** Tick salivary prostaglandins: Presence, origin and significance. *Parasitology Today*. 12(10): 388-396.
7. **Braz G.R., Coelho H.S., Masuda H. & Oliveira P.L. 1999.** A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus* microplus. *Current Biology*. 19(13):703-706.
8. **Cabrera A.R., Donohue K.V. & Roe R.M. 2009.** Regulation of female reproduction in mites: a unifying model for the Acari. *Journal of Insect Physiology*. 55(12): 1079-1090.
9. **Chen, M.E., Lewis D.K., Keeley L.L. & Pietrantonio P.V. 2004.** cDNA cloning and transcriptional regulation of the vitellogenin receptor from the imported fire ant, *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae). *Insect Molecular Biology*. 13(2): 195-204.
10. **Chinzei Y. & Taylor D. 1990.** Regulation of vitellogenesis induction by engorgement in the soft tick (*Ornithodoros moubata*). *Advances in Invertebrate Reproduction*. 5: 565-570.
11. **Chinzei Y. & Taylor D. 1994.** Hormonal regulation of vitellogenin biosynthesis in ticks. *Advances in Disease Vector Research*. 10: 1-22.
12. **Chinzei Y. & Yano I. 1985.** Vitellin Is the Nutrient Reserve During Starvation in the Nymphal Stage of a Tick. *Experientia*. 41: 948-950.
13. **Cho W.L., Deitsch K.W. & Raikhel A.S. 1991.** An extraovarian protein accumulated in mosquito oocytes is a carboxypeptidase activated in embryos. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(23): 10821-10824.
14. **Cho W.L., Dhadialla T.S. & Raikhel A.S. 1991.** Purification and Characterization of a lysosomal aspartic protease with Cathepsin-D activity from the mosquito. *Insect Biochemistry*. 21: 165-176.
15. **Cho W.L. & Raikhel A.S. 1992.** Cloning of cDNA for mosquito lysosomal aspartic protease. Sequence analysis of an insect lysosomal enzyme similar to cathepsins D and E. *Journal of Biological Chemistry*. 267(30): 21823-21829.
16. **Connat J.L., Diehl P.A. & Morici M. 1984.** Metabolism of ecdysteroids during the vitellogenesis of the tick *Ornithodoros*

- moubata* (Ixodoidea, Argasidae): accumulation of apolar metabolites in the eggs. *General and Comparative Endocrinology.* 56(1): 100-110.
17. **Connat J.L., Dotson E.M. & Diehl P.A. 1987.** Metabolism of ecdysteroids in the female tick *Amblyomma hebraeum* (Ixodoidea, Ixodidae): accumulation of free ecdysone and 20-hydroxyecdysone in the eggs. *Comparative Physiology B.* 157(5): 689-699.
18. **Connat J.L., Lafont R. & Diehl P. A. 1986.** Metabolism of [3H]ecdysone by isolated tissues of the female ixodid tick *Amblyomma hebraeum* (Ixodoidea; Ixodidae). *Molecular and Cellular Endocrinology.* 47(3): 257-267.
19. **da Silva Vaz Jr. I., Logullo C., Sorgine M., Velloso F.F., Rosa de Lima M.F., Gonzales J.C., Masuda H., Oliveira P.L. & Masuda A. 1998.** Immunization of bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 66(3-4): 331-341.
20. **Davey K.G. & Gordon D.R. 1996.** Fenoxycarb and thyroid hormones have JH-like effects on the follicle cells of *Locusta migratoria* in vitro. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 32(3-4): 613-622.
21. **Davis H.H., Dotson E.M. & Oliver J.H.Jr. 1994.** Localization of insulin-like immunoreactivity in the synganglion of nymphal and adult *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology.* 18(2): 111-122.
22. **Dees W.H., Sonenshine D.E. & Breidling E. 1984.** Ecdysteroids in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae), during different periods of tick development. *Journal of Medical Entomology.* 21(5): 514-523.
23. **Diehl P.A., Aeschlimann A. & Obenchain F.D. 1982.** Tick Reproduction: Oogenesis and Oviposition. *In: Physiology of ticks.* Oxford: Pergamon Press. 277-350.
24. **Diehl P.A., Connat J.L. & Dotson E.M. 1986.** Chemistry, function and metabolism of tick ecdysteroids. *In: Sauer J.R. & Hair J.A. (Eds). Morphology, Physiology, and Behavioral Biology of Ticks.* Chichester: Ellis Horwood, pp.165-193.
25. **Donohue K.V., Khalil S.M.S., Ross E., Mitchel R.D., Roe R.M. & Sonenshine D.E. 2009.** Male engorgement factor: Role in stimulating engorgement to repletion in the ixodid tick, *Dermacentor variabilis*. *Journal of Insect Physiology.* 55(10): 909-918.
26. **Estrela A., Seixas A. & Termignoni C. 2007.** A cysteine endopeptidase from tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) larvae with vitellin digestion activity. *Comparative Biochemistry and Physiology – Part B: Biochemistry and Molecular Biology.* 148(4): 410-416.
27. **Ezquieta B. & Vallejo C. G. 1986.** Lipovitellin inhibition of *Artemia* trypsin-like proteinase: a role for a storage protein in regulating proteinase activity during development. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 250(2): 410-417.
28. **Fagotto F. 1990.** Yolk degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 14(4): 217-235.
29. **Fagotto F. 1990.** Yolk degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid-activable proenzyme. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 14(4): 237-252.
30. **Fagotto F. 1991.** Yolk degradation in tick eggs: III. Developmentally regulated acidification of the yolk spheres. *Development, Growth and Differentiation.* 35: 57-66.
31. **Fagotto F. 1995.** Regulation of yolk degradation, or how to make sleepy lysosomes. *Journal of Cell Science.* 108: 3645-3647.
32. **Fagotto F. & Maxfield F.R. 1994.** Changes in yolk platelet pH during *Xenopus laevis* development correlate with yolk utilization. A quantitative confocal microscopy study. *Journal of Cell Science.* 107: 3325-3337.
33. **Fagotto F. & Maxfield F.R. 1994.** Yolk platelets in *Xenopus* oocytes maintain an acidic internal pH which may be essential for sodium accumulation. *Journal of Cell Biology.* 125(5): 1047-1056.
34. **Frame M.J., Mottram J.C. & Coombs G.H. 2000.** Analysis of the roles of cysteine proteinases of *Leishmania mexicana* in the host-parasite interaction. *Parasitology* 121: 367-377.
35. **Friesen K.J. & Kaufman W.R. 2002.** Quantification of vitellogenesis and its control by 20-hydroxyecdysone in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology.* 48(8): 773-782.
36. **Friesen K.J. & Kaufman W.R. 2004.** Effects of 20-hydroxyecdysone and other hormones on egg development, and identification of a vitellin-binding protein in the ovary of the tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology.* 50(6): 519-529.
37. **Friesen K.J. & Kaufman W.R. 2009.** Salivary gland degeneration and vitellogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*: Surpassing a critical weight is the prerequisite and detachment from the host is the trigger. *Journal of Insect Physiology.* 55(10): 936-942.

38. **Giorgi F., Bradley J.T. & Nordin. 1999.** Differential vitellin polypeptide processing in insect embryos. *Micron.* 30: 579-596.
39. **Harris R.A. & Kaufman W.R. 1981.** Hormonal control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology.* 27: 241-248.
40. **Harris R.A. & Kaufman W.R. 1984.** Neural involvement in the control of salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Experimental Biology.* 109: 281-290.
41. **Harris R.A. & Kaufman W.R. 1985.** Ecdysteroids: Possible candidates for the hormone which triggers salivary gland degeneration in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Experientia* 41: 740-742.
42. **Horak I.G., Camicas J.L. & Keirans J.E. 2002.** The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology.* 28(1-4): 27-54.
43. **Iatrou K., Gill S.S. & Gilbert L.I. 2005.** Comprehensive Molecular Insect Science, Seven-Volume Set. Pergamon Press: New York, 3300p
44. **Ikeda M., Yaginuma T., Kobayashi M. & Yamashita O. 1991.** cDNA cloning, sequencing and temporal expression of the protease responsible for vitellin degradation in the silkworm, *Bombyx mori*. *Comparative Biochemistry and Physiology B.* 99(2): 405-411.
45. **Iwami M., Masafumi I., Kawakami A., Ishizaki H., Takahashi S.Y., Adachi T., Suzuki Y., Nagasawa H. & Suzuki, A. 1989.** Cloning of a gene encoding bombyxin, an insulin-like brain secretory peptide of the silkworm *Bombyx mori* with prothoracicotropic activity. *Development Growth and Differentiation.* 31: 31-37.
46. **James A.M., Zhu X.X. & Oliver Jr. J.H. 1997.** Vitellogenin and ecdysteroid titers in *Ixodes scapularis* during vitellogenesis. *Journal of Parasitology.* 83(4): 559-563.
47. **Kageyama T. & Takahashi S.Y. 1990.** Purification and characterization of a cysteine proteinase from silkworm eggs. *European Journal of Biochemistry.* 193(1): 203-210.
48. **Kaufman S.E., Kaufman W.R. & Phillips J.E. 1981.** Fluid balance in the argasid tick, *Ornithodoros moubata*, fed on modified blood meals. *Journal of Experimental Biology.* 93: 225-242.
49. **Kaufman S.E., Kaufman W.R. & Phillips J.E. 1982.** Mechanism and characteristics of coxal fluid excretion in the argasid tick *Ornithodoros moubata*. *Journal of Experimental Biology.* 98: 343-352.
50. **Kaufman W.R. 1991.** Further investigations on the action of ecdysteroids on the salivary glands of the female tick *Amblyomma americanum*. *Experimental and Applied Acarology.* 10(4): 259-265.
51. **Kaufman W.R. 2004.** Assuring paternity in a promiscuous world: are there lessons for ticks among the insects? *Parasitology.* 129: S145-S160.
52. **Kim Y., Davari E.D., Sevala V. & Davey K.G. 1999.** Functional binding of a vertebrate hormone, L-3,5,3'-triiodothyronine (T3), on insect follicle cell membranes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology.* 29(10): 943-950.
53. **Klowden M.J. 1996.** Endogenous factors regulating mosquito host-seeking behaviour. *Ciba Found Symp.* 200: 212-223.
54. **Krasko A., Gamulin V., Seack J., Steffen R., Schröder H.C. & Müller W.E. 1997.** Cathepsin, a major protease of the marine sponge *Geodia cydonium*: purification of the enzyme and molecular cloning of cDNA. *Molecular Marine Biology and Biotechnology.* 6(4): 296-307.
55. **Leal A.T., Seixas A., Pohl P.C., Ferreira C.A.S., Logullo C., Oliveira P.L., Farias S.E., Termignoni C., Da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2006.** Vaccination of bovines with recombinant *Boophilus* Yolk pro-Cathepsin. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 114(3): 341-345.
56. **Liu X., McCarron R.C. & Nordin J.H. 1996.** A cysteine protease that processes insect vitellin. Purification and partial characterization of the enzyme and the proenzyme. *Journal of Biological Chemistry.* 271(52): 344-351.
57. **Logullo C., Da Silva Vaz I., Sorgine M.H.F., Paiva-Silva G.O., Faria F.S., Zingali R.B., De Lima M.F.R., Abreu L., Fiahlo Oliveira E., Alves E.W., Masuda H., Gonzales J.C., Masuda A. & Oliveira P.L. 1998.** Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. *Parasitology.* 116: 525-532.
58. **Lomas L.O., Gelman D. & Kaufman W.R. 1998.** Ecdysteroid regulation of salivary gland degeneration in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*: a reconciliation of in vivo and in vitro observations. *General and Comparative Endocrinology.* 109(2): 200-211.
59. **Lomas L.O. & Kaufman W.R. 1992.** An indirect mechanism by which a protein from the male gonad hastens salivary gland degeneration in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Archives of Insect Physiology and Biochemistry.* 21(3): 169-178.

60. Lomas L.O. & Rees H.H. 1998. Endocrine regulation of development and reproduction in acarines. In: *Recent Advances in Arthropod Endocrinology*. Coast G. M. & Webster S.G. (Eds). Cambridge: Cambridge University Press, 91-124.
61. Lunke M.D. & Kaufman W.R. 1992. Effects of the avermectin analogue MK-243 on vitellogenesis and reproduction in the ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Experimental and Applied Acarology*. 13(4): 249-259.
62. Mallya SK, Partin JS, Valdizan MC & Lennarz W.J. 1992. Proteolysis of the major yolk glycoproteins is regulated by acidification of the yolk platelets in sea urchin embryos. *Journal of Cell Biology*. 117(6): 1211-1221.
63. Mao H. & Kaufman W.R. 1999. Profile of the ecdysteroid hormone and its receptor in the salivary gland of the adult female tick, *Amblyomma hebraeum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 29(1): 33-42.
64. Medeiros M.N., Mendonça L.H, Hunter A.L, Paiva-Silva G.O., Mello F.G., Henze I.P., Masuda H., Maya-Monteiro C.M. & Machado E.A. 2004. The role of lipoxigenase products on the endocytosis of yolk proteins in insects: participation of cAMP. *Archives of Insect Physiology and Biochemistry*. 55(4): 178-187.
65. Medina M., Leon P. & Vallejo C.G. 1988. Drosophila cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 263(2): 355-363.
66. Meirelles M.N., Juliano L., Carmona E., Silva S.G., Costa E.M., Murta A.C. & Scharfstein J. 1992. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Molecular and Biochemical Parasitology*. 52(2): 175-184.
67. Mitchell III R.D., Ross E., Osgood C., Sonenshine D.E., Donohue K.V., Khalil S.M., Thompson D.M. & Roe R. 2007. Molecular characterization, tissue-specific expression and RNAi knockdown of the first vitellogenin receptor from a tick. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(4): 375-388.
68. Montenegro-James S. 1992. Prevalence and control of babesiosis in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 87: 27-36.
69. Murrell A. & Barker S. C. 2003. Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*. 56: 169-172.
70. Nascimento-Silva M.C., Leal A.T., Daffre S., Juliano L., da Silva Vaz Jr.I., Paiva-Silva G.O., Oliveira P.L. & Sorgine M.H. 2008. BYC, an atypical aspartic endopeptidase from *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 149(4): 599-607.
71. Neese P.A, Sonenshine D., Kallapur V.L., Apperson C.S. & Roe R.M. 2000. Absence of insect juvenile hormones in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say) (Acari:Ixodidae), and in *Ornithodoros parkeri* Cooley (Acari:Argasidae) *Journal of Insect Physiology*. 46(4): 477-490.
72. Neupert S., Russell W.K., Predel R., Russell D.H., Strey O.F., Teel P.D. & Nachman R.J. 2009. The neuropeptidomics of *Ixodes scapularis* synganglion. *Journal of Proteomics*. 76(6): 1040-1045.
73. Nijhout H.F. 1994. Genes on the wing. *Science*. 265: 44-45.
74. Nordin J.H., Beaudoin E.L. & Liu X.D. 1990. Proteolytic processing of *Blattella germanica* vitellin during early embryo development. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*. 15: 119-135.
75. Ogihara K. 2003. Ecdysteroid hormone titer and expression of ecdysone receptor mRNA as related to vitellogenesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). Master of Agricultural Science Thesis, University of Tsukuba, Japan.
76. Oliver Jr. J.H., Pound J.M. & Andrews R.H. 1984. Induction of egg maturation and oviposition in the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Journal of Parasitology*. 70(3): 337-42.
77. Pappas P.J. & Oliver J.H. 1972. Reproduction in ticks (Acari: Ixodoidea). 2. Analysis of the stimulus for rapid and complete feeding of female *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Medical Entomology*. 9: 47-50.
78. Parizi L.F., Pohl P.C., Masuda A., Da Silva Vaz I. 2009. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. 18: 1-7.
79. Pohl P.C., Sorgine M.H., Leal A.T., Logullo C., Oliveira P.L., da Silva Vaz Jr. I. & Masuda A. 2008. An extraovarian aspartic protease accumulated in tick oocytes with vitellin-degradation activity. *Comparative Biochemistry and Physiology B*. 151(4): 392-399.
80. Pound J.M. & Oliver Jr. J.H. 1979. Juvenile Hormone: Evidence of Its Role in the Reproduction of Ticks. *Science*. 206: 355-57.
81. Pound J.M. & Oliver Jr. J.H. 1982. Synganglial and neurosecretory morphology of female *Ornithodoros parkeri* (Cooley) (Acari: Argasidae). *Journal of Morphology*. 173: 159-177.
82. Raikhel A.S. & Dhadialla T.S. 1992. Accumulation of yolk proteins in insect oocytes. *Annual Review of Entomology*. 37: 217-251.

83. Raikhel A.S., Kokoza V.A., Zhu J., Martin D., Wang S.F., Li C., Sun G., Ahmed A., Dittmer N. & Attardo G. 2002. Molecular biology of mosquito vitellogenesis: from basic studies to genetic engineering of antipathogen immunity. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 10: 1275-1286.
84. Rees H.H. 2004. Hormonal control of tick development and reproduction. *Parasitology*. 129: S127-S143.
85. Ribolla P.E. & De Bianchi A.G. 1995. Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 25(9): 1011-1017.
86. Roe R.M., Donohue K.V., Khalil S.M.S. & Sonenshine D.E. 2008. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. *Frontiers in Bioscience*. 13: 7250-7268.
87. Rosell R. & Coons L.B. 1991. Determination of vitellogenin titer in the hemolymph of *Dermacentor variabilis* (Acarina: Ixodidae) using an indirect enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Medical Entomology*. 28(1): 41-44.
88. Santos T.R.B., Farias N.A.R., Filho N.A.C. & da Silva Vaz Jr. I. 2008. The use of acaricides on *Rhipicephalus (B.) microplus* from two physiogeographical regions of Rio Grande do Sul. *Acta Scientiae Veterinariae*. 36(1): 25-30.
89. Sahli R., Germond J.E. & Diehl P.A. 1985. *Ornithodoros moubata*: spermateleosis and secretory activity of the sperm. *Experimental Parasitology*. 60(3): 383-395.
90. Salisbury N., Calaprice N. & Triplett E. L. 1980. Amphibian embryo protease inhibitors maternal origin and identity with Lipovitellin Heavy Subunit. *Cell Differentiation*. 9: 219-227.
91. Sappington T.W. & Raikhel A.S. 1998. Molecular characteristics of insect vitellogenins and vitellogenin receptors. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 28(5-6): 277-300.
92. Schonbaum C.P., Lee S. & Mahowald A.P. 1995. The Drosophila yolkless gene encodes a vitellogenin receptor belonging to the low density lipoprotein receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92(5): 1485-1489.
93. Seixas A., Dos Santos P.C., Velloso F.F., Da Silva Vaz I., Masuda A., Horn F. & Termignoni C. 2003. A *Boophilus microplus* vitellin-degrading cysteine endopeptidase. *Parasitology*. 126: 155-163.
94. Seixas A., Friesen K.J. & Kaufman W.R. 2008. Effect of 20-hydroxyecdysone and haemolymph on oogenesis in the ixodid tick *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*. 54(7): 1175-1183.
95. Seixas A., Leal A.T., Nascimento-Silva M.C., Masuda A., Termignoni C., da Silva Vaz Jr. I. 2008. Vaccine potential of a tick vitellin-degrading enzyme (VTDCE). *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 124(3-4): 332-340.
96. Shemesh M., Milaguir F., Ayalon N. & Hansel W. 1979. Steroidogenesis and prostaglandin synthesis by cultured bovine blastocysts. *Journal of Reproduction and Fertility*. 56: 181-185.
97. Shepherd J., Oliver Jr. J.H. & Hall J.D. 1982. A polypeptide from male accessory glands which triggers maturation of tick spermatozoa. *International Journal of Invertebrate Reproduction*. 5: 129-137.
98. Smith A., Guo X., de la Fuente J., Naranjo V., Kocan K.M. & Kaufman W.R. 2009. The impact of RNA interference of the subolesin and voraxin genes in male *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on female engorgement and oviposition. *Experimental and Applied Acarology*. 47(1):71-86.
99. Sonenshine D.E. 1991. *Biology of Ticks*. Oxford: Oxford University Press, pp.
100. Solomon K.R., Mango C.K.A. & Obenchain F.D. 1982. Endocrine mechanisms in ticks: effects of insect hormones and their mimics on development and reproduction. In: *Physiology of Ticks*. Obenchain F.D. & Galun R. (Eds). Oxford: Pergamon, pp.399-438.
101. Sorgine M.H., Logullo C., Zingali R.B., Paiva-Silva G.O., Juliano L. & Oliveira P.L. 2000. A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. *Journal of Biological Chemistry*. 275(37): 28659-28665.
102. Stanley D. 2006. Prostaglandins and other eicosanoids in insects: biological significance. *Annual Review of Entomology*. 51: 25-44.
103. Thompson D.M., Khalil S.M.S., Jeffers L.A., Ananthapadmanaban U., Sonenshine D.E., Mitchell R.D., Osgood C.J., Apperson C.S. & Roe R.M. 2005. In Vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). *Journal of Insect Physiology*. 51(10): 1105-1116.
104. Thompson D.M., Khalil S.M.S., Jeffers L.A., Sonenshine D.E., Mitchell R.D., Osgood C.J. & Roe R.M. 2007. Sequence and the developmental and tissue-specific regulation of the first complete vitellogenin messenger RNA from ticks responsible for heme sequestration. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. 37(4): 363-374.
105. Tufail M. & Takeda M. 2005. Molecular cloning, characterization and regulation of the cockroach vitellogenin receptor during oogenesis. *Insect Molecular Biology*. 14(4): 389-401.
106. Wainwright G. & Rees H.H. 2001. Hormonal regulation of reproductive development in crustaceans. In: *Environment and Animal Development*. Atkinson D. & Thorndyke M. (Eds). Oxford: Bios, pp.71-84.

- 107. Weiss B.L. & Kaufman W.R. 2001.** The relationship between 'critical weight' and 20-hydroxyecdysone in the female ixodid tick, *Amblyomma hebraeum*. *Journal of Insect Physiology*. 47: 1261-1267.
- 108. Weiss B.L. & Kaufman W.R. 2004.** Two feeding-induced proteins from the male gonad trigger engorgement of the female tick *Amblyomma hebraeum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101(16): 5874-5879.
- 109. Zhu X.X. & Oliver Jr. J.H. 1991.** Immunocytochemical localization of an insulin-like substance in the synganglion of the tick *Ornithodoros parkeri* (Acari: Argasidae). *Experimental and Applied Acarology*. 13(2): 153-159.
- 110. Zhu X.X., Oliver Jr. J.H. & Dotson E.M. 1991.** Epidermis as the source of ecdysone in an argasid tick. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 88(9): 3744-3747.

