

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

MARINA AMARAL XAVIER

**METABOLISMO DE LIPÍDEOS NA REPRODUÇÃO DE CARRAPATOS**

PORTO ALEGRE, 2019

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

Metabolismo de lipídeos na reprodução de carrapatos

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

Orientador: Dr. Carlos Termignoni

Co-orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior

Porto Alegre, novembro de 2019

## **Instituições e Fontes financiadoras**

Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brasil.

Fontes financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brasil.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brasil.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia–Entomologia Molecular (INCT-EM), Brasil.

Fundação de amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Brasil.

## **Agradecimentos**

Ao prof. Termignoni, que há 6 anos me recebeu para estagiar em seu laboratório. Obrigada pelas oportunidades, por ter confiado em mim e pelos inúmeros ensinamentos ao longo desses anos.

Ao prof. Itabajara, que me acolheu em seu laboratório, onde desenvolvi a maior parte do meu projeto de doutorado. Obrigada pelas oportunidades e por estar sempre pronto e disposto a ajudar.

Aos colaboradores externos, prof. Marisa Farber e Antonio Pinto, pela contribuição à execução de experimentos.

Ao prof. Alexandre Macedo, pela colaboração, pelo suporte para realização de experimentos e por sempre estar aberto e disposto à discussão de ideias.

Aos meus colegas de laboratório, que dividiram angústias e alegrias e que tornaram os dias de trabalho mais alegres e divertidos. Todos de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho. Um agradecimento especial à minha colega e amiga Flávia, presente desde o mestrado, mas que neste último ano dedicou seu tempo e me ajudou muito.

À minha família, em especial aos meus pais, ao Caio e à minha dinda, pelo incentivo e apoio incondicional.

Às agências de fomento pelo incentivo financeiro para a execução de projetos e pelas bolsas.

Muito obrigada!

## Resumo

Carrapatos são artrópodos parasitas e também vetores de patógenos de risco à saúde humana e animal. Dentre as espécies de carrapato de importância econômica mundial, destaca-se o *Rhipicephalus microplus*. Este causa prejuízos anuais à pecuária, estimados em 3,4 bilhões de dólares no Brasil. Acaricidas químicos são mundialmente usados para o controle deste carrapato, sendo a principal ferramenta para seu controle. No entanto, devido a seleção de populações resistentes a maioria dessas drogas e a possibilidade da persistência de resíduos de acaricidas nos produtos de origem animal, métodos alternativos de controle são necessários. Para isso, uma das estratégias é a identificação de componentes de vias fisiológicas que são cruciais para o desenvolvimento do parasito e que possam ser alvos para desenvolvimento de métodos de controle. Nesse sentido, esta tese tem dois objetivos principais, (i) elucidar o papel do órgão de Gené (GO) na reprodução de carrapatos, e (ii) testar a hipótese que propõe que interferir no metabolismo de lipídeos, especificamente no de colesterol, prejudica o desempenho reprodutivo do carrapato. O GO é uma estrutura exclusiva de carrapatos e fundamental no processo de oviposição, pois secreta a cera protetora que recobre os ovos. No Capítulo 1, o metabolismo de lipídeos no GO foi analisado antes e durante a oviposição, por meio de ferramentas “ômicas”. Estes dados confirmam o papel indispensável do GO na reprodução dos carrapatos, tanto por sintetizar lipídeos quanto secretar a cera. O GO apresenta uma maquinaria para síntese, alongamento, modificação, oxidação e secreção de ácidos graxos, além de modificação, degradação e secreção de esteroides. Devido aos carrapatos não possuírem enzimas da via de síntese de colesterol, propõe-se a hipótese de que componentes de uma via essencial e sem redundância podem ser alvo para manipulações que interfiram na viabilidade do carrapato, sendo a base para novos métodos de controle. Assim, o Capítulo 2 mostra que a administração de inibidores (ezetimibe e avasimibe) de proteínas envolvidas no metabolismo de colesterol reduz a capacidade reprodutiva das fêmeas, prejudica o desenvolvimento dos ovos e os tornam mais suscetíveis à colonização por bactérias. Os resultados desta tese mostram que o metabolismo de lipídeos, especificamente de colesterol obtido da dieta, é uma via com potencial para ser usada como alvo para o controle de carrapatos.

## Abstract

Ticks are parasitic arthropods and vectors of human and animal health-threatening pathogens. Among the tick species of worldwide economic importance, *Rhipicephalus microplus* is noticeable. In Brazil, annual losses related to this tick are estimated to be 3.4 billion dollars. Chemical acaricides are the main and globally used tool to control this tick. However, the selection of populations resistant to most of these drugs, and the possibility of acaricide residues persistence in animal products encourage research for new control methods. So, one strategy relies on the identification of components with a role in physiological pathways that are crucial to parasite life, and that could be useful to develop control methods. Thus, this thesis has two aims, (i) to elucidate the Gené's organ (GO) role in tick reproduction, and (ii) to prevent tick reproduction by interfering in lipids metabolism, precisely in cholesterol metabolism. GO is a particular structure of ticks and is elementary for the egg laying process, since it secretes the protective wax that covers the eggshell. In Chapter 1, the GO lipid metabolism was analyzed before and during oviposition, through "omics" tools. These data confirm the indispensable role of this organ for tick reproduction, either by synthesizing lipids or secreting the wax. GO presents machineries to synthesize, elongate, modify, oxidize and secrete fatty acids, as well as modify, degrade and secrete steroids. Since ticks do not synthesize cholesterol, the hypothesis is that components of a fundamental and not redundant pathway could be an approach in order to interfere in tick viability and be used as the basis for a new control method. Therefore, Chapter 2 shows that administering inhibitors (ezetimibe and avasimibe) of proteins involved in cholesterol metabolism reduces the reproductive capacity of females, impairs egg development and make them more susceptible to bacterial colonization. Results presented in this thesis show that cholesterol metabolism a pathway is suitable to be used as target for tick control.

## Lista de Abreviaturas

ACAT	Acil-CoA aciltransferase
ACBP	Proteína de ligação à acil-CoA
ACC	Acetil-CoA carboxilase
AG	Ácido graxo
AGS	AG sintase
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP
ATGL	TAG lipase do adipócito
ATP	Adenosina trifosfato
CNA	Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil
CoA	Coenzima A
COL	Colesterol
COL-E	Colesterol esterificado
DAG	Diacilglicerol
DGAT	DAG aciltransferase
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ERK	Proteína quinase regulada por sinalização extracelular
FATP/ACSVL	Proteínas transportadoras de AG/acil-CoA sintetase de cadeia muito longa
FL	Fosfolípídeo
G3P	Glicerol 3-fosfato
GO	Órgão de Gené
GPAT	G3P aciltransferase
HeLp	<i>Heme lipoprotein</i>
MAG	Monoacilglicerol
NPC	Proteína Niemann-Pick C
NPC1L1	Proteína Niemann-Pick C1 like-1
OBP	Proteínas ligadoras de oxisteroides
PAP	Fosfatidato fosfohidrolase
RmLCP	<i>R. microplus lipid-apolipoprotein complex</i>
SCP	Proteínas carreadoras de esteróis
SENAR	Serviço Nacional de Aprendizagem Rural
TAG	Triacilglicerol

## Sumário

1. Introdução.....	9
1.1. O carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	10
1.2. Oôgenese e oviposição.....	14
1.3. Órgão de Gené .....	15
1.4. A cera que recobre os ovos .....	21
1.5. Metabolismo de lipídeos em vertebrados: absorção de lipídeos da dieta.....	23
1.5.1. Inibidores da absorção de colesterol da dieta .....	27
1.6. Metabolismo de lipídeos em insetos e insetos hematófagos.....	29
1.6.1. Absorção de lipídeos da dieta em insetos hematófagos.....	32
1.7. Metabolismo de lipídeos em carrapatos.....	34
2. Objetivo .....	37
3. Resultados.....	38
3.1. Capítulo 1.....	39
3.2. Capítulo 2.....	51
4. Discussão.....	68
5. Conclusão .....	72
Referências .....	73
Anexo A.....	81



## 1. Introdução

Carrapatos foram os primeiros artrópodos a serem conhecidos como vetores de patógenos. Juntamente aos mosquitos, os carrapatos são os principais agentes vetores de doenças humanas e animais. Os mosquitos são os vetores de patógenos que infectam mais pessoas e que causam as mais severas infecções humanas e animais (como malária, dengue e febre amarela). Por outro lado, os carrapatos transmitem uma variedade ainda maior de agentes patogênicos, incluindo vírus, bactérias e protozoários (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012; SONENSHINE; ROE, 2013).

O risco à saúde humana e animal por infecções transmitidas por carrapatos tem atraído atenção dos setores médicos e veterinários desde 1893, quando pela primeira vez foi demonstrada a transmissão de um patógeno (*Babesia bigemina*) por um artrópodo (*Boophilus annulatus*) para um hospedeiro mamífero (bovino) (BOCK et al., 2004). Existem no mínimo 17 doenças que acometem o homem cujos agentes são transmitidos por carrapatos, distribuídas pela Europa, América do Norte, Ásia, África, Austrália, América Central e América do Sul (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Carrapatos são também importantes parasitos-vetores para animais selvagens e domésticos, que inclusive podem servir como reservatórios para amplificação de alguns dos patógenos humanos. Dentre as zoonoses transmitidas por carrapatos está a babesiose, causada pelo protozoário *Babesia divergens*, a erliquiose, causada pela bactéria *Ehrlichia canis* e a borreliose, causada pela bactéria *Borrelia* spp. (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012). Além da importância do carrapato como vetor, o parasitismo de algumas espécies pode causar severas condições aos hospedeiros, como paralisia, toxicose, irritação e alergia. Reações severas podem ser observadas no local da picada, como prurido, abscessos bacterianos secundários e uma variedade de reações causadas por respostas imunológicas (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

O impacto dos carrapatos na pecuária está relacionado tanto ao parasitismo quanto às doenças causadas pelos patógenos que eles transmitem. Mesmo se não for considerado o papel dos carrapatos como vetores de patógenos, somente os efeitos diretos causados pela infestação destes parasitos são prejudiciais para os animais, afetando economicamente a produção pecuária. No entanto, fatores como a espécie de carrapato envolvida, as condições climáticas do local e a suscetibilidade do hospedeiro devem ser considerados para estimar os potenciais danos à produção. As infestações por carrapatos afetam a produção animal

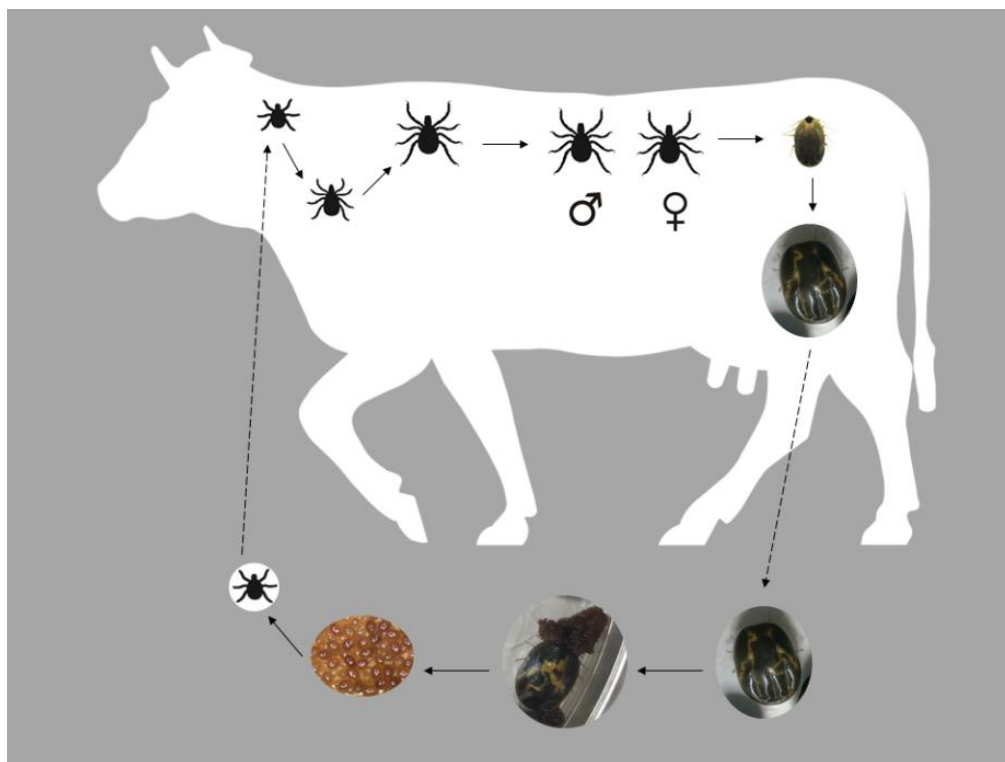
principalmente nas regiões subtropicais do globo, como África, Ásia, América Latina e Oceania (HURTADO; GIRALDO-RÍOS, 2019; JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Segundo informações da CNA (Confederação da Agricultura e Pecuária do Brasil) e do SENAR (Serviço Nacional de Aprendizagem Rural), o Brasil possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, com 220 milhões de cabeças de gado (ano base 2017). Em 2017, foram exportados 1,4 milhões de toneladas de carne (CNA, SENAR) e produzidos 35,1 bilhões de litros de leite (EMBRAPA). A infestação pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* é um dos principais problemas econômicos que afetam a produção bovina no Brasil. Estima-se que as potenciais perdas econômicas devido a esta espécie de carrapato, considerando bovinos de corte e de leite não-tratados, seriam de 3,24 bilhões de dólares no Brasil (GRISI et al., 2014). As características climáticas brasileiras são um dos fatores que favorecem o desenvolvimento deste parasito e, apesar da diversidade no clima entre os estados, o *R. microplus* está presente em todos eles (PEREIRA; SOUZA; BAFFI, 2010). Apenas os dois municípios mais ao sul do Brasil (Chuí e Santa Vitória do Palmar) são zonas naturalmente livres de *R. microplus*.

### **1.1. O carrapato *Rhipicephalus microplus***

Os hospedeiros do *R. microplus* são animais de pecuária (*Bos indicus*, *B.taurus* e eventualmente *Equus caballus*) e ruminantes silvestres de regiões subtropicais e tropicais (MCCOY; LÉGER; DIETRICH, 2013). Este carrapato é originado do sudeste da Ásia e devido ao transporte de gado, foi amplamente distribuído pelos trópicos e regiões subtropicais durante a primeira metade do século XIX, incluindo Austrália, África, América Latina, México e Estados Unidos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004; MCCOY; LÉGER; DIETRICH, 2013). No Brasil, é considerado o segundo parasito de maior impacto econômico para produtividade e bem-estar animal no país, estando atrás apenas do conjunto de nematódeos gastrointestinais (GRISI et al., 2014).

Enquanto muitas espécies de carrapato parasitam mais de um hospedeiro, *R. microplus* é um parasito monóxeno, ou seja, parasita um único hospedeiro durante seu ciclo de desenvolvimento, o qual compreende um período de parasitismo e um período de vida livre (Fig. 1).



**Figura 1: Ciclo de vida do *Rhipicephalus microplus*.** Na fase de vida parasitária, o carrapato passa pelas fases de larva, ninfa e adulto. Após terminar a hematofagia, as fêmeas desprendem-se do hospedeiro e iniciam a fase de vida livre, na qual as fêmeas fazem a postura de ovos. Após a eclosão das larvas, o ciclo reinicia. Adaptado de XAVIER et al. (2018).

Larvas infestantes de *R. microplus* ficam aglomeradas no pasto, abrigadas sob a vegetação. A presença do hospedeiro é sentida principalmente por sua emissão de CO<sub>2</sub>, que estimula as larvas a subirem ao topo da vegetação para o encontrarem (SONENSHINE; ROE, 2013). A instalação da larva no hospedeiro marca o início do período de parasitismo, que tem duração de 18 a 26 dias (ROCHA, 1998). Uma vez no hospedeiro, as larvas buscam fixar-se em um local onde a pele seja menos espessa. Os carrapatos usam suas quelíceras para cortar a pele do hospedeiro, onde inserem o aparato bucal e, em seguida, secretam o cimento dentro e acima do local da lesão. Quando completamente fixados no local da ferida iniciam o repasto de fluido linfático e em seguida de sangue (SONENSHINE; ROE, 2013). Caso a larva não encontre um hospedeiro, ela retorna ao abrigo da pastagem e espera por nova oportunidade. No verão, *R. microplus* pode sobreviver algumas semanas sem alimentar-se. Enquanto no inverno, este período pode ser estendido para pelo menos seis meses (ROCHA, 1998).

No hospedeiro, as larvas sofrem muda para ninfa e depois para adulto. É na fase de vida adulta que ocorre o dimorfismo sexual. Durante o período de parasitismo as fêmeas do carrapato permanecem com o aparato bucal fixado ao hospedeiro graças a presença do cimento, uma matriz constituída majoritariamente por proteínas ricas em glicina, metaloproteases e inibidores de proteases (BULLARD et al., 2016; HOLLMANN et al., 2018). Os machos também se alimentam de sangue, porém em quantidades muito menores do que as fêmeas, não permanecem fixados ao hospedeiro por muito tempo e ao fim do repasto sanguíneo buscam as fêmeas para o acasalamento (ROCHA, 1998).

Ao terminarem a hematofagia (18 a 26 dias após a fixação no hospedeiro), as fêmeas desprendem-se do hospedeiro e caem ao solo, dando início ao período de vida livre. Durante dois a três dias, há uma fase de pré-postura, na qual as fêmeas buscam por um abrigo úmido e protegido da luz sob a vegetação, para dar início a postura de ovos. A postura dura de 17 a 30 dias, sendo que cada fêmea gera 2.000 - 3.000 ovos, e em seguida morre. O tempo de incubação dos ovos até a eclosão das larvas varia entre 22 e 30 dias, em condições ideais de umidade e temperatura. No entanto, em condições não ideais, a incubação pode se prolongar por mais de 100 dias (ROCHA, 1998).

Os principais prejuízos relacionados com a infestação por *R. microplus* em rebanhos bovinos são diminuições na produção de carne e de leite. Além disso, há diminuição na qualidade do couro, pois no local de fixação do parasito há formação de cicatrizes, devido a reações inflamatórias, que podem ser vistas mesmo após o curtimento do couro. A isso se somam prejuízos indiretos, pois esse carrapato é vetor do complexo de doenças hemolíticas conhecido como tristeza parasitária bovina, os protozoários *Babesia bigemina* e *B. bovis*, e a bactéria *Anaplasma marginale*.

Atualmente, o uso de acaricidas químicos é o método mundialmente mais usado para o controle do carrapato *R. microplus*. As principais classes de acaricidas usadas são piretroides, organofosfatos, amidinas, fenilpirazoles, reguladores de crescimento e lactonas macrocíclicas (RODRIGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). No entanto, resíduos químicos derivados desses acaricidas contaminam o ambiente e os produtos destinados ao consumo humano e de demais animais. Além disso, o uso extensivo de acaricidas químicos é fator importante na seleção de populações de carrapato resistentes a essas drogas, e essa resistência torna o controle químico ineficaz como a única estratégia para um programa sustentável de controle de carrapatos e das doenças transmitidas por carrapatos (ALMAZAN et al., 2018).

Assim, é crescente a necessidade de estudos que levem ao desenvolvimento de novos métodos de controle.

A busca por ferramentas mais seguras, como compostos menos tóxicos e também nanopartículas para entrega de acaricidas, permitindo o uso de doses menores, são alternativas sugeridas para melhorar o controle do carrapato (BANUMATHI et al., 2017; PAVELA et al., 2016). No entanto, essas abordagens não têm tido sucesso, indicando que são necessários mais estudos para confirmar que possuam potencial para uso no controle de populações de carrapato (PAVELA et al., 2016). O uso de micro-organismos entomopatogênicos, como o fungo *Metarhizium anisopliae*, foi proposto como método para o controle do carrapato, pois infectam uma estreita variedade de artrópodes e tem facilidade de produção em massa (AW; HUE, 2017; LEEMON; TURNER; JONSSON, 2008; NARDONI et al., 2018; POLAR et al., 2005; SANTI et al., 2010). Contudo, biopesticidas contendo *M. anisopliae* não são eficientes em matar carrapatos no estágio de vida parasitário, possivelmente devido à alta temperatura da superfície da pele do hospedeiro (LEEMON; TURNER; JONSSON, 2008). A raça do bovino também é um fator que poderia influenciar na eficiência deste fungo sobre a mortalidade de carrapatos. Assim, ainda são necessários mais estudos para verificar se há melhor eficiência na aplicação do fungo durante as fases de vida parasitária ou livre (AW; HUE, 2017).

Outra opção é o controle imunológico usando vacinas. A primeira vacina comercial contra *R. microplus* (que também foi a primeira vacina contra qualquer ectoparasito) teve como base a glicoproteína Bm86 (WILLADSEN et al., 1989). Essa proteína está presente na membrana plasmática das células epiteliais do intestino deste carrapato e participa nos eventos de endocitose. Bm86 recombinante foi utilizada como antígeno vacinal para formulação da vacina TickGard (WILLADSEN et al., 1995) (produzida da Austrália) e da Gavac (RODRÍGUEZ et al., 1994) (produzida em Cuba). Em alguns casos, essas vacinas conferem uma proteção parcial contra infestações de carrapato, podendo reduzir o uso de acaricidas químicos. No entanto, a eficiência dessa vacina a campo varia de 51 a 91%, refletindo uma variação na proteção do bovino a diferentes populações de *R. microplus* e de outros atributos do hospedeiro, como raça e estado nutricional (PATARROYO et al., 2002; RODRÍGUEZ et al., 1995). Essa variação está relacionada a heterogeneidade na sequência codificadora da Bm86 em diferentes populações de *R. microplus*, limitando o uso deste antígeno e das vacinas comerciais em diferentes países como método alternativo de controle do carrapato (GARCÍA-GARCÍA et al., 1999). Inclusive, foi proposto reclassificar o

carrapato de bovinos em duas espécies, *R. microplus* (América e África) e *R. australis* (Austrália), devido a diferenças nas características morfológicas, parâmetros reprodutivos e constituição genética entre as populações de carrapato nestas regiões (ALI et al., 2016; LABRUNA et al., 2009). Dessa forma, ainda é necessário procurar por antígenos vacinais que possam melhorar a eficiência da atual vacina comercial contra o carrapato *R. microplus* (PARIZI et al., 2012).

Os avanços nas tecnologias “ômicas” (como genômica, transcritômica e proteômica) oferecem uma abordagem na busca por antígenos vacinais diferente daquela usada no desenvolvimento das vacinas tradicionais em uso. Esta metodologia é chamada de vacinologia reversa, e é baseada na genômica funcional, bioinformática e biologia de sistemas (VALLE; GUERRERO, 2018). Selecionar componentes de vias fisiológicas que são cruciais para o desenvolvimento do parasito, através da associação de ferramentas “ômicas” com ferramentas que permitam identificar a função gênica, é uma estratégia que pode ser útil para o desenvolvimento de métodos de controle do carrapato.

## **1.2. Oôgenese e oviposição**

Oôgenese é o termo utilizado para o processo de desenvolvimento das células sexuais femininas (oócitos) nos ovários, sendo que a formação dos oócitos é a etapa inicial do processo de embrião. Por outro lado, vitelogênese é o processo em que o ovário e tecidos extraovarianos produzem precursores proteicos e outras moléculas que são transportados e acumulados dentro dos oócitos (ESTRELA et al., 2010).

O ovário do *R. microplus* é uma estrutura em formato de U, localizado na região posterior, possui um par de ovidutos, útero, tubo muscular, vagina, receptáculo seminal, glândulas acessórias tubulares e lobulares, e abertura genital (SONENSHINE; ROE, 2013). Após a fertilização, o ovário apresenta oócitos em todos os estádios de desenvolvimento e que são processados simultaneamente, o que caracteriza seu desenvolvimento assíncrono.

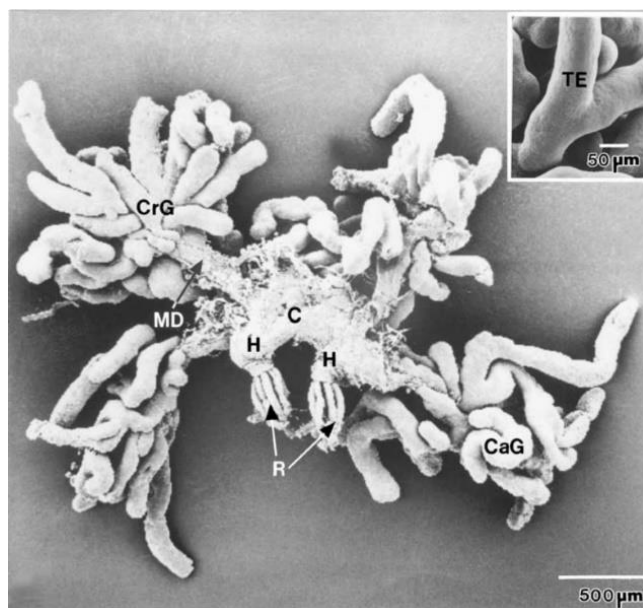
Em carrapato, a oogênese ocorre durante a hematofagia e está correlacionada com o status da alimentação e o acasalamento, de forma que se um destes é interrompido há inibição da oogênese e reabsorção do vitelo (SONENSHINE; ROE, 2013). Não se conhece o local exato onde há união dos gametas feminino e masculino para formação do ovo. Aparentemente, ocorre quando o oócito, pronto para ser ovulado (oócito tipo V), encontra-se no lúmen do ovário ou no oviduto. Quando o espermatozoide maduro penetra na célula feminina, os pró-núcleos permanecem separados. A primeira divisão meiótica ocorre ainda

quando o oócito binucleado passa pelo trato reprodutivo da fêmea. A segunda divisão meiótica ocorre após a postura do ovo, quando também há a fusão dos núcleos (BALASHOV, 1972; DIEHL; AESCHLIMANN; OBENCHAIN, 1982).

Durante o período de pré-postura, ocorrem mudanças significativas no trato genital da fêmea. As contrações peristálticas dos músculos cervicais da vagina empurram o ovo até o vestíbulo da vagina, enquanto secreções das glândulas lobulares são depositadas na casca do ovo. Quando o ovo encontra-se no vestíbulo da vagina, há a expansão e prolapso deste pelo poro genital e o ovo é imediatamente entregue ao órgão de Gené (GO) (SIEBERZ; GOTHE, 2000; SONENSHINE; ROE, 2013), o qual finaliza a postura do ovo recobrando-o com uma camada de cera que é essencial para o desenvolvimento dos ovos (LEES; BEAMENT, 1948). O GO é uma estrutura exclusiva de carrapatos Ixodidae e Argasidae, não estando presente em outros artrópodes.

### **1.3. Órgão de Gené**

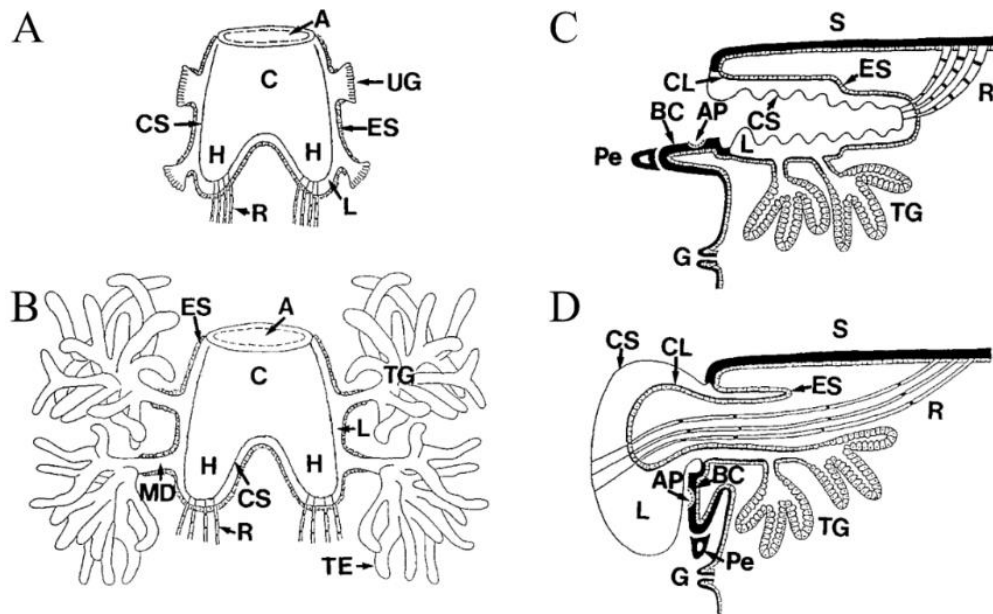
A importância do GO (Fig. 2) para a postura dos ovos é conhecida desde as primeiras descrições, por Gené em 1848, sobre postura de ovos de carrapatos, possivelmente em estudos com o carrapato *Ixodes ricinus*. O fato de estar ausente em machos também sugere a relevância deste órgão para a postura de ovos. Gené observou (1848) que ao espetar o GO com uma agulha os ovos liberados murchavam em seguida. Semelhantemente, Bertkau (1881) observou que ao evitar o contato entre GO e os ovos liberados pelo poro genital, por meio do toque ao órgão com um bastão de vidro, o GO retraía-se rapidamente e os ovos murchavam (LEES; BEAMENT, 1948). Isso levou à conclusão de que a secreção pelo GO da cera protetora que recobre os ovos é essencial para a viabilidade dos ovos no ambiente, mas não para que ocorra a postura destes.



**Figura 2: Órgão de Gené de *Dermacentor reticulatus*.** Microscopia eletrônica de varredura do órgão dissecado de fêmea durante a postura de ovos. C: corpo; CaG: glândula tubular caudal; CrG: glândula tubular cranial; H: braços; MD: duto eferente principal; R: músculos retratores; TE: extremidade tubular ramificada. Imagem de SCHÖL et al. (2001).

Estudos sobre a organização estrutural e morfologia do GO foram feitos nas espécies *Haemaphysalis dromedarii* (EL SHOURA, 1987), *Ornithodoros erraticus* (EL SHOURA, 1988), *R. microplus* e *R. appendiculatus* (BOOTH, 1989), *H. longicornis* (KAKUDA; MÖRI; SHIRAIISHI, 1992), *Dermacentor reticulatus* (SCHÖL et al., 2001) e *A. sculptum* (DOS SANTOS et al., 2018). A estrutura do GO consiste em um saco duplo, com sacos epiteliais externos e sacos cuticulares internos (Fig. 3A e B). Nas fêmeas não alimentadas (Fig. 3A), há o corpo, 2 braços posteriores e glândulas não desenvolvidas com formato de dedos em cada lateral. Durante a postura de ovos (Fig. 3B), a morfologia e ultraestrutura é basicamente a mesma, porém também contém corpo e braços maiores, e as glândulas não desenvolvidas diferenciam-se para formar glândulas tubulares, as quais se abrem para o lúmen entre o saco epitelial externo e o saco cuticular interno (SCHÖL et al., 2001). As figuras 3C e D ilustram lateralmente o posicionamento das estruturas durante a eversão e retração do GO na postura dos ovos.

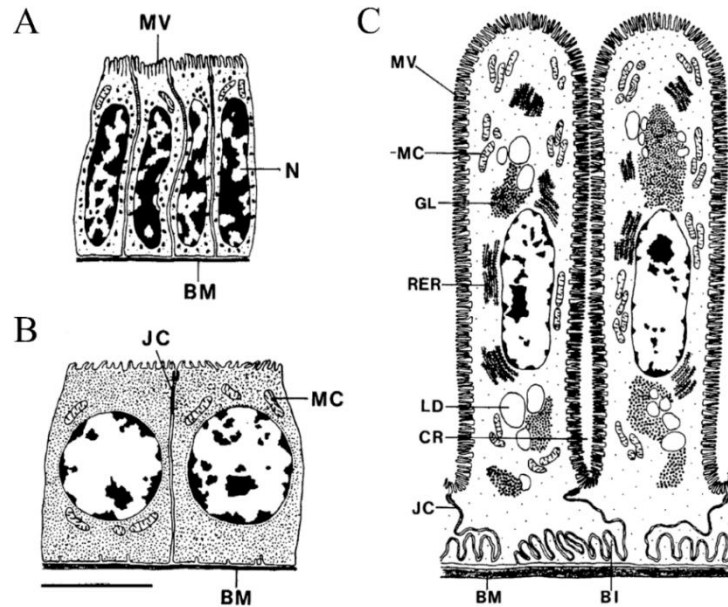




**Figura 3: Diagrama do órgão de Gené de *Dermacentor reticulatus*.** A) fêmea não alimentada. B) fêmea durante a postura. C) vista lateral da retração do órgão de Gené durante a postura. D) vista lateral da retração do órgão de Gené. AP: área porosa; BC: base do capítulo; C: corpo; CL: camada cuticular; CS: saco cuticular; ES: saco epitelial; G: abertura genital; H: braços; L: lúmen entre os sacos epitelial e cuticular; MD: principal ducto eferente das glândulas; Pe: pedipalpos; R: músculos retratores; S: escudo; TE: terminais das glândulas tubulares; TG: glândulas tubulares; UG: glândulas não-desenvolvidas. Adaptado de SCHÖL et al. (2001).

As glândulas tubulares do GO desenvolvem-se em quatro cachos de grandes glândulas tubulares ramificadas que estão conectadas com os braços do GO por dois pares de dutos. A figura 4 destaca, em formato de diagrama, as mudanças na morfologia dessas glândulas durante a alimentação do carrapato Ixodidae *H. longicornis*. Nas fêmeas não alimentadas (Fig. 4A), as células são pobres em número de organelas, possuem microvilosidades subdesenvolvidas e são ocupadas basicamente com o núcleo, o qual tem formato irregular com densos aglomerados heterocromáticos. No início da alimentação (Fig. 4B), as células se tornam cuboidais, o núcleo é arredondado e com menos heterocromatina, há aumento do número de ribossomos e as microvilosidades ainda não estão desenvolvidas. Por outro lado, quando a fêmea se encontra no período de postura (Fig. 4C), as células possuem um tamanho aproximadamente duas vezes maior do que no início da alimentação, e o núcleo é ovalado. As microvilosidades completaram o desenvolvimento e são delgadas e ramificadas, e o

citoplasma contém numerosas mitocôndrias e partículas de glicogênio, gotículas de lipídeos e retículo endoplasmático rugoso (KAKUDA; MORI; SHIRAIISHI, 1995).

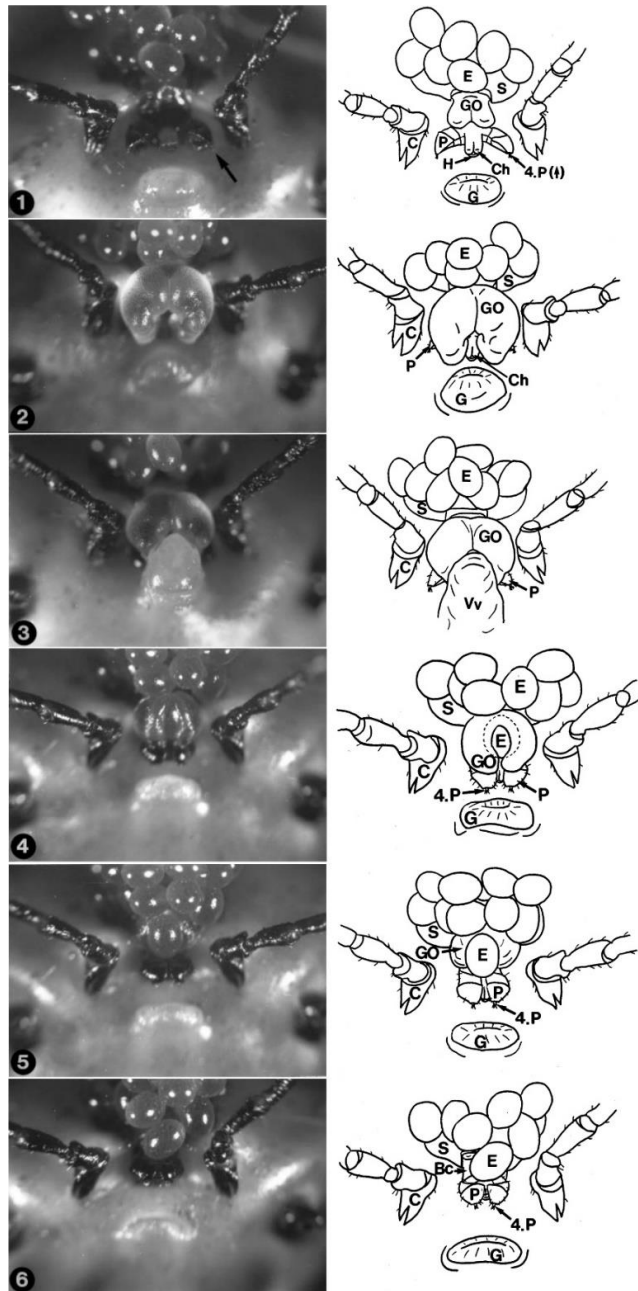


**Figura 4: Diagrama das glândulas tubulares do órgão de Gené de *Haemaphysalis longicornis*.** A) fêmea não alimentada. B) fêmea no início da alimentação. C) fêmea durante a postura dos ovos. BI: interdigitação basal; BM: membrana basal; CR: cripta intercelular; GL: partículas de glicogênio; JC: complexo juncional; LD: gotícula de lipídeo; MC: mitocôndria; MV: microvilosidades; N: núcleo; RER: retículo endoplasmático rugoso. Adaptado de KAKUDA; MORI; SHIRAIISHI (1995).

Outras glândulas, que não fazem parte do GO e são denominadas de glândulas acessórias, parecem participar no processo de postura dos ovos, mas suas funções não estão esclarecidas. A glândula tubular acessória está presente em fêmeas das famílias Ixodidae e Argasidae e estudos de sua ultraestrutura indicam que seu produto seria uma secreção proteica e que teria como função lubrificar o trato genital das fêmeas (KAKUDA et al., 1994; SONENSHINE; ROE, 2013). A segunda glândula acessória é conhecida como glândula lobular acessória, e está presente apenas em fêmeas Ixodidae (KAKUDA et al., 1997; SONENSHINE; ROE, 2013). A função desta glândula parece estar relacionada em facilitar a passagem dos ovos pelo vestíbulo da vagina (KAKUDA et al., 1997) ou secretar lipídeos que fazem parte da casca do ovo (BOOTH, 1992; LEES; BEAMENT, 1948). As áreas porosas (Fig. 3C e D), situadas na superfície dorsal do capítulo, são aberturas para as terceiras

glândulas acessórias, glândulas acinares encontradas somente em fêmeas Ixodidae (BOOTH, 1992; FELDMAN-MUHSAM; HAVIVI, 1960). A função destas glândulas é desconhecida, pois quando a área porosa é bloqueada, não é possível observar efeito algum na postura dos ovos e na eclosão das larvas (BOOTH; BEADLE; HART, 1984; GOTHE; GÖBEL; NEITZ, 1987). No entanto, foi relatado que a composição da cera do ovo é diferente quando há o bloqueio da área porosa (VERMEULEN et al., 1986). Embora essas glândulas auxiliem na produção de componentes da cera, sabe-se que as secreções do GO são os principais constituintes da cera que recobre o ovo (BOOTH, 1992; KAKUDA et al., 1997; SONENSHINE; ROE, 2013).

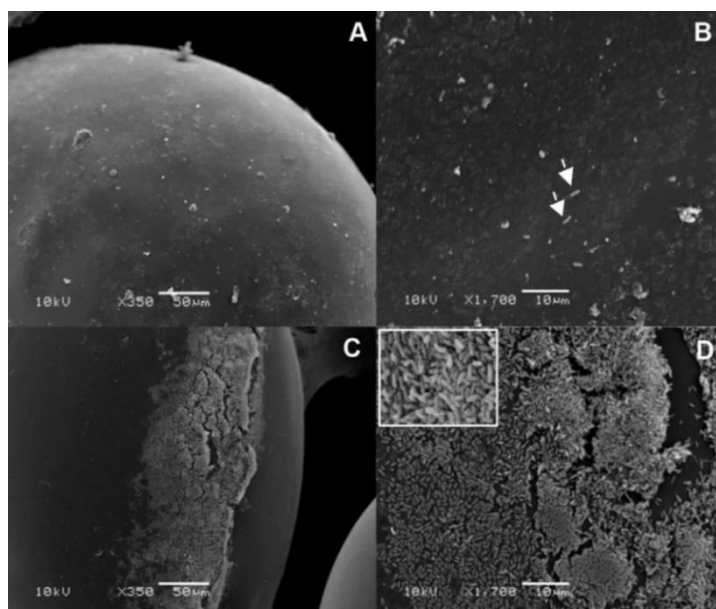
O *modus operandi* do GO para recobrir os ovos com cera foi descrito com base em observações realizadas em *D. reticulatus* (Ixodidae) e *Argas walkerae* (Argasidae). A figura 5 mostra os eventos sucessivos de eversão, contração e retração do GO durante a postura dos ovos, bem como a participação do hipostômio no processo. O mecanismo real de eversão e retração, bem como de secreção da cera durante a postura ainda não é totalmente conhecido, mas é provavelmente devido a um aumento de pressão na hemolinfa, causado pela contração dos músculos dorso-ventrais. A duração desta etapa final da oviposição em *D. reticulatus* pode variar de 4 a 10 minutos, dependendo se é início ou fim do período de postura. Em *A. walkerae*, o *modus operandi* de oviposição difere em alguns aspectos em relação aos ixodídeos, e dura cerca de 27 minutos (EDELDMANN; GOTHE, 2001; SIEBERZ; GOTHE, 2000; SONENSHINE; ROE, 2013).



**Figura 5: Modus operandi da postura de ovos em *Dermacentor reticulatus*.** A postura foi observada com auxílio de um microscópio binocular, com uma câmera fotográfica anexada (imagens à esquerda, 1-6). A representação diagramática dos eventos da postura é observada nas imagens à direita. 1) Pedipalpos (P) abraçando a abertura genital (G) em ambos lados. 2) Máxima eversão do órgão de Gené (GO). 3) O vestíbulo da vagina (Vv) prolapsa, e entra em contato com o órgão de Gené. 4) Ovos (E) abraçados pelos braços do órgão de Gené. 5) Órgão de Gené parcialmente retraído com um ovo. 6) Ovo liberado nos pedipalpos fechados e quelíceras (Ch). Coxa I (C); quarto segmento dos pedipalpos (4.P); hipostômio (H); escudo (S); base do capítulo (Bc). Adaptado de SIEBERZ; GOTHE (2000).

#### 1.4. A cera que recobre os ovos

Os ovos de carrapato só se desenvolvem no ambiente quando estão recobertos pela camada de cera secretada pelo GO. Esta cera, além de protegê-los da perda de água e das condições de humidade e temperatura do ambiente (LEES; BEAMENT, 1948), também possui propriedade antimicrobiana (Fig. 6) (ARRIETA; LESKIW; KAUFMAN, 2006; DE LIMA-NETTO et al., 2012; ESTEVES et al., 2009; POTTERAT et al., 1997; YU et al., 2012; ZIMMER et al., 2013a, 2013b). Ainda, a viscosidade da cera faz com que os ovos se mantenham agrupados, o que reduz a superfície de exposição ao ambiente e, possivelmente, aumenta as demais propriedades protetoras (BOOTH, 1992; LEES; BEAMENT, 1948).



**Figura 6:** Atividade antibacteriana da cera do ovo de *Rhipicephalus microplus*. Microscopia eletrônica de varredura mostrando que o ovo intacto não permite a adesão da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* PA14 (A e B). Por outro lado, quando a cera é removida da superfície do ovo, há adesão e formação de biofilme de *P. aeruginosa* PA14 (C e D). O aumento em D mostra a típica formação de biofilme na superfície dos ovos sem cera. Imagens de ZIMMER et al. (2013a).

A cera dos ovos é composta principalmente por alcanos de cadeia longa, ésteres de ácidos graxos (AG) insaturados (BOOTH, 1992), ésteres de colesterol (COL-E) e colesterol livre (COL) (YU et al., 2012). Em estudo comparativo entre a composição da cera dos ovos e do GO, foi observado que os componentes lipídicos são os mesmos, porém com diferenças

nas quantidades de alguns dos componentes (BOOTH, 1992). Por exemplo, o GO apresenta uma maior proporção de ésteres de AG insaturados do que a cera dos ovos, indicando que estes lipídeos podem ser oxidados durante ou logo após a postura dos ovos. A insaturação desses lipídeos diminui a viscosidade da cera, e assim a função dos braços do GO em recobrir o ovo com cera seria facilitada. Logo após a postura, os lipídeos seriam oxidados, assim diminuindo o grau de insaturação e aumentando o ponto de fusão da cera, tornando-a mais viscosa para a aglomeração dos ovos. No entanto, há possibilidade de que esta diferença na proporção de lipídeos entre GO e cera seja devido à também extração dos lipídeos das membranas das células (BOOTH, 1992). Este mesmo estudo utilizou a injeção de C<sup>14</sup>-acetato em fêmeas durante a postura de ovos para analisar a biossíntese de lipídeos da cera do ovo. Foi sugerido que a síntese de alcanos ocorre no GO pela elongação de AG seguida por descarboxilação, devido a incorporação do acetato em AG e alcanos, juntamente com a alta proporção de alcanos de cadeia longa recuperados da cera do ovo comparado ao GO.

Atividade antimicrobiana em extrato de ovos de carrapato foi descrita pela primeira vez em *R. microplus* por POTTERAT et al. (1997). A molécula responsável por esta atividade consiste em uma unidade de COL sulfatada em C3, com a extremidade da cadeia lateral (C25) oxidada á ácido e em ligação amida com um resíduo de *L*-isoleucina. Esse composto foi denominado boophilina, e possui atividade antifúngica (*Cladosporium cucumerinum*) e antibacteriana por inibição do crescimento de *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli*. Posteriormente, ZIMMER et al. (2013a) extraíram boophilina da cera dos ovos de *R. microplus* e identificaram atividade antibiofilme (biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*) e bactericida sobre *Staphylococcus epidermidis*, ambos patógenos oportunistas frequentemente associados a infecções hospitalares. O mecanismo de ação dessa molécula na inibição da formação de biofilme de *P. aeruginosa* envolve diminuição na transcrição dos genes *cdrA* e *fliC*. Enquanto *fliC* codifica para flagelina, uma proteína estrutural do filamento flagelar, *cdrA* codifica para uma proteína extracelular envolvida na formação do molde de matriz de biofilme. Ainda, outras frações do extrato de cera de ovos de *R. microplus* (ESTEVEZ et al., 2009) possuem atividade antibacteriana, por inibição do crescimento de *Micrococcus luteus*, e atividade antifúngica (*C. albicans*). No entanto, os compostos responsáveis por estas atividades não foram identificados.

A cera de ovos de outras espécies de Ixodidae também possui atividade antimicrobiana. Atividade antiviral (vírus influenza e pirconavírus) foi identificada em extrato da cera dos ovos de *A. cajennense* (DE LIMA-NETTO et al., 2012). Em *A. hebraeum* (ARRIETA;

LESKIW; KAUFMAN, 2006; YU et al., 2012), o ovo íntegro possui atividade antibacteriana que inibe o crescimento de bactérias Gram negativas (*E. coli*, *Serratia marcescens*, *Burkholderia vietnamiensis*, *P. aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*). Por outro lado, o extrato da cera inibe o crescimento de bactérias Gram positivas (*S. epidermidis*, *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* e *M. luteus*). O efeito antibacteriano da fase aquosa do extrato da cera foi estudado usando como modelo *S. epidermidis*. A atividade bactericida identificada possivelmente decorre de um aumento na permeabilidade da membrana celular, já que a membrana torna-se mais fina, embora não seja rompida (ARRIETA; LESKIW; KAUFMAN, 2006). O componente da fase aquosa responsável por esta atividade não foi identificado, mas sabe-se que é resistente ao aquecimento e a mudanças de pH (YU et al., 2012). Na fase orgânica do extrato de cera foi identificado que AG estão associados a atividade de inibição de crescimento bacteriano. Os AG C16:1 e C18:2, ou lipídeos que os contenham, são ativos principalmente contra bactérias Gram positivas, sendo que em maiores concentrações também possuem atividade contra algumas bactérias Gram negativas. Nenhuma atividade antibacteriana foi identificada em frações contendo COL-E ou COL (YU et al., 2012).

Foi proposto que a atividade antibacteriana de AG ocorre principalmente por alvejarem as membranas celulares bacterianas e interromperem processos cruciais para a proteção e função celular. Devido a sua característica anfipática, os AG provocam desestabilização de membrana e formação de poros e, conseqüentemente, um aumento na permeabilidade e lise. Dentre os processos vitais para as células bacterianas que podem ser interrompidos pelos AG estão a cadeia transportadora de elétrons e a fosforilação oxidativa, os quais são essenciais para produção de energia pelas aeróbias. Como esses processos são interconectados, os AG podem interromper a cadeia transportadora de elétrons por ligar-se a carreadores de elétrons ou alterar a integridade da membrana, assim como interferir na fosforilação oxidativa por diminuir o potencial de membrana e o gradiente de prótons. Ainda, AG podem diretamente inibir enzimas das membranas, como glicosiltransferases (YOON et al., 2018). Para compreender a formação da cera e sua função biológica, é fundamental expandir os conhecimentos do metabolismo de lipídeos em carrapatos.

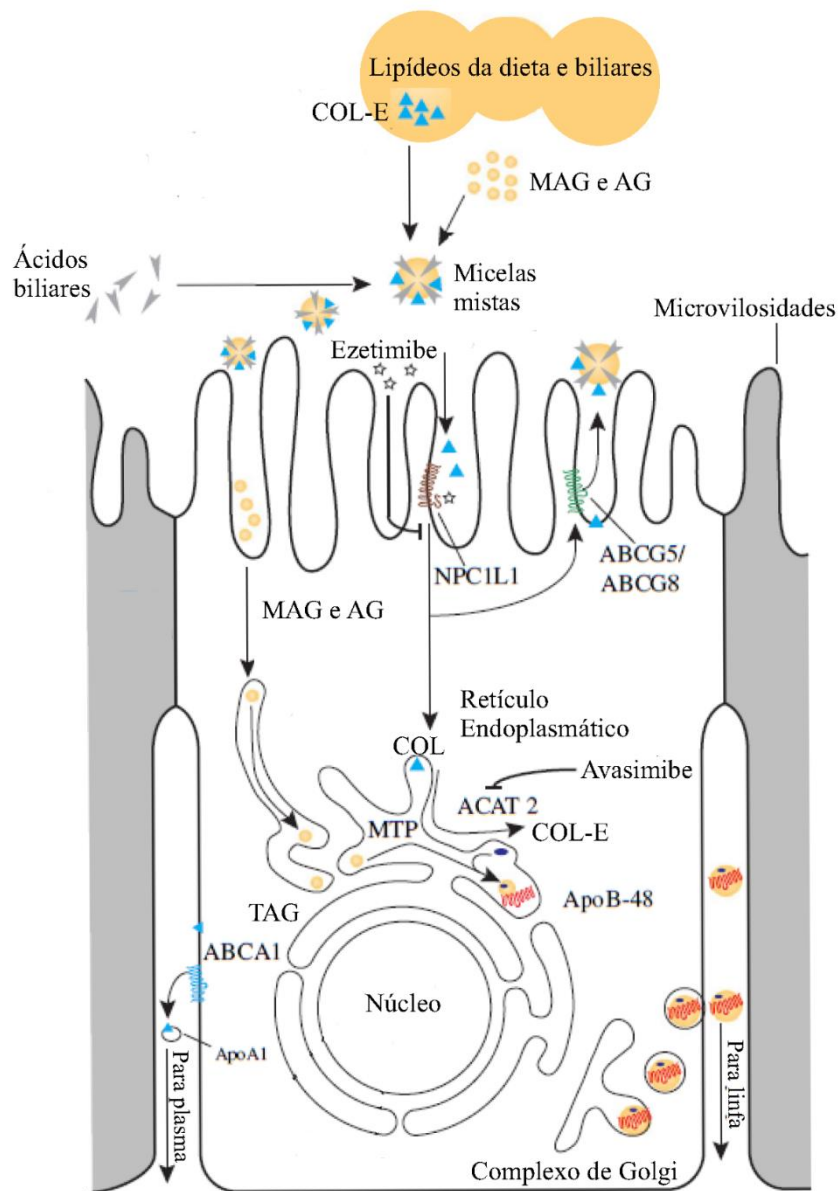
### **1.5. Metabolismo de lipídeos em vertebrados: absorção de lipídeos da dieta**

O metabolismo de lipídeos é melhor conhecido nos organismos vertebrados do que nos invertebrados. Lipídeos constituem a bicamada que compõe as membranas celulares, as quais

formam organelas especializadas dentro da célula e regulam o transporte entre os ambientes intra e extracelular. Além desta função estrutural, também tem função de armazenamento, por exemplo, os AG e os triacilgliceróis (TAG) são fontes de energia para a musculatura cardíaca e esquelética, enquanto os esteroides são fontes para produção de hormônios pelas gônadas e adrenais. Mais especificamente, lipídeos fazem parte do surfactante pulmonar que funciona reduzindo a tensão superficial entre a interface ar-líquido (VELDHUIZEN et al., 1998); formam a bile para facilitar a excreção de metabólitos; fazem parte da mielina garantindo a condução da transmissão nervosa (SCHMITT; CANTUTI CASTELVETRI; SIMONS, 2015). Ainda, os lipídeos são também moléculas sinalizadoras, servindo como alvo das cinases lipídicas que perpetuam cascatas sinalizadoras, substrato para ciclooxigenases e enzimas relacionadas a geração de prostaglandinas (SEMENKOVICH; GOLDBERG; GOLDBERG, 2016).

Estima-se que 20-40% das calorias obtidas diariamente pela dieta humana provém de lipídeos, predominantemente TAG (NGHIEM-RAO; MAVIS; PATEL, 2014), e além da presença no intestino delgado do COL ingerido, o fígado secreta para o intestino ácidos biliares (derivados de COL). A relação entre a síntese *de novo* de COL e a obtenção de COL pela dieta é em cerca de 70:30, sendo que esses valores variam entre os indivíduos de acordo com sua genética e dieta (GRUNDY, 1983; IKONEN, 2008). Após a ingestão de alimentos, as lipases pancreáticas, no lúmen do intestino delgado, hidrolisam os TAG em AG, MAG e DAG, e os COL-E são convertidos em COL e AG. Em seguida, os sais de ácidos biliares emulsionam esses lipídeos, formando micelas, para que os lipídeos possam ser captados pelos enterócitos via proteína transportadora Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1). No ambiente intracelular, os lipídeos são transportados ao retículo endoplasmático, onde os AG são reesterificados em TAG. O COL transportado ao retículo endoplasmático pode ser reesterificado pela acil-CoA aciltransferase 2 (ACAT2) em COL-E ou ser transportado de volta ao lúmen intestinal via transportador ABC (*ATP-binding cassette*) (ABCG5/ABCG8). A combinação entre TAG, COL-E e apolipoproteínas (majoritariamente ApoB-48, ApoC, ApoE, ApoA-I, Apo-AII, Apo-AIV) formam os quilomícrons, os quais são secretados na linfa (NGHIEM-RAO; MAVIS; PATEL, 2014). A figura 7 ilustra o processo de absorção dos componentes lipídicos da dieta.

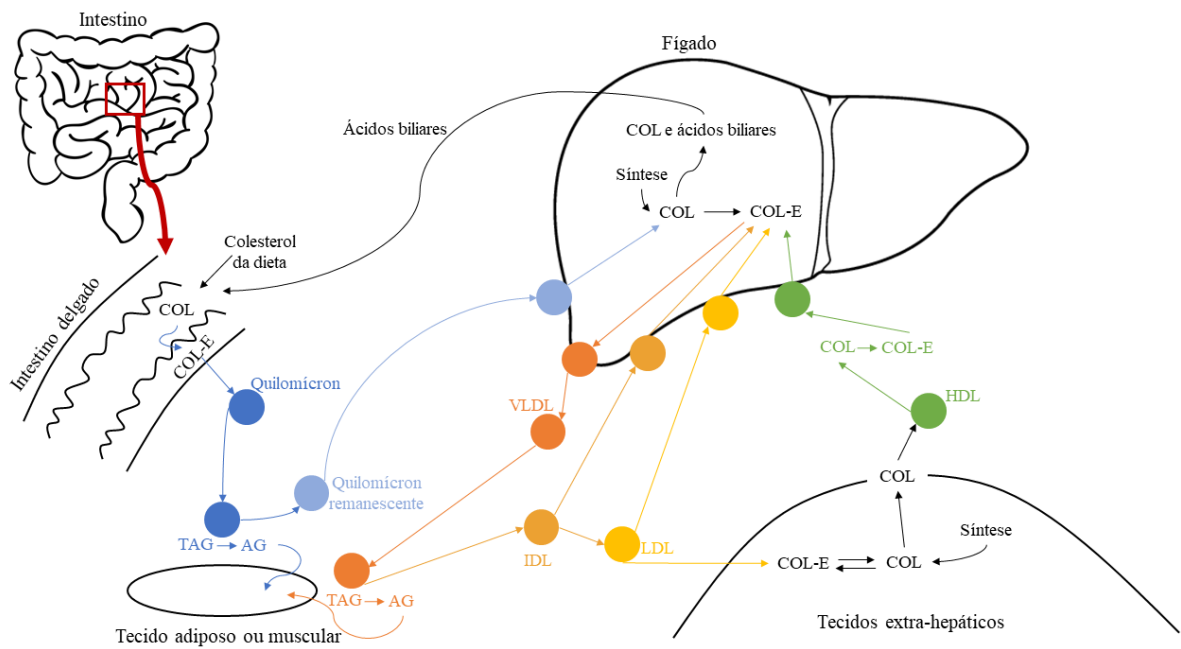




**Figura 7: Absorção gastrointestinal de lipídeos.** Ilustração do processo de absorção até o empacotamento em quilomícrons de ésteres de colesterol (COL-E), monoacilglicerois (MAG) e ácidos graxos (AG) obtidos através da dieta. Niemann-Pick C1-like 1 (NPC1L1); transportadores ABC (ABCG5/ABCG8, ABCA1); acil-coenzima A aciltransferase 2 (ACAT2); proteína de transferência de trigliceróides microssomal (MTP); apolipoproteínas (ApoB-48, ApoA1). Adaptado de LEE et al. (2012).

Os quilomícrons são transportados via sistema linfático e passam então para a corrente sanguínea (NGHIEM-RAO; MAVIS; PATEL, 2014). Estas lipoproteínas circulantes interagem com as lipases lipoproteicas, as quais são mais abundantemente expressas nos

tecidos adiposo e muscular. As lipases lipoproteicas hidrolisam os TAG e os AG liberados são captados via transportadores por células adiposas ou musculares (Fig. 8). Os quilomícrons passam a ser lipoproteínas menores, ricas em COL-E, que transferem Apo-A e Apo-C para outras lipoproteínas e adquirem Apo-E. Por fim, as Apo-E são reconhecidas por receptores no fígado, assim eliminando os quilomícrons remanescentes do plasma (BENITO-VICENTE et al., 2018).



**Figura 8: Transporte do colesterol.** Ilustração do processo de transporte do colesterol obtido da dieta, do intestino delgado para os tecidos de armazenamento (adiposo e muscular) e para o fígado, no qual os quilomícrons fazem o transporte lipídico. O efluxo hepático de colesterol e triacilglicerol é mediado pelas lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), enquanto as lipoproteínas de baixa densidade (LDL) transportam o colesterol para os tecidos periféricos. O transporte reverso de colesterol, dos tecidos extra-hepáticos para o fígado, é mediado pelas lipoproteínas de densidade alta (HDL). Colesterol (COL); ésteres de colesterol (COL-E); triacilgliceróis (TAG); ácidos graxos (AG); IDL (lipoproteínas de densidade intermediária) Adaptado de FIELDING; FIELDING, (1995) e WANG et al. (2017).

O excesso de COL no fígado é secretado via lipoproteínas de densidade muito baixa (VLDL), ricas em TAG e COL-E, para a corrente sanguínea e transportado até os tecidos

periféricos (Fig. 8). As lipases lipoproteicas convertem os TAG dos VLDL em AG no plasma (captados pelos tecidos periféricos), e as lipoproteínas remanescentes são chamadas de IDL (lipoproteínas de densidade intermediária). As IDL podem ser igualmente processadas pelas lipases hepáticas ou formarem lipoproteínas de baixa densidade (LDL) devido a troca de lipídeos e apolipoproteínas com as HDL (lipoproteínas de alta densidade) (BENITO-VICENTE et al., 2018). As LDL são as principais carreadoras de COL no organismo, sendo compostas principalmente por COL-E e ApoB100, transportam o COL do fígado para os tecidos periféricos (Fig. 8). A ligação da LDL à receptores específicos levam a endocitose destas lipoproteínas. Enzimas presentes nos lisossomos hidrolisam os COL-E, liberando COL e AG dentro da célula (SILVA AFONSO et al., 2018).

Por outro lado, o excesso de COL nos tecidos periféricos é removido pelas HDL no chamado transporte reverso do COL (Fig. 8). Transportadores ABC (ABCA1) presentes nas HDL promovem o efluxo de COL que estão nos compartimentos endocíticos da célula. Em seguida, o COL é esterificado pela LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase), formando COL-E, que é transportado ao fígado e posteriormente eliminado nas fezes (na forma de ácidos biliares) (BENITO-VICENTE et al., 2018; WANG et al., 2017).

### **1.5.1. Inibidores da absorção de colesterol da dieta**

A proteína transmembrana NPC1L1 (Fig. 7) tem papel chave na absorção do COL da dieta e na reabsorção de ácidos biliares, sendo expressa nos enterócitos e, em humanos, também nos hepatócitos (BENITO-VICENTE et al., 2018; WANG; SONG, 2012). Por outro lado, a ACAT (Fig. 7) é uma proteína de membrana integral presente em pequenas quantidades no retículo endoplasmático e ela é alostericamente ativada pelo COL, esterificando-o à um AG-acil-CoA de cadeia longa. (CHANG et al., 2009). A atividade da ACAT está implicada em vários processos fisiológicos, como (i) no armazenamento de COL-E nas gotículas de lipídeos celulares, o qual quando em excesso no endotélio das artérias leva a formação de arterosclerose; (ii) os COL-E formados estão envolvidos na montagem e secreção de lipoproteínas; (iii) durante a absorção do COL da dieta no intestino delgado, a formação de COL-E intracelular cria um gradiente de difusão de COL pela membrana do enterócito (LLAVERÍAS; LAGUNA; ALEGRET, 2003).

NPC1L1 é inibida por ezetimibe (Fig. 7) e, assim, a absorção de COL é prejudicada (GARCIA-CALVO et al., 2005). Ezetimibe liga no segundo loop extracelular da NPC1L1 (WEINGLASS et al., 2008). Após ser administrado *in vivo*, ezetimibe sofre glicuronidação e é

reciclado até o local alvo no intestino, e este metabólito glicuronídeo é pelo menos tão potente quanto o próprio ezetimibe em relação à capacidade de inibir a captação de COL (VAN HEEK et al., 1997). Como resultado da inibição de NPC1L1 por ezetimibe há redução na formação e secreção de quilomícrons (lipoproteínas) e a inibição da reabsorção de COL biliar, assim esgotando os estoques de COL no fígado (BENITO-VICENTE et al., 2018). Efetivamente, ezetimibe foi aprovado para uso no tratamento de hipercolesterolemia humana e é geralmente usado em conjunto com estatinas (inibidores de hidroximetilglutaril-CoA redutase, enzima da via de síntese de COL) (GAGNÉ et al., 2002).

O inibidor avasimibe tem como alvo a ACAT (Fig. 7). Efeitos, como por exemplo, (i) a redução de macrófagos espumosos (macrófagos ricos em conteúdo lipídico) *in vitro* por diminuir a captação de LDL oxidada e aumentar o efluxo de COL; (ii) redução da secreção de apolipoproteína B (apolipoproteína primária do LDL) pelo fígado; (iii) sua alta biodisponibilidade oral e; (iv) baixa toxicidade, justificaram a realização de ensaios clínicos com este inibidor (LLAVERÍAS; LAGUNA; ALEGRET, 2003). No entanto, os efeitos do avasimibe em baixar os níveis de COL só foram observados quando coadministrado com estatinas, o que foi considerado insatisfatório para fins terapêuticos (MIYAZAKI; KANOME; WATANABE, 2005). Por outro lado, o efeito inibitório da ACAT por avasimibe vem sendo estudado como alvo para tratamento da doença de Alzheimer, por reduzir a deposição de placas amiloides (HUTTER-PAIER et al., 2004); na terapia antitumoral por reduzir a proliferação celular e induzir apoptose (LEE et al., 2015); e na terapia da hepatite C, por impedir a montagem das partículas do vírus (HU et al., 2017).

O efeito da inibição do metabolismo de COL pelos inibidores ezetimibe e avasimibe já foi estudado em parasitos, especificamente em protozoários. Em *Cryptosporidium parvum*, o tratamento com ezetimibe diminuiu o crescimento do parasito de forma dose-dependente. Foi demonstrado que *C. parvum* desvia o COL micelar internalizado por NPC1L1 nos enterócitos e, assim, o COL da dieta contribui em certa medida para o desenvolvimento do parasita (EHRENMAN et al., 2013). Foi proposta uma hipótese sugerindo que, além de NPC1L1, outros receptores estão envolvidos na absorção de COL e são sensíveis a inibição por ezetimibe (KNÖPFEL et al., 2007). O potencial do ezetimibe em ter atividade anti-*Giardia lamblia* foi estudado *in silico*, usando *docking* (atracamento) molecular. Foi proposto que um possível alvo do ezetimibe seria a região entre os aminoácidos 149 e 150 da LCAT (lecitina-colesterol aciltransferase), enzima que participa do transporte reverso de COL (de tecidos periféricos para o fígado) e está presente na superfície de lipoproteínas (principalmente as de

alta densidade), onde há esterificação de COL. No entanto, essa hipótese ainda não foi validada experimentalmente (AHMED; FADLELMOLA, 2016). O tratamento com ezetimibe causa alterações morfológicas em promastigotas de *Leishmania amazonensis*, que parecem ocorrer por efeito na interferência no metabolismo de esteroides, especificamente da C14-desmetilase. Quando testado *in vivo*, além de diminuir a carga parasitária de *L. amazonensis*, ezetimibe também diminuiu as lesões cutâneas causadas pelo parasitismo, um efeito similar ao que ocorre com o tratamento da leishmaniose cutânea usando cetoconazol (ANDRADE-NETO et al., 2016).

O efeito da inibição de ACAT por avasimibe foi estudado em *Trypanosoma cruzi* (PEREIRA et al., 2015), que obtém COL do hospedeiro ou do meio de cultivo. Em condições de suprimento lipídico, epimastigotas de *T. cruzi* usam os estoques intracelulares de COL para manter o funcionamento basal celular, enquanto quando há disponibilidade de lipídeos, estes usam a esterificação de COL para armazenamento de COL-E em compartimentos específicos (reservossomos). Esta atividade de esterificação foi demonstrada ser sensível ao tratamento com avasimibe, de modo dose-dependente, sugerindo que *T. cruzi* possui uma enzima semelhante a ACAT (PEREIRA et al., 2015).

## **1.6. Metabolismo de lipídeos em insetos e insetos hematófagos**

Assim como nos vertebrados, os lipídeos têm papéis diversificados nos invertebrados, como constituintes das estruturas celulares, precursores hormonais, armazenamento de energia, produção de ovos e metamorfose. No entanto, o metabolismo lipídico nestes organismos é menos complexo do que em vertebrados (CANAVOSO et al., 2001). Como a maioria dos estudos de metabolismo e transporte de lipídeos foi realizado em insetos, este conhecimento é extrapolado e utilizado para embasar os estudos nas demais classes de artrópodes.

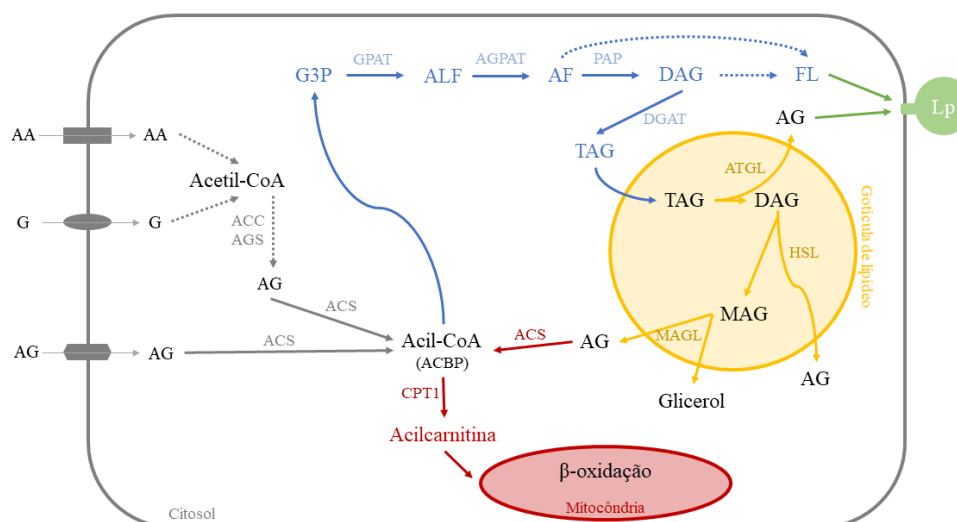
Os TAG são os lipídeos predominantes nos insetos e estão em maioria localizados no corpo gorduroso, de onde são transportados através da hemolinfa pelas lipoforinas (lipoproteínas) às células alvo como diacilglicerídeos (DAG). Por exemplo, na barata *Periplaneta americana*, mais de 50% do peso úmido do corpo gorduroso é composto por TAG. O fato de que o armazenamento de lipídeos é muito mais vantajoso do que carboidratos (devido ao menor espaço que ocupam por não serem hidratados e ao maior fornecimento de energia por serem mais reduzidos) é sobretudo benéfico para os insetos por serem seres pequenos, especialmente aqueles que voam (CANAVOSO et al., 2001; KLOWDEN, 2013).

Da mesma forma como ocorre nos mamíferos, onde as rotas metabólicas são mais conhecidas, a maioria dos insetos não é capaz de sintetizar *de novo* AG que contenham duas ou mais ligações duplas além do carbono 9, sendo necessária sua obtenção pela dieta. Uma exceção é a capacidade de algumas espécies de insetos (como baratas, grilos, pulgões e cupins) de sintetizar ácido linoleico a partir do acetato. Contudo, não é conhecido se há, ou qual seria a extensão da participação da microbiota desses organismos nesta síntese. Por outro lado, diferentemente dos vertebrados, os insetos não são capazes de alongar AG insaturados ou introduzir ligações duplas adicionais ao AG (KLOWDEN, 2013). Uma outra característica que difere o metabolismo de lipídeos entre vertebrados e insetos é que estes não são capazes de sintetizar COL (CLARK; BLOCK, 1959). De fato, o COL é um importante componente das membranas celulares, de ceras da superfície da cutícula e precursores de alguns hormônios. Por isso, os insetos necessariamente precisam obter COL a partir da dieta (CANAVOSO et al., 2001; KLOWDEN, 2013).

Os insetos hematófagos possuem adaptações fisiológicas e bioquímicas que os tornam aptos a este estilo de vida. Enquanto, por exemplo, a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* alimenta-se constantemente, insetos que se alimentam de sangue ingerem em apenas uma alimentação uma quantidade de sangue proporcionalmente grande em relação a seu próprio tamanho (GONDIM et al., 2018). A quantidade de sangue ingerida é afetada por fatores que incluem a temperatura ambiente, a idade do inseto, o status de acasalamento, o estágio do ciclo gonotrófico, o histórico de alimentação anterior e a fonte da refeição sanguínea. Em algumas espécies, insetos adultos podem ingerir quantidade de sangue duas vezes maior do que seu peso quando não-alimentado e em ninfas este fator pode ser até de 10 vezes (LEHANE, 2005). Além disso, a ingestão e digestão de sangue obriga estes insetos a lidarem com grandes quantidades de heme, uma molécula potencialmente citotóxica (PERNER et al., 2019). Outra peculiaridade é a saliva dos hematófagos, que contém um arsenal farmacológico que os permite contornarem a homeostase e os sistemas imune inato e adaptativo dos hospedeiros (FRANCISCHETTI et al., 2009; RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003).

O metabolismo de lipídeos também se altera durante a adaptação para a hematofagia, e tais diferenças tornam difícil generalizar as informações obtidas de insetos utilizados como modelos clássicos e os hematófagos. A figura 9 sumariza o metabolismo de lipídeos em insetos hematófagos. Embora a digestão de sangue forneça lipídeos para várias rotas metabólicas, esta não é a única fonte de lipídeos. A síntese de AG ocorre também a partir de outros substratos, como glicose e aminoácidos. Isto é especialmente importante para os

insetos hematófagos, uma vez que o sangue é composto majoritariamente por proteínas. A síntese *de novo* de AG acontece pela ação sucessiva da acetil-CoA carboxilase (ACC), que catalisa a síntese de malonil-CoA a partir de acetil-CoA; e o complexo da AG sintase (AGS), que usa malonil-CoA para sequencialmente adicionar duas unidades de carbono a um acetil-CoA inicial, assim sintetizando o AG. Dessaturases também são essenciais para a síntese *de novo* de AG. Além de sintetizar AG insaturados específicos, estas enzimas utilizam o palmitato (gerado pela AGS) como substrato e assim contribuem para a diminuição dos níveis de palmitoil-CoA, que por sua vez é um inibidor da ACC. Dessa forma, um aumento na dessaturação de AG pode aumentar a síntese de AG (GONDIM et al., 2018).



**Figura 9: Metabolismo de lipídeos em insetos hematófagos.** Ao entrarem na célula, os ácidos graxos (AG) são convertidos a acil-CoA pela via da  $\beta$ -oxidação. Alternativamente, aminoácidos (AA) e glicose (G) podem ser convertidos a acetil-CoA para a síntese *de novo* de AG, pelas enzimas acetil-CoA carboxilase (ACC) e a AG sintase (AGS). O acil-CoA se liga a proteína ligadora de acil-CoA (ACBP) e pode ser encaminhado para oxidação na mitocôndria, ou usado para síntese de triacilglicerol (TAG) pela via glicerol-3-fosfato (G3P). Esta via também leva a formação de diacilglicerol (DAG) e fosfolipídeos (FL), os quais são entregues às lipoforinas (Lp). Os TAG são armazenados nas gotículas de lipídeos, para serem utilizados quando houver necessidade de lipólise. Neste caso, reações sequenciais pelas enzimas adipócito TAG lipase (ATAGL), a lipase hormônio-sensível (HSL) e a monoacilglicerol lipase (MAGL) convertem o TAG em AG e glicerol. Os AG liberados são ativados (convertidos a acil-CoA) pela ACS e, em seguida,

convertidos em acilcarnitina pela carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), e assim encaminhados para oxidação na mitocôndria. GPAT: G3P aciltransferase; ALF: ácido lisofosfatídico; AGPAT: acil G3P aciltransferase; AF: ácido fosfatídico; PAP: fosfatidato fosfohidrolase; DGAT: DAG aciltransferase; MAG: monoacilglicerol. Adaptado de GONDIM et al. (2018).

Assim como em vários organismos, em fêmeas adultas de mosquitos há conversão de açúcar em AG. Antes de adquirirem a capacidade de alimentarem-se de sangue, elas alimentam-se de açúcares e nesse momento a quantidade de lipídeos no corpo gorduroso aumenta (atividade da ACC e da AGS). A vitelogênese inicia após a alimentação de sangue, quando então ocorre o transporte dos lipídeos do corpo gorduroso para os ovários (transportados por lipoforinas), assim abastecendo os oócitos em desenvolvimento (GONDIM et al., 2018). Contudo, AG ou precursores de AG, que são essenciais para a hematofagia e a formação da casca dos ovos, também são sintetizados *de novo* após a hematofagia, porém em menor quantidade (ALABASTER et al., 2011).

### **1.6.1. Absorção de lipídeos da dieta em insetos hematófagos**

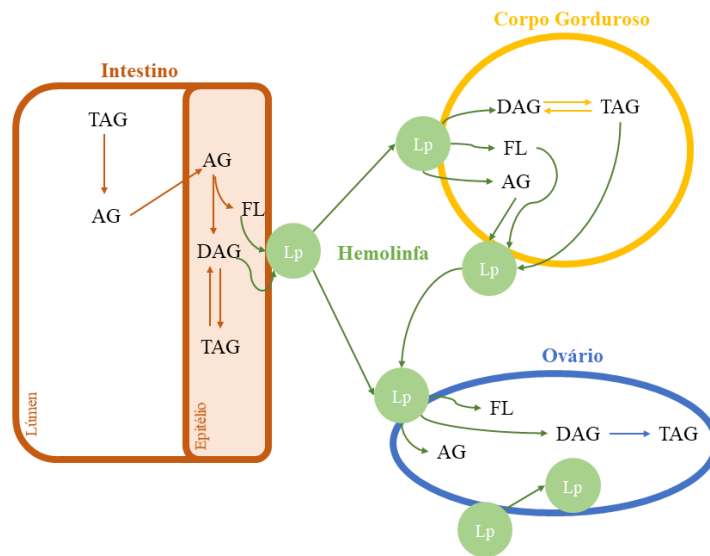
O intestino é o principal sítio de digestão e absorção de lipídeos em insetos. Embora o sangue seja composto majoritariamente por proteínas, ele contém uma mistura de lipídeos diferentes, que incluem TAG, FL, COL-E e AG. Os produtos gerados na digestão, como AG livres e COL, são em seguida absorvidos pelos enterócitos, num processo ainda pouco conhecido (MAJEROWICZ; GONDIM, 2013; TURUNEN; CRAILSHEIM, 1996). Uma das possibilidades de entrada de AG em células digestivas é por mediação de isoformas da proteína ligadora de AG ou com a assistência de proteínas transportadoras de AG/acil-CoA sintetase de cadeia muito longa (FATP/ACSVL). No mosquito *A. aegypti*, foi observado o aumento da expressão gênica de uma FATP 24 h após a alimentação de sangue, sugerindo seu papel na digestão de lipídeos da dieta (SANDERS et al., 2003).

A digestão de TAG foi estudada nos triatomíneos *P. megistus* e *R. prolixus*. Ao alimentarem-se de sangue enriquecido com TAG marcado radioativamente, ocorre geração majoritária de AG e, em menor concentração, de DAG (em *P. megistus*) (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004) e MAG (em *R. prolixus*) (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). Isso sugere que os TAG são hidrolisados completamente no lúmen do intestino. Os AG liberados na digestão de TAG, após serem absorvidos pelos enterócitos, são utilizados para



síntese de TAG, DAG e FL. Em seguida, DAG, FL e, em menor concentração, TAG são secretados para a hemolinfa para serem transportados pelas lipoforinas (GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). O acúmulo de gotículas de lipídeos nas células do epitélio intestinal após a hematofagia e a presença de uma TAG lipase tecidual indicam que os TAG são armazenados nas gotículas para depois serem convertidos em DAG, e então secretados para a hemolinfa (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004; GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). Além disso, há um aumento da enzima TAG lipase luminal após a alimentação, indicando que o processo de digestão de TAG é finamente ajustado (CANAVOSO; FREDE; RUBIOLO, 2004; GRILLO; MAJEROWICZ; GONDIM, 2007). O lúmen intestinal da mosca-de-estábulo *Stomoxys calcitrans* possui fosfolipases cuja expressão é regulada pelo início da hematofagia (SPATES; BULL; CHEN, 1990).

A lipoforina é a principal lipoproteína transportadora de lipídeos nos insetos (CHINO et al., 1981), a qual transporta diferentes classes de lipídeos para os diversos órgãos para que sejam armazenados, absorvidos ou utilizados. Em geral, as lipoforinas são compostas pelas apolipoproteínas I (aproximadamente 240 kDa) e II (aproximadamente 80 kDa). Contudo, dependendo do estágio fisiológico, a apolipoproteína III (entre 18 e 20 kDa) é a única presente. A composição lipídica e a quantidade dos componentes lipídicos individuais das lipoforinas varia de acordo com a espécie, e até mesmo dentro da mesma espécie, já que fatores como o estágio de vida e o metabolismo do organismo influenciam. Em geral, os DAG são os lipídeos mais abundantes nas lipoforinas, mas também há COL, hidrocarbonetos e FL (CANAVOSO et al., 2001; GONDIM et al., 2018; RYAN; VAN DER HORST, 2000). Embora as primeiras observações sobre o papel das lipoforinas no transporte de lipídeos, bem como sua reutilização, foram feitas em insetos não-hematófagos (VAN DER HORST et al., 1981; WELLS et al., 1987), este processo ocorre de modo similar em hematófagos, como estudado em *R. prolixus* (Fig. 10) (COELHO et al., 1997; SANTOS et al., 2011).



**Figura 10: Metabolismo de lipídeos obtidos da dieta em insetos hematófagos.**

A digestão dos triacilgliceróis (TAG) presentes no sangue ocorre no lúmen intestinal. Os ácidos graxos (AG) absorvidos pelos enterócitos são utilizados na síntese de fosfolipídeos (FL), diacilgliceróis (DAG) e TAG. Em seguida, os lipídeos são exportados para lipoforinas (Lp), e então transportados para outros órgãos como corpo gorduroso e ovário. No corpo gorduroso, os lipídeos são armazenados como TAG nas gotículas de lipídeos. Enquanto nos ovários vitelogênicos, os lipídeos são entregues com ou sem a internalização das Lp (depende da espécie do inseto). Dependendo da situação fisiológica em que se encontra o organismo, o corpo gorduroso transfere os lipídeos armazenados para as Lp circulantes, as quais os transportam para os ovários ou para o intestino. Adaptado de GONDIM et al. (2018).

### 1.7. Metabolismo de lipídeos em carrapatos

O metabolismo de lipídeos em carrapatos é ainda menos conhecido do que em insetos e insetos hematófagos. Assim como em outros aspectos fisiológicos, os estudos de metabolismo de lipídeos em carrapatos são baseados no conhecimento em insetos.

A análise do lipidoma da superfície de carrapatos *Amblyomma americanum* revelou a presença semioquímicos de baixa volatilidade em carrapatos (machos e fêmeas) em diferentes estados de alimentação (RENTHAL et al., 2019). Alguns componentes lipídicos estão apenas em fêmeas que se alimentaram ao lado de machos, como desidrodesoxiecdisona, um feromônio sexual derivado da ecdisona; um ácido graxo 20:4 (possivelmente ácido araquidônico), um feromônio sexual; e decosenamida, que não tem uma função conhecida na

fisiologia de carrapatos. COL-E estão na superfície de fêmeas e machos alimentados lado a lado, possivelmente são componentes de feromônios para acasalamento, assim como ésteres de ceras, que podem ser componentes da cutícula para dar maior elasticidade, ou serem componentes da cera que recobre os ovos nas fêmeas. Em machos e fêmeas não alimentados, destaca-se a presença de dehidrocolesterol esterificado, possivelmente relacionado a sobrevivência dos carrapatos na busca por hospedeiro. Por outro lado, exclusivamente em machos alimentados sem a presença de fêmeas, há esfingolipídeos e glicerofosfolipídeos, possivelmente derivados do desenvolvimento espermático (RENTHAL et al., 2019).

A captação, incorporação e conversão de lipídios simples em lipídios complexos foi estudada durante a postura de ovos de *R. microplus* pela injeção de ácido graxo radioativo ([9,10-<sup>3</sup>H] ácido palmítico) na hemolinfa de fêmeas um dia após o término da hematofagia (KLUCK et al., 2018). Após 30 minutos da injeção, houve uma diminuição da radioatividade na hemolinfa e aumento no corpo gorduroso, sugerindo uma alta atividade metabólica neste órgão devido a digestão do sangue e preparo para o início da postura. Em menor proporção (duas a quatro vezes menor), ocorreu aumento de radioatividade no intestino, ovário e GO. No segundo dia de postura de ovos, ou seja, no quarto dia após o fim da hematofagia, ocorreu um pico de radioatividade no corpo gorduroso e no GO, enquanto a máxima radioatividade no ovário ocorre no quarto dia de oviposição. Isso sugere a existência de um tráfego direto de lipídeos do corpo gorduroso para o ovário (KLUCK et al., 2018).

Logo no início da postura (segundo dia) há uma alta conversão de [9,10-<sup>3</sup>H] ácido palmítico em lipídeos mais complexos (FL, MAG, DAG e TAG) no corpo gorduroso, sendo FL e TAG em maior concentração. A hipótese proposta é de que estes lipídeos são usados como fonte de energia e como componentes de membranas durante o desenvolvimento dos ovos. No ovário, o pico de conversão ocorre no quarto dia de postura, quando além da conversão para esses mesmos lipídeos mais complexos, também COL-E estão presentes. Assim como em insetos hematófagos, é possível que os FL sejam usados como suporte estrutural e metabólico para a formação de ovos, e os DAG como fonte de energia. Por outro lado, no GO o AG radioativo incorporado permaneceu na forma AG livre, com pico de detecção no sexto dia de postura. Possivelmente, estes AG livres sejam usados para a formação da cera secretada pelo GO (KLUCK et al., 2018).

Proteínas transportadoras presentes na hemolinfa de carrapatos foram descritas em *R. microplus* (HeLp, Heme Lipoprotein) (MAYA-MONTEIRO et al., 2000), *Dermacentor variabilis* e *Ornithodoros parkeri* (GUDDERRA et al., 2001). HeLp, presente em machos e

fêmeas adultas, contém 3% de carboidratos e 33% de lipídeos (55% lipídeos neutros e 44% FL) e carrega o heme obtido na dieta aos tecidos dos carrapatos (MAYA-MONTEIRO et al., 2000). CP de *D. variabilis*, presente em machos e fêmeas adultas, é uma lipo- glico- heme- proteína que também transporta o heme da dieta, e contém COL, FL, MAG, TAG e AG livres (GUDDERRA et al., 2001). Uma proteína carreadora de lipídeos na hemolinfa de carrapato foi identificada em *R. microplus* (RmLCP) (KLUCK et al., 2018), a qual contém COL (~40%), FL, hidrocarbonetos e DAG. Esta proteína carreadora está envolvida no transporte de AG e COL para o ovário e o GO.

A importância do metabolismo de lipídeos para o desenvolvimento e reprodução de carrapatos vêm sendo demonstrada na literatura, conforme evidenciado na revisão bibliográfica apresentada neste trabalho. No entanto, há uma lacuna de informações que ainda deve ser preenchida, a qual é embasada no conhecimento em insetos. Da mesma forma que há diferenças importantes no metabolismo de lipídeos entre os insetos e os insetos hematófagos, possivelmente isto também se aplica com relação aos carrapatos.

## **2. Objetivo**

Esse trabalho tem como objetivo elucidar o papel do órgão de Gené na reprodução de carrapatos.

Os objetivos específicos são:

- Identificar transcritos e proteínas do órgão de Gené;
- Identificar moléculas envolvidas na síntese e modificação de componentes da cera dos ovos;
- Interferir na absorção de lipídeos obtidos pela hematofagia para inviabilizar o desenvolvimento dos ovos.

- **3. Resultados**

Esta seção da tese foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo analisa o metabolismo de lipídeos do GO, usando como ferramenta a análise de transcritos e da composição proteica, de dois estádios das fêmeas totalmente alimentadas: antes do início do período de postura (até 24 horas após desprender-se do hospedeiro) e durante a postura (dois dias após o início da postura). Estes resultados são apresentados na forma de artigo científico, publicado na revista *Tick and Tick-borne Diseases*.

O segundo capítulo, apresentado no formato de manuscrito a ser submetido para publicação, trata do metabolismo de lipídeos e a possibilidade de identificar alvos para o controle dos carrapatos, usando inibidores de absorção do COL para inviabilizar o desenvolvimento dos ovos.

### 3.1. Capítulo 1

Tick Gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach

Artigo científico publicado na revista *Tick and Tick-borne Diseases*

Marina Amaral Xavier, Lucas Tirloni, Antonio F.M. Pinto, Jolene K. Diedrich, John R. Yates III, Sergio Gonzales, Marisa Farber, Itabajara da Silva Vaz Junior, Carlos Termignoni

Projeção dos experimentos: M.A.X., L.T., A.F.M.P., S.G., M.F., I.S.V.J. e C.T.

Execução dos experimentos: M.A.X., L.T., A.F.M.P., J.K.D., e S.G.

Contribuição com reagentes/materiais/ferramentas de análise: J.R.Y., M.F., I.S.V.J., e C.T.

Escrita do artigo: M.A.X., L.T., A.F.M.P., I.S.V.J. e C.T.

Revisão do artigo: M.A.X., L.T., A.F.M.P., J.K.D., J.R.Y., S.G., M.F., I.S.V.J., e C.T.



## Original article

## Tick Gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach

Marina Amaral Xavier<sup>a,b</sup>, Lucas Tirloni<sup>c</sup>, Antonio F.M. Pinto<sup>d,e</sup>, Jolene K. Diedrich<sup>d</sup>, John R. Yates III<sup>d</sup>, Sergio Gonzales<sup>f</sup>, Marisa Farber<sup>f</sup>, Itabajara da Silva Vaz Junior<sup>a,g</sup>, Carlos Termignoni<sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>b</sup> Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

<sup>c</sup> Vector Biology Section, Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Disease, Rockville, MD, United States

<sup>d</sup> Department of Molecular Medicine, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, United States

<sup>e</sup> Clayton Foundation Peptide Biology Lab, Salk Institute for Biological Studies, La Jolla, CA, United States

<sup>f</sup> Instituto de Biotecnología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurlingham, BA, Argentina

<sup>g</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Gené's organ

Egg wax

Lipid gland

Tick

Proteome

Transcriptome

## ABSTRACT

Lipids play key roles in arthropod metabolism. In ticks, these biomolecules are transported from fat body to other organs, such as ovary and Gené's organ. Gené's organ, an apparatus found exclusively in female ticks, secretes a protective wax coat onto the egg surface, increasing egg viability in the environment due to waterproof, cohesive, and antimicrobial properties. In this work, a combined transcriptomic and proteomic approach shows that Gené's organ not solely secretes compounds taken up from the hemolymph, but is actively engaged in synthesis, modification, and oxidation of lipids. Gené's organ was analyzed at two distinct stages: 1) when ticks detach from host by the end of hematophagous phase, and 2) during egg-laying. Data show that Gené's organ undergoes a maturation process before the onset of oviposition, in preparation for its role during egg-laying. Because it deals with a wax-secreting organ, the study focused on lipid metabolism, examining a full machinery to synthesize, modify, and oxidize fatty acids. Proteins involved in sterol modification, transport, and degradation were also addressed. In addition to highlighting Gené's organ importance in tick reproductive physiology, the results reveal proteins and pathways crucial to egg wax secretion, and consequently, egg development in the environment. Tools targeting these molecules and pathways would impair egg viability in the environment, and therefore have the potential to be developed into novel tick control methods.

## 1. Introduction

In arthropods, lipids play key roles as chemical messengers (hormones and pheromones), as energy source and storage, in constituting cellular membranes, and in egg production, laying and viability (Canavoso et al., 2001; Lees and Beament, 1948; Ryan and van der Horst, 2000). Like for most phenomena in arthropod physiology, the knowledge about lipid metabolism is mainly based on and extrapolated from studies on insects. Digestion and absorption of lipids from the diet occurs in the midgut, but lipid metabolism takes place mostly in the fat body, an organ that functions similarly to an adipose tissue and liver (Arrese and Soulages, 2010; Majerowicz and Gondim, 2013). In ticks, after metabolized in the fat body, lipids are transported through the

hemolymph to other organs, such as ovary and Gené's organ (GO) (Kluck et al., 2018).

The success of tick egg development in the environment relies on GO activity (Lees and Beament, 1948). This organ is present only in female ticks and covers the eggshell with a waxy layer immediately after each egg is released from the genital aperture. The vestibulum vaginae prolapses from the genital aperture and hands over each egg to the horns of GO (Sieberz and Gothe, 2000). In addition to protecting the egg from environmental conditions of humidity and temperature, the wax deposited on the surface makes egg development feasible due to its antimicrobial (Arrieta et al., 2006; De Lima-Netto et al., 2012; Esteves et al., 2009; Potterat et al., 1997; Yu et al., 2012; Zimmer et al., 2013ab) and waterproof (Lees and Beament, 1948) properties. The wax

\* Corresponding author.

E-mail address: [trmgn@cbiot.ufrgs.br](mailto:trmgn@cbiot.ufrgs.br) (C. Termignoni).

<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.013>

Received 7 January 2019; Received in revised form 27 February 2019; Accepted 15 March 2019

Available online 20 March 2019

1877-959X/ © 2019 Elsevier GmbH. All rights reserved.



stickiness also promotes egg clustering, reducing the total surface exposure and possibly enhancing the protective properties (Booth, 1992; Lees and Beament, 1948).

The study of GO has focused on its morphology and histology (Booth, 1989; Booth et al., 1985; dos Santos et al., 2018; El Shoura, 1988, 1987; Kakuda et al., 1992; Schöl et al., 2001), *modus operandi* (Edelmann and Gothe, 2000; Sieberz and Gothe, 2000), and on wax content and properties (Booth, 1989; Yu et al., 2012). The wax is mainly composed of long-chain alkanes, fatty acid esters (Booth, 1992), cholesterol ester, free cholesterol and fatty acids (Yu et al., 2012). Other lipids present at lower abundance are phosphatidylcholine, sphingomyelin, triglyceride, monoglyceride, phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine (Yu et al., 2012).

Histological studies have shown an enrichment of endoplasmic reticulum and Golgi apparatus in GO cells (Booth, 1989; dos Santos et al., 2018; Kakuda et al., 1995), supporting the hypothesis that GO is involved in synthetic pathways and not just in transferring material from the hemolymph to the egg surface. Evidence that GO is involved in lipid synthesis has been presented by studies showing the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -1-acetate into GO secretory glands and egg wax (Booth, 1992). In contrast, histological observations of invagination structures on the basal plasma membrane of GO secretory cells have led authors to hypothesize that GO is not a synthesis organ, but secretes molecules provided by the hemolymph (dos Santos et al., 2018; Kakuda et al., 1995).

In order to investigate the development and function of *Rhipicephalus microplus* GO, transcriptomic and proteomic approaches were used to compare the molecular content of GO in two stages: by the end of hematophagous phase and during egg-laying. Data presented here show that GO is functional in synthesizing and modifying lipid content, not only secreting it. Additionally, a survey of all genes being expressed in GO in two stages of tick development is presented.

## 2. Material and methods

### 2.1. Ethics statement

This research was conducted according to the ethic and methodological guidance in agreement with the International and National Directives and Norms by Animal Experimentation Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (project n° 31,518).

### 2.2. Ticks

Ticks obtained from a laboratory colony of *R. microplus* (Porto Alegre strain, Porto Alegre, Brazil) were reared on Hereford cattle (*Bos taurus taurus*) brought from a naturally tick-free area and maintained in insulated pens (Reck et al., 2009). A calf was infested with 15-day-old larvae, and ticks naturally detached from host were collected after completing the hematophagy period (around 22 days). Fifty females ranging between 230 and 270 mg were placed in two groups for GO extraction. The first group consisted of females that detached from host and were dissected within 24 h (group DET n = 25); the second group consisted of females kept in an incubator for egg-laying (28 °C and 85% relative humidity) and dissected in the second day of oviposition, around 5 days after detaching from host (group OVP n = 25).

### 2.3. Gené's organ dissection, total RNA and protein extraction

Firstly, ticks were washed in 70% ethanol for 10 min and then air-dried. After dissection, GO were gently washed in nuclease-free phosphate-buffered saline (150 mM sodium phosphate monobasic and 10 mM sodium chloride, pH 6.7), and immediately transferred to TRIzol® reagent (Thermo Fisher Scientific). Total RNA and protein were isolated according to manufacturer's specifications. Dissected GO from

each group were divided in three samples for total RNA and protein extraction: two samples containing GO from 10 ticks each, and one sample containing GO from five ticks. The three RNA samples were used to construct three cDNA libraries submitted to RNA-seq. Protein extracts from the two 10-tick samples were analyzed by LC-MS/MS.

### 2.4. RNA-seq and bioinformatic analysis

The construction of paired-end cDNA libraries was performed using TruSeq RNA Library Prep Kit, according to manufacturer's specifications. Samples were tagged with specific barcodes and paired-end reads were sequenced using an Illumina MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA, USA) at Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG facility (Hurlingham, BA, Argentina).

Raw data was evaluated using FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>), trimmed using Trimmomatic (Bolger et al., 2014), and the overlapping reads were combined using FLASH tool (Magoč and Salzberg, 2011). The *de novo* assembly was performed using Trinity (Grabherr et al., 2011) (*k-mer* size of 31 and sequence length of 500 nucleotides) using reads generated in this study, along with *R. microplus* GO transcriptome raw data available on Sequence Read Archive (SRA) (BioProject ID PRJNA288687) (Tidwell, 2015). From each transcript, the six potential translational frames of coding sequences (CDS) (deduced CDS) were extracted, provided they encoded a minimum of 67 amino acids. In order to retain only the transcripts generated by the current study, reads from each library (three from DET group and three from OVP group) were mapped to the deduced CDS (> 67 amino acids) using Bowtie2 (Langmead and Salzberg, 2012). Then, eXpress (Roberts and Pachter, 2013) and edgeR (Robinson et al., 2009) were used to remove low-expression contigs, retaining contigs fulfilling the following criteria: counts per million (CPM) > 1 and presence in at least two out of the three libraries.

The following methodology was performed as previously described by (Karim et al., 2011; Ribeiro et al., 2016). In order to select which deduced CDS were putative CDS, the resulting contigs were concatenated and the redundancy removed. Then, putative CDS were extracted based on similarity to protein sequences available in public databases, using BLASTp. Sequences matching 50% or more of the length of proteins in the databases had their putative CDS automatically extracted by a program written in Visual Basic.

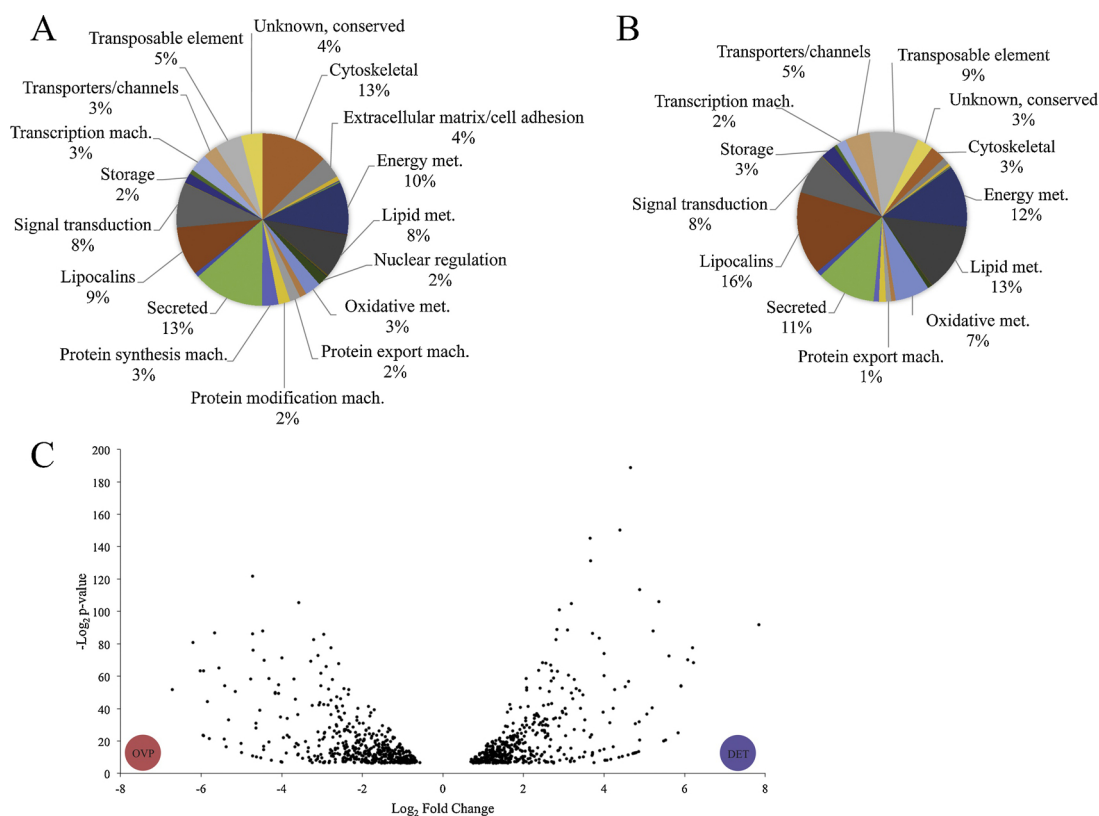
Reads from each library were then mapped to the deduced CDS, using BLASTn with word size of 25, 1 gap allowed, and identity ≥ 97% required. Up to five matches were allowed provided scores were the same as the highest score. An average of reads per contig was calculated for each group (DET or OVP). A resulting spreadsheet with the average number of reads per contig per group was used to calculate fragments per kilobase million (FPKM). FPKM was calculated for each contig in the spreadsheet using the formula:

$$\frac{\text{number of reads}}{(\text{sequence length in kilobases} \times \text{total reads per million in the group})}$$

Filtered reads were submitted to differential expression analysis using the package edgeR (Robinson et al., 2009). Statistically significant differentially expressed genes (DE) are presented according to treatment (DET and OVP) using counts per million (CPM) ≥ 1 and false discovery rate < 0.05 (5% FDR). Results are displayed as volcano plots.

Functional annotation of coding sequences was performed using an automated annotation tool based on a vocabulary of nearly 250 words found in matches to different non-redundant protein databases of NCBI (Karim et al., 2011). Additional manual annotation was made as required. In addition, reverse position-specific BLAST (Reverse PSI-BLAST) (Altschul et al., 1997) was used to search for conserved protein domains in the CDD database (Marchler-Bauer et al., 2002). In the last step, coding sequences were categorized according to function and/or protein families.

Raw data obtained in this work were deposited in the National



**Fig. 1.** Genes' organ (GO) coding sequences (CDS) profile before and during egg-laying. GO was obtained from ticks in two developmental stages: (A) within 24 h of detachment from host (DET group), and (B) in the second day of oviposition (OVP group), i.e. around 5 days after detachment. CDS are categorized according to biological function of the translated protein. Categories' FPKM (fragments per kilobase million) is presented as percentage, normalized by the total FPKM of each group, in order to represent the total amount of each category in each GO stage. (C) Volcano plot displaying common CDS that were differentially expressed between DET and OVP groups, based on fold change (FC) (y-axis) and counts per million (CPM) (x-axis). Dots in y-axis positive side are from DET group, while dots in y-axis negative side are from OVP group. mach = machinery; met = metabolism.

**Table 1**

Overview of *Rhipicephalus microplus* Genes' organ transcriptome data.

	DET group	OVP group
Reads (150 nt)	2.1–2.2 million	2.3–2.4 million
Assembly	97,527	
Deduced CDS > 67aa	380,223	
Mapping and filtering (CPM > 1) deduced CDS	40,293	48,602
Non-redundant deduced CDS	60,943	
Putative CDS (average 321 nt)	3869	
Functional annotation of putative CDS	1285	

CDS = coding sequence.

Center for Biotechnology Information (NCBI) Sequence Read Archives (SRA) under the accession [SRR7876048](#) and [SRR7876049](#) (these are linked to BioSample [SAMN02463642](#) of the Bioproject PRJNA232001). Functional annotated contigs were deposited in Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) project at DDBJ/EMBL/GenBank under the accession [GGXY000000000](#). The version described in this paper is the first version, [GGXY010000000](#).

### 2.5. High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry (LC–MS/MS) and data analysis

The four samples described in section 2.3 were analyzed by LC–MS/MS in triplicates. Subsequently to extraction (section 2.3), protein

concentration was measured using BCA Protein Assay Reagent Kit (Thermo Scientific Pierce), following the manufacturer's recommendations. Proteins were precipitated using methanol/chloroform method (Wessel and Flügge, 1984). Dried pellets were dissolved in 8 M urea/100 mM Tris, pH 8.5, reduced with 5 mM TCEP, alkylated with 25 mM iodoacetamide, and digested overnight at 37 °C using trypsin at a final ratio of 1:20 (w/w; enzyme: substrate) in 2 M urea/100 mM Tris pH 8.5, 1 mM  $\text{CaCl}_2$  buffer. Digestion reactions, at a final concentration of 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , were quenched with formic acid (5% final concentration), and debris were removed by centrifugation at 17,000  $\times$  g for 5 min at 4 °C.

Reversed-phase pre-columns were prepared in 250  $\mu\text{m}$  ID/360  $\mu\text{m}$  OD capillary with a Kasil frit at one end. Pre-columns were packed in-house with 2 cm of 5  $\mu\text{m}$  ODS-AQ C18 from particle slurries in methanol. Analytical reversed-phase columns were prepared by pulling a 100  $\mu\text{m}$  ID/360  $\mu\text{m}$  OD silica capillary to a 5- $\mu\text{m}$  ID tip and packing 20 cm of the same particles directly behind the pulled tip. Reversed-phase pre-columns and analytical columns were connected using a zero-dead volume union.

Peptide mixtures were analyzed by nanoflow LC–MS using an Easy NanoLC II coupled to a Q Exactive mass spectrometer (Thermo Scientific). Peptides eluted from the analytical column were electrosprayed directly into the mass spectrometer. Solutions A and B consisted of 5% acetonitrile/0.1% formic acid and 80% acetonitrile/0.1% formic acid, respectively. The flow rate was set to 400 nL/min. Protein samples from each group (1.5  $\mu\text{g}$  per injection) were submitted to 155-min chromatographic runs, as follows: 1–10 % B in 10 min, 10–40 % B

**Table 2**  
Functional categorization of *R. microplus* GO CDSs before and during egg-laying.

Functional categories	DET			OVP		
	Number of CDS	Number of reads	Relative abundance of reads (%)	Number of CDS	Number of reads	Relative abundance of reads (%)
Amino acid metabolism	6	113	0.16	6	109	0.11
Bacterial	3	35	0.05	3	54	0.05
Carbohydrate metabolism	11	147	0.21	11	124	0.12
Cytoskeletal	80	6932	9.98	79	2251	2.24
Energy metabolism	4	7532	10.85	4	19,195	19.12
Extracellular matrix/cell adhesion	90	2765	3.98	85	1194	1.19
Immunity	13	377	0.54	13	334	0.33
Intermediate metabolism	4	63	0.09	4	22	0.02
Lipid metabolism	37	6687	9.63	36	14,891	14.84
Lipocalins	2	8802	12.67	2	19,021	18.95
Nuclear export	9	131	0.19	9	75	0.07
Nuclear regulation	63	1291	1.86	62	750	0.75
Nucleotide metabolism	12	209	0.30	12	128	0.13
Oxidative metabolism	14	1985	2.86	15	5303	5.28
Proteasome machinery	48	745	1.07	48	659	0.66
Protein export machinery	37	1210	1.74	40	851	0.85
Protein modification machinery	41	1616	2.33	41	1028	1.02
Protein synthesis machinery	20	1427	2.05	20	619	0.62
Proteinase inhibitor	2	367	0.53	2	557	0.55
Secreted	97	7559	10.88	98	6391	6.37
Signal transduction	165	4907	7.07	168	5934	5.91
Signal transduction, apoptosis	6	73	0.11	6	97	0.10
Storage	6	934	1.34	6	1737	1.73
Transcription factor	29	537	0.77	29	539	0.54
Transcription machinery	94	3314	4.77	93	2774	2.76
Transporters/channels	44	2109	3.04	46	5343	5.32
Transposable element	182	3978	5.73	190	7658	7.63
Unknown, conserved	101	3605	5.19	99	2739	2.73
Total	1,220	69,450	100	1,227	100,377	100

in 100 min, 40–50 % B in 10 min, and 50–90 % B in 10 min. The column was held at 90% B for 10 min, and re-equilibrated in 1% B prior to next injection.

The mass spectrometer was operated in a data-dependent mode, collecting a full MS scan from 400 to 1200 *m/z* at 70,000 resolution and an automatic gain control (AGC) target of  $1 \times 10^6$ . The 10 most abundant ions per scan were selected for MS/MS at 17,500 resolution, AGC target of  $2 \times 10^5$ , and an underfill ratio of 0.1%. Maximum fill times were 20 ms and 120 ms for MS and MS/MS scans, respectively, with dynamic exclusion of 15 s. Normalized collision energy was set to 25.

Tandem mass spectra were searched directly from RAW files with Comet (Eng et al., 2013) in the platform PatternLab for Proteomics (Carvalho et al., 2016). Resulting mass spectra were searched against two transcriptomic databases: (i) a local *R. microplus* protein database (Rm-INCT-EM) containing 22,010 sequences previously generated by our research group; and (ii) the predicted amino acid sequences translated from *R. microplus* GO nucleotide sequences presented in the current study. Both deposited data belong to the BioProject ID PRJNA232001 at Transcriptome Shotgun Assembly (TSA) database-GenBank. Search was performed using these non-redundant databases and reverse sequences of all entries, and included all fully-tryptic and half-tryptic peptide candidates. Carbamidomethylation of cysteine was used as static modification. The validity of the peptide spectrum matches (PSMs) generated by COMET was assessed using Search Engine Processor (SEPro) module from PatternLab for Proteomics platform. XCorr, DeltaCN, DeltaMass, ZScore, number of peaks matched, and secondary rank values were used to generate a Bayesian discriminating function. A cut-off score was established to accept an FDR of 1% based on the number of decoys. A minimum sequence length of six residues per peptide was required, and results were post-processed to only accept PSMs with precursor mass error < 10 ppm.

Quantitative analysis was performed using the semi-quantitative

method based on normalized spectral abundance factor (NSAF), which was calculated according to (Zybailov et al., 2006). NSAF for a given protein is the number of spectral counts (SpC) identified for that protein, divided by the protein's length (L), divided by the sum of SpC/L of all proteins in the experiment. The following parameters were used to select differentially expressed proteins: proteins were grouped by maximum parsimony, spectral count data were normalized using NSAF values, and two nonzero replicate values were required for each condition (at least two out of three replicates). BH q-value was set at 0.02 (2% FDR). A variable fold-change (FC) cut-off for each individual protein was calculated according to the *t*-test *p*-value using an F-stringency value automatically optimized using the TFC software. Low-abundance proteins were removed using an L-stringency value of 0.4.

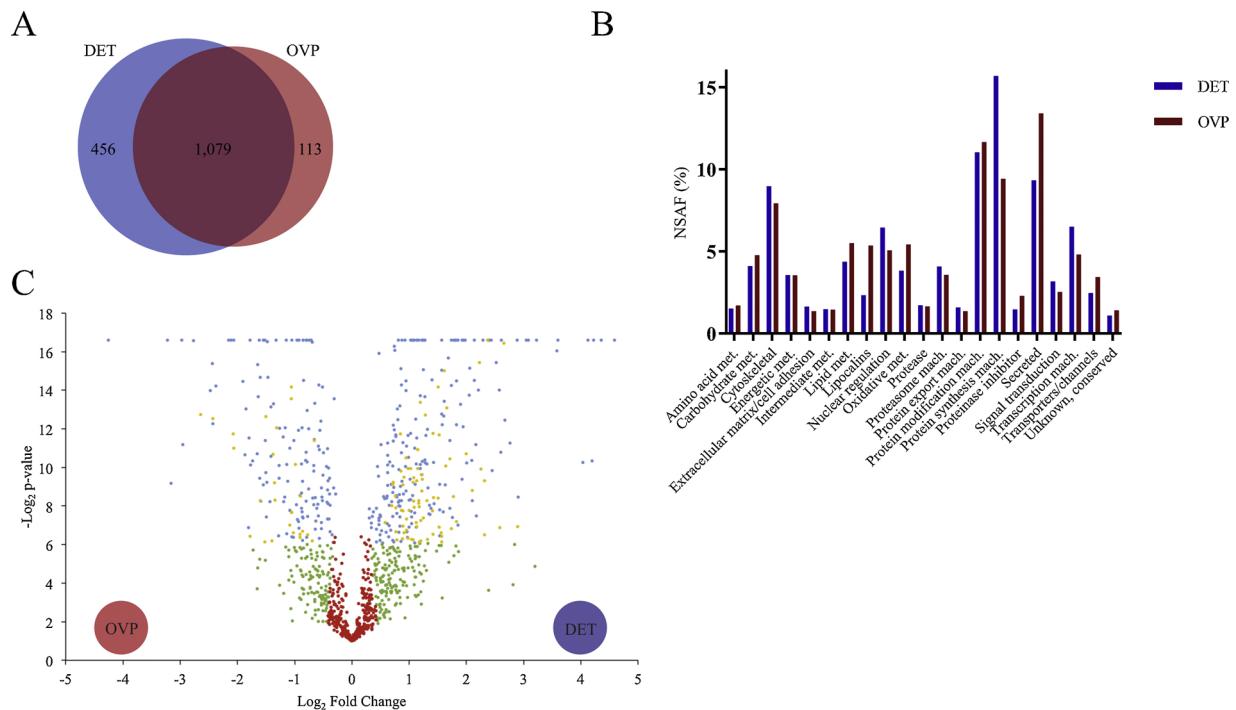
Venn diagram comparing samples from groups DET and OVP were produced in PatternLab for Proteomics software, using proteins present in at least 2 replicates. Volcano plot was generated by a pairwise comparison of DET and OVP using the PatternLab's TFC module.

Protein functional annotation was performed as described above for CDS functional annotation (section 2.4). Finally, proteins were categorized according to function and/or protein families. Eight proteins were identified as contaminants and removed from the final list. Mass spectrometry proteomics data have been deposited in the ProteomeXchange Consortium (Deutsch et al., 2017) via PRIDE (Vizcaino et al., 2016) partner repository with the dataset identifier PXD011223.

### 3. Results and discussion

#### 3.1. *Gené's organ transcriptome data analysis*

In order to evaluate molecular processes involved in GO development, transcription in GO was investigated at two stages: i) at the day of detachment from host (DET) and (ii) at the second day of oviposition (OVP), i.e. around 5 days after detachment (Supplementary Fig. 1).



**Fig. 2.** Comparison of Gené's organ (GO) proteome before and during egg-laying. Protein was obtained from GO in two developmental stages: within 24 h of detachment from host (DET group), and in the second day of oviposition (OVP group), i.e. around 5 days after detachment. (A) Venn diagram displaying the number of proteins found in GO proteome. (B) Identified proteins were categorized according to their biological function. Categories' NSAF (normalized spectral abundance factor) is presented as percentage, normalized by the total NSAF of each group, in order to represent the total amount of each category in each GO stage. (C) Volcano plot displaying common proteins that were differentially abundant between the two stages, based on fold change (FC) (x-axis) versus *t*-test probability (y-axis). Dots in x-axis positive side are from DET group, while dots in x-axis negative side are from OVP group. Blue dots: satisfied both FC and statistical criteria. Yellow dots: filtered out by  $\perp$ -stringency, further experimentation is required to verify if they are indeed differentially abundant. Green dots: satisfied the FC criteria but, most likely, this happened by chance. Red dots: did not meet the FC and p-value criteria. mach = machinery; met = metabolism (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

*R. microplus* GO transcriptome in each developmental stage was determined using high throughput RNA-seq. An overview of GO transcriptome data analysis is presented in Table 1. For each library, over 2 million reads were obtained. Reads were assembled in 97,527 transcripts, from which 380,223 deduced coding sequences (CDS) within six translation frames were obtained. Reads from each library were mapped back to these 380,223 deduced CDS, and an expression level threshold (section 2.4) was used to select against low-expression transcripts, which possibly represent assembly artefacts or background expression. After mapping and filtering, 40,293 deduced CDS were obtained for group DET, and 48,602 for group OVP; a total of 60,943 non-redundant deduced CDS were obtained. In order to select which deduced CDS could be putative CDS, sequences were extracted again based on similarity to known proteins on public databases. Through this strategy, 3869 putative proteins with theoretical biological relevance were obtained, of which 1257 were assigned to different functional categories (Table 2 and Supplementary Table S1).

In the DET group, the most abundant (FPKM) coding sequences encode for secreted proteins (13%), proteins related to the cytoskeleton (13%) and energy metabolism (10%) (Fig. 1A). In the OVP group, the most abundant coding sequences represent lipocalins (16%), lipid metabolism (13%), energy metabolism (12%) and secreted proteins (11%) categories (Fig. 1B). The abundance of lipocalins such as histamine-, serotonin- and cholesterol-binding proteins highlights their importance in tick physiology (Beaufays et al., 2008; Neelakanta et al., 2018; Roversi et al., 2017). The relative transcription of cytoskeleton-related proteins was higher in DET group (13%) compared with OVP group (3%), which inversely correlates to the increase in GO size, from unfed females to egg-laying ticks (Schöl et al., 2001). In parallel, the higher relative transcription in OVP group of lipocalin genes (16% versus 9%

in DET) and lipid metabolism genes (13% versus 8% in DET) suggest that GO maintains metabolite transport and synthesis and/or modification of lipids during egg-laying.

These results are corroborated by differential gene expression between the groups, which are represented in Fig. 1C and described in detail in Supplementary Table S1. In DET group, the most differentially expressed CDS encode for proteins related to extracellular matrix (e.g. heparan sulfate proteoglycan 2,  $\log_2FC = 6$ ), signal transduction (e.g. low-density lipoprotein receptor,  $\log_2FC = 5$ ), cytoskeleton (e.g. similar to microtubule associated protein,  $\log_2FC = 5$ ), secreted proteins (e.g. mucin-19-like,  $\log_2FC = 6$ ), and transcription machinery. On the other hand, in OVP group, differentially expressed CDS correspond to signal transduction (e.g. protein serine/threonine kinase cdk family,  $\log_2FC = 5$ ), transposable elements (e.g. tick transposon,  $\log_2FC = 5$ ), lipid metabolism (e.g. fatty acyl-CoA elongase,  $\log_2FC = 4$ ), and secreted proteins (e.g. fucosyltransferase-4 pentraxin-1 domain protein,  $\log_2FC = 3$ ).

### 3.2. Gené's organ proteome overview

In addition to the transcriptomic analysis, the proteomic profile of GO was assessed. The complete list of identified proteins is presented in Supplementary Table S2, and a semi-quantitative analysis is shown in Supplementary Table S3.

After filtering out 239 proteins which did not fit the parameters described in section 2.5, and eight proteins corresponding to bovine keratin contaminants, a total of 1648 proteins were identified: 456 are exclusive of DET group, 113 of OVP group, and 1079 are present in both groups (Fig. 2A). Protein functional annotation led to categorization in 29 biological categories (Table 3). The most abundant



**Table 3**  
Functional categorization of *R. microplus* GO proteins before and during egg-laying.

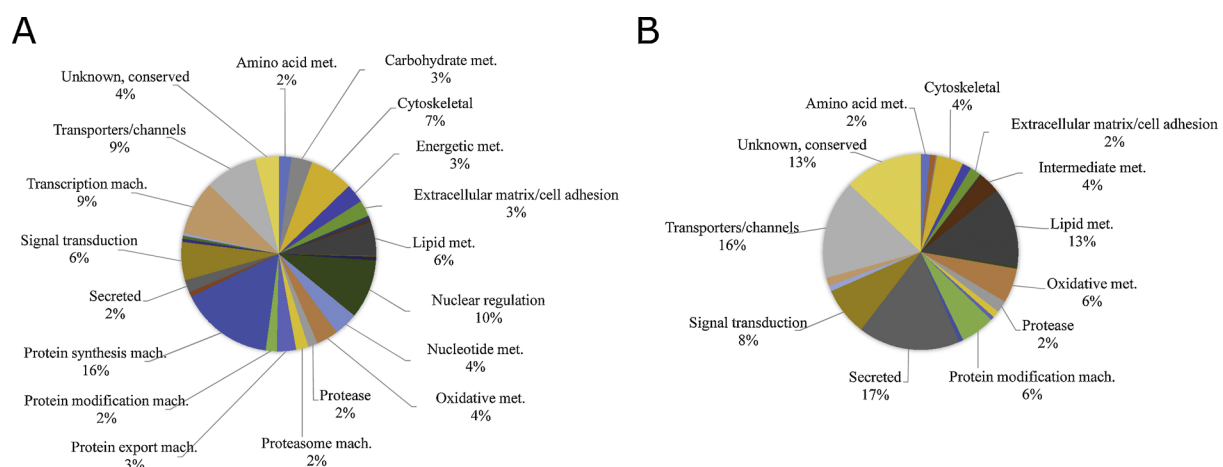
Functional categories	DET		OVP	
	Number of Contigs	Relative NSAF (%)	Number of Contigs	Relative NSAF (%)
Amino acid metabolism	38	1.5	31	1.7
Antimicrobial	1	0.0	2	0.0
Carbohydrate metabolism	63	4.1	44	4.8
Cytoskeletal	77	9.0	63	7.9
Energetic metabolism	68	3.6	56	3.6
Extracellular matrix/cell adhesion	50	1.6	40	1.4
Immunity	20	0.6	14	0.7
Intermediate metabolism	26	1.5	24	1.5
Lipid metabolism	97	4.4	86	5.5
Lipocalins	9	2.3	8	5.4
Nuclear export	11	0.1	4	0.0
Nuclear regulation	67	6.5	33	5.1
Nucleotide metabolism	32	0.9	16	0.6
Oxidative metabolism	55	3.8	50	5.4
Protease	45	1.7	37	1.7
Proteasome machinery	76	4.1	69	3.6
Protein export machinery	70	1.6	56	1.4
Protein modification machinery	82	11.0	75	11.7
Protein synthesis machinery	208	15.7	143	9.4
Proteinase inhibitor	23	1.5	20	2.3
Secreted	52	9.3	56	13.4
Signal transduction	99	3.2	80	2.5
Signal transduction, apoptosis	13	0.2	9	0.1
Storage	10	0.6	8	0.1
Transcription factor	15	0.9	13	0.5
Transcription machinery	119	6.5	76	4.8
Transporters/channels	68	2.5	48	3.4
Unknown	1	0.0	1	0.1
Unknown, conserved	40	1.1	30	1.4
Total	1,535	100	1,192	100

categories were: protein synthesis machinery (16% and 9% in DET and OVP groups, respectively), protein modification machinery (11% and 12%), secreted proteins (9% and 13%), and cytoskeleton (9% and 8%). Protein categories with abundance higher than 1% are displayed in Fig. 2B.

Among the 1079 proteins in common between the two developmental stages of GO, 342 are significantly different in abundance (blue dots in Fig. 2C). Protein synthesis machinery is more abundant in DET (15% versus 7% in OVP), whereas secreted proteins are more highly represented in OVP (22% versus 16% in DET), as observed also for lipocalins (8% in OVP versus 4% in DET). On the other hand, 633 proteins were found to be present at statistically equivalent abundance between the two GO developmental stages. These proteins are involved in protein synthesis and modification machineries, nuclear regulation, transcription machinery, and cytoskeleton (green and red dots in Fig. 2C). The data suggests that GO maintains a basal state before and during egg-laying, which is focused on the machinery for gene transcription and translation, structural proteins of cytoskeleton, secreted proteins, and lipocalins (Table 2).

Data further show a contrasting profile of proteins present exclusively in DET or OVP group (Fig. 3). In DET group, the majority of proteins belong to protein synthesis machinery (16%), nuclear regulation (10%), transcription machinery (9%), and transporters/channels (9%). In OVP group, the most abundant categories are secreted proteins (17%), transporters/channels (16%), lipid metabolism (13%), and unknown conserved proteins (13%). Thus, besides the basal metabolism observed in both stages, GO shows an activity more directed toward synthesis of molecules before oviposition, whereas during oviposition the activity seems more focused on secretion and transport, as well as metabolism of lipids, the main GO secretion product.

Due to the importance of antimicrobial activity in tick egg wax coat, GO proteome analysis was further refined to search for antimicrobial peptides (Supplementary Fig. 2). The antimicrobial peptide microplusin (Fogaça et al., 2004) was detected in GO during oviposition. This peptide has antimicrobial activity against the Gram-positive *Micrococcus luteus*, as well as yeasts (Esteves et al., 2009; Silva et al., 2009). Microplusin was identified in *R. microplus* egg homogenates and ovary yolk granules, suggesting its presence inside the egg; however, the peptide was not detected on egg surface (Esteves et al., 2009). There is so far no evidence that microplusin is secreted by GO onto the egg surface, however its antimicrobial activity could also be important for GO itself, since the organ is exposed to the environment during wax secretion. A second antimicrobial peptide detected in GO before and



**Fig. 3.** Proteins exclusively present in Gené's organ (GO) before or during egg-laying. Protein was obtained from GO in two developmental stages: (A) within 24 h of detachment from host (DET group) and (B) in the second day of oviposition (OVP group), i.e. around 5 days after detachment. Pie chart displays proteins exclusively identified in one of the groups (see Fig. 2A). Identified proteins are categorized according to their biological function. Categories' NSAF (Normalized Spectral Abundance Factor) is presented as percentage, normalized by the total NSAF of each group, in order to represent the total amount of each category in each GO stage. mach = machinery; met = metabolism.

**Table 4**  
Proteins involved in fatty acid metabolism found in GO proteome.

Contig*	Protein	NSAF in DET group	NSAF in OVP group
Rm-6290	Choline-phosphate cytidyltransferase	0.00	12.95
Rm-13823	Ethanolamine-phosphate cytidyltransferase	0.00	7.34
RmGO-3714	Fatty acid synthesis		
RmGO-4059	Fatty acid synthase	4.79	0.00
Rm-23018	Fatty acid synthase	16.15	5.06
Rm-42231	Acyl carrier protein	10.21	46.57
Rm-4764	Cyclopropane fatty acid synthase	2.71	0.00
Rm-68739	Stearoyl-CoA desaturase	19.35	73.50
Rm-72608	Fatty acid elongation		
Rm-72609	Elongation of VLFA protein	23.50	0.00
Rm-123996	Elongation of VLFA (similar to steroid reductase)	51.87	10.85
Rm-102163	Elongation of VLFA (similar to steroid reductase)	69.43	13.36
Rm-141551	Elongation of VLFA protein	0.00	39.66
Rm-33279	Elongation of VLFA protein 4	5.10	0.00
Rm-9802	Fatty acyl-CoA elongase	2.50	0.00
Rm-4369	Fatty acyl-CoA elongase	14.79	7.12
Rm-96077	Fatty acyl-CoA elongase	14.10	17.11
Rm-96078	3-hydroxyacyl-CoA dehydratase	16.39	0.00
Rm-49202	Acyl-CoA binding domain	9.64	4.42
Rm-31646	Acyl-CoA-binding domain-containing protein	11.08	18.37
Rm-41707	Acyl-CoA-binding protein	231.16	679.98
Rm-11272	Fatty acid oxidation		
Rm-32430	Acyl-CoA synthetase	5.00	0.00
Rm-25620	Acyl-CoA synthetase	2.04	0.00
Rm-144805	Long-chain acyl-CoA synthetase	19.07	0.00
RmGO-4794	Acyl-CoA synthetase family member 2	0.00	1.83
RmGO-6325	Acyl-CoA synthetase	23.82	2.31
RmGO-6254	Acyl-CoA synthetase	0.00	19.82
Rm-16734	Acetyl-coenzyme A synthetase, cytoplasmic	34.24	62.07
Rm-18519	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	22.16	105.62
Rm-119479	Acyl-CoA synthetase short-chain family member 2	44.08	107.67
Rm-13248	Carnitine O-palmitoyltransferase 1	2.93	0.00
Rm-22359	Carnitine O-palmitoyltransferase 2	11.37	13.08
Rm-61015	Citronellyl-CoA dehydrogenase	1.30	0.00
Rm-25417	Isovaleryl-CoA dehydrogenase	8.47	0.00
Rm-56723	Very long chain acyl-CoA dehydrogenase	38.78	17.94
Rm-55835	Butyryl-CoA dehydrogenase	13.27	1.78
Rm-33595	Isobutyryl-CoA dehydrogenase	16.25	14.68
Rm-19009	Acyl-CoA dehydrogenase	47.77	61.62
Rm-32779	Enoyl-CoA hydratase	99.47	40.60
Rm-78641	Enoyl-CoA hydratase / long-chain 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	245.01	306.54
Rm-26374	Enoyl-CoA hydratase	36.32	26.85
Rm-50647	Enoyl-CoA hydratase / long-chain 3- hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	272.07	326.66
Rm-75624	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase	35.89	25.34
Rm-25655	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase/ 3a,7a,12a-trihydroxy-5b-cholest-24- enoyl-CoA hydratase	147.42	216.44
Rm-50647	Acetyl-CoA C-acetyltransferase	43.86	85.12
Rm-75624	3-ketoacyl-CoA thiolase	75.15	129.17
Rm-25655	3-ketoacyl-CoA thiolase	24.97	46.40

\* Contig = sequence name in current GO proteome.

during egg-laying is an ixodidin-like peptide. Ixodidin has antimicrobial activity against *M. luteus* and *Escherichia coli*, and inhibits chymotrypsin and elastase (Fogaça et al., 2006). Whether an ixodidin-like peptide would function in GO as an antimicrobial or as a protease inhibitor remains to be elucidated.

### 3.3. Gené's organ synthesize, modify and oxidize lipids

The importance of GO was described by Gené in 1848 and Bertkau

in 1881, but the first evidence suggesting its secretion product is mainly composed by lipids came a century later (Lees and Beament, 1948). Histological observations support the idea that GO has a role in wax secretion and also in its synthesis, due to an enrichment of smooth and rough endoplasmic reticulum, Golgi, mitochondria, and lipid droplets in the cytoplasm of GO secretory cells (Booth, 1989; dos Santos et al., 2018; Kakuda et al., 1995). This conclusion is corroborated by the present data showing the presence of enzymes and other proteins involved in lipid metabolism before and during egg-laying (Fig. 2B), with higher abundance during oviposition (Fig. 3).

Proteins implicated in lipid metabolism that were exclusively found before egg-laying are related to fatty acid biosynthesis, activation, elongation and oxidation, biosynthesis and degradation of phospholipids and cholesterol transport. In contrast, proteins exclusively present during oviposition are involved in fatty acid activation, elongation and oxidation, isoprenoid biosynthesis, modification and degradation of cholesterol esters. Among the proteins exclusively present during oviposition we identified phosphocholine- and phosphoethanolamine cytidyltransferases (Table 4); the two enzymes participate in the main pathways for the *de novo* synthesis of phosphocholine and phosphoethanolamine, respectively (Gibellini and Smith, 2010). These are major glycerophospholipids present in eukaryotic cell membranes (Lagace and Ridgway, 2013), and are also present in egg wax, although at a lower abundance relative to other lipids (Yu et al., 2012).

Among lipid metabolism proteins found in common, but quantitatively different between the two stages (Fig. 2C), proteins involved in fatty acid elongation and oxidation, lipid transport and steroid metabolism predominate before the onset of oviposition. On the other hand, during oviposition, proteins related to fatty acid biosynthesis, activation and oxidation, acyl-CoA binding proteins (ACBP), and sterol metabolism are more abundant. Altogether, these data indicate that GO role in lipid metabolism before egg-laying favors fatty acid and steroid metabolism and transport, while during oviposition, fatty acid metabolism is maintained, but steroid modification and degradation increase. Indeed, a higher abundance of vitellogenins is detected before egg-laying, namely vitellogenin 2 and 5, which transport lipids from fat body to other organs (Kluck et al., 2018).

#### 3.3.1. Fatty acid metabolism in Gené's organ

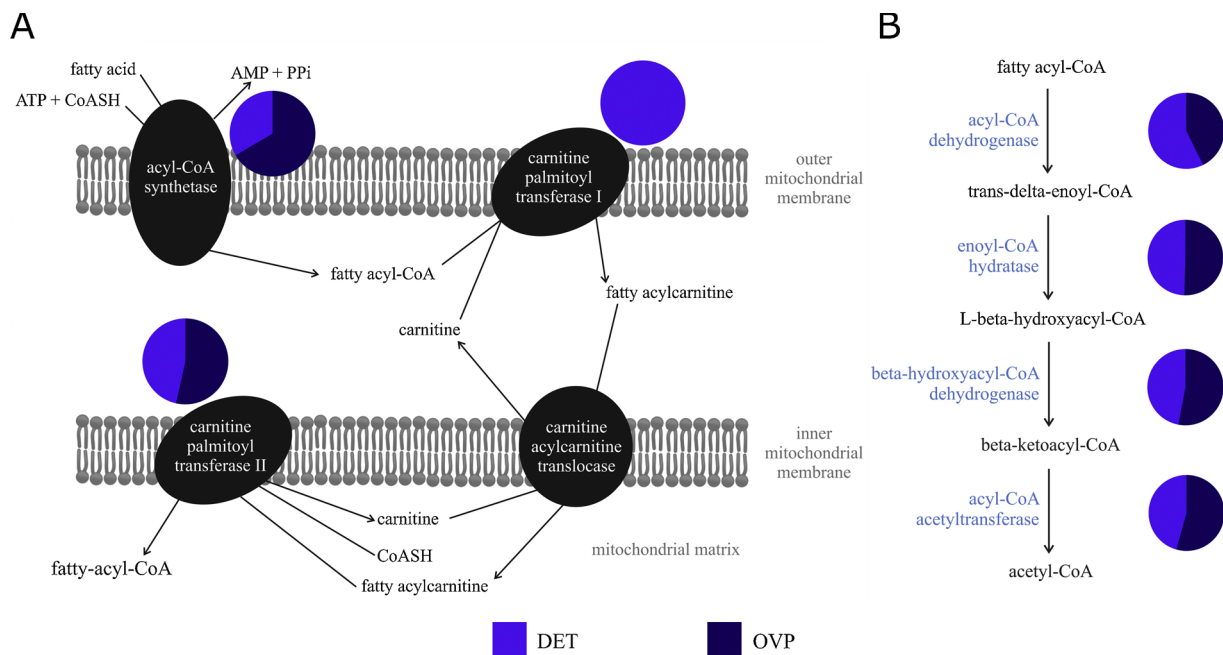
GO proteomic data show the presence of fatty acid synthases and their associated protein, acyl-carrier protein, before and during egg-laying (Table 4). Additionally, stearoyl-CoA desaturase and, interestingly, the less common cyclopropane fatty acid synthase are also present (Table 4). These enzymes participate in fatty acid biosynthesis by introducing unsaturation and by inserting a propane, respectively. Also, enzymes participating in the four-step process of fatty acid elongation (Kihara, 2012) are present before and during egg-laying (Table 4).

Acyl-CoA binding domain-containing proteins (ACBP) are known to function as intracellular acyl-CoA transporters, and to be involved in fatty acid elongation and sphingolipid synthesis (Nees et al., 2015). The presence of ACBP was detected at both GO developmental stages, being more pronounced during egg-laying (Table 4).

Among proteins related to fatty acid oxidation, acyl-CoA synthetases are present at both developmental stages, but more conspicuously during egg-laying (Table 4 and Fig. 4A). Carnitine palmitoyltransferase-1 and -2 are also present at both stages; however, carnitine-acylcarnitine translocase was not found (Table 4 and Fig. 4A). Enzymes catalyzing mitochondrial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acid (oxidation, hydration, oxidation, and thiolysis) (Adeva-Andany et al., 2018) are all present in GO, before and during oviposition (Table 4 and Fig. 4B).

#### 3.3.2. Steroids metabolism in Gené's organ

Similar to insects (CLARK and BLOCK, 1959), ticks are unable to synthesize the steroidal ring (Maroun and Kamal, 1976). Nevertheless, steroids derivatives are present and have crucial roles in tick metabolism, e.g. molting hormones (ecdysteroids and sesquiterpenoids) (Qu



**Fig. 4.** Fatty acid  $\beta$ -oxidation enzymes present in Gené's organ (GO) proteome. (A) The L-carnitine pathway to transport long- and medium-chain fatty acyl-CoA esters across the mitochondrial membrane. (B) Reaction steps involved in the  $\beta$ -oxidation of fatty acyl-CoA esters. Pie charts next to the enzymes display protein abundance in DET and/or OVP groups. DET group comprises ticks within 24 h of detachment from host, while OVP group is formed by ticks in the second day of oviposition, i.e. around 5 days after detachment.

et al., 2015), and free cholesterol and cholesterol esters in egg wax (Yu et al., 2012).

Mevalonate pathway exists in all higher eukaryotes and many bacteria. The importance of this pathway comes from its involvement in multiple metabolic functions, such as cholesterol synthesis and protein prenylation (Bellós et al., 2005; Glomset et al., 1990). Enzymes from mevalonate pathway related to prenylation are present in GO (highlighted in blue in Fig. 5), while enzymes participating in cholesterol synthesis were not found, in agreement with the notion that ticks do not synthesize cholesterol *de novo* (Maroun and Kamal, 1976). Likewise, enzymes from mevalonate pathway involved in steroid synthesis were not found in tick synganglion transcriptome (Zhu et al., 2016).

Other enzymes involved in steroid metabolism were detected in GO (Table 5), including hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs;  $3\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD, HSD like protein 2), which in mammals are involved in modifying or processing the steroidal ring (Penning, 1997). Oxidoreductases acting upon sterols (Penning, 1997) were also present: dehydrogenase/reductase 4, belonging to the short-chain dehydrogenases/reductases family, and 20-HSDs. Since ticks do not synthesize sterols *de novo*, these sterol metabolism enzymes may be involved in modifying exogenous sterols, originated from the host.

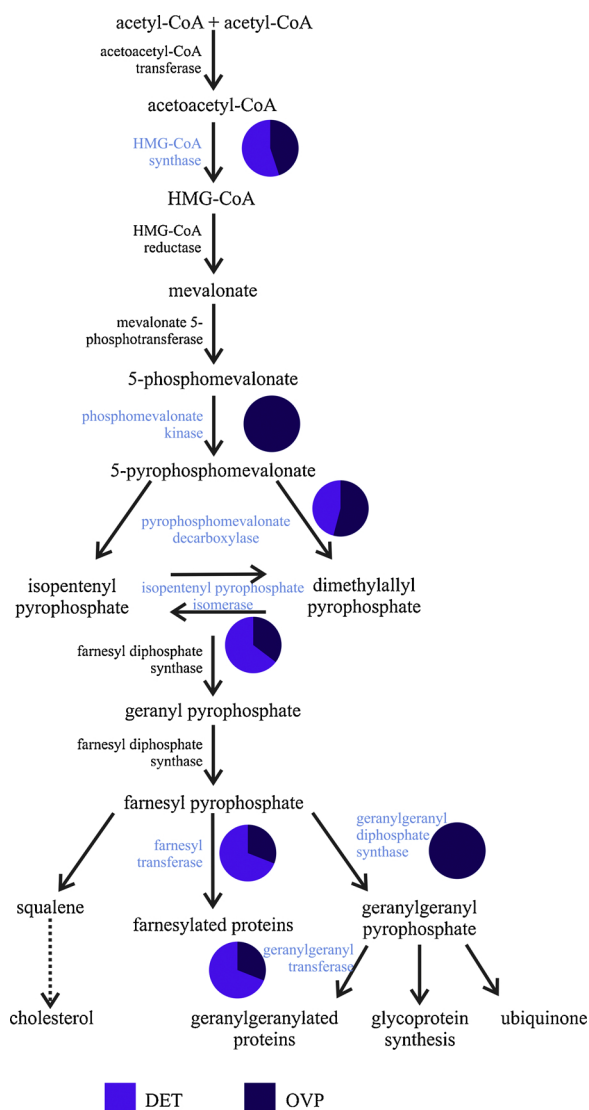
A cholesterol desaturase (DAF-36) is present in GO proteome, at higher abundance during egg-laying (Table 5). This protein may convert cholesterol into bioactive steroids, similar to its role in *Caenorhabditis elegans* (Wollam et al., 2011). Vigilin, an RNA-binding protein, regulates apolipoprotein B (apoB), apoC-III and fibronectin translation, and VLDL secretion, regulating triglyceride secretion in murine liver (Mobin et al., 2016). In GO, vigilin is more abundant before egg-laying (Table 5), and may be involved in the regulation of lipid secretion, given that up-regulation of murine vigilin leads to enhanced apoB synthesis and VLDL secretion when lipid availability is increased (Mobin et al., 2016). Oxysterol-binding proteins (OSBP) are present in GO before and during egg-laying (Table 5). OSBP and related proteins (ORP) are involved in cellular processes of signaling, vesicular trafficking, lipid metabolism, and non-vesicular sterol transfer (Olkkonen and Li, 2013; Raychaudhuri and Prinz, 2010).

A lipoprotein circulating in *R. microplus* hemolymph, namely HeLp

(heme lipoprotein) (Maya-Monteiro et al., 2000), is also present in GO at both developmental stages, more abundantly before egg-laying. HeLp is a hemeglycolipoprotein, with cholesterol ester reaching 35% of total lipid content (Maya-Monteiro et al., 2000). It is likely that HeLp carries lipids derived from fat body or diet to GO. Another protein involved in cholesterol metabolism is Niemann Pick C1-like protein (NPC1), which plays an essential role in lipid absorption in mammals (Altmann et al., 2004). It is also present at both developmental stages of GO and is more abundant during egg-laying. In *Drosophila melanogaster*, a mutation in *npc1b* gene led to poor cholesterol absorption in the gut, which was not observed in *npc1a* mutants or *npc1a/npc1b* double mutants, suggesting that, at least in this arthropod, there is an alternative pathway for cholesterol absorption (Voght et al., 2007).

Related to sterol catabolism, a methylmalonyl-CoA mutase was detected before and during egg-laying (Table 5). This enzyme directs the breakdown of some amino acids, odd-chain fatty acids, and the side chain of cholesterol, to the tricarboxylic acid cycle (Fornly et al., 2014). Additionally, a lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase, which hydrolyses cholesterol esters to free cholesterol, is present in GO during oviposition. After leaving the lysosome, free cholesterol is re-esterified in the endoplasmic reticulum, in order to form lipid droplets (Dubland and Francis, 2015).

Altogether, our results support the hypothesis that GO is equipped with the full machinery for synthesis, elongation, oxidation, and secretion of fatty acids; it also has a machinery for modification, degradation, and secretion of sterols, despite not being able to synthesize them. Lipid secretion is performed by GO secretory glands, in order to cover the eggs and protect them from environmental conditions of humidity and temperature, and from microorganisms. Proteomic and transcriptomic data reveal that, before egg-laying, GO is engaged in preparation for its role during oviposition, as suggested by the presence of cell division machinery, transcription and protein synthesis, including proteins that participate in cytoskeleton composition. Protein synthesis is maintained in the next stage during egg-laying, while the secretion, transport, and metabolism of wax content is more abundant, in order to coat the huge number of eggs each tick lays. To date, a few reports on GO focused on morphology, histology, *modus operandi*, and



**Fig. 5.** Mevalonate pathway enzymes present in Gené's organ (GO) proteome. Enzymes from mevalonate pathway identified in GO proteome are highlighted in blue. Next to each enzyme, pie charts display protein abundance in DET and/or OVP groups. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

DET group comprises ticks within 24 h of detachment from host, while OVP group is formed by ticks in the second day of oviposition, i.e. around 5 days after detachment.

wax lipid composition. The present study offers a new insight into GO physiology, showing metabolic pathways that are present during the maturation of this organ, and highlighting its importance in tick reproduction. Furthermore, this kind of approach unveils proteins and pathways contributing to egg viability and development in the environment, thus identifying potential targets for new tick control methods.

#### 4. Author contributions

Conceived and designed the experiments: M.A.X., L.T., A.F.M.P., S.G., M.F., I.S.V.J. and C.T.

Performed the experiments: M.A.X., L.T., A.F.M.P., J.K.D., and S.G. Contributed reagents/materials/analysis tools: J.R.Y., M.F., I.S.V.J., and C.T.

Drafting the article: M.A.X., L.T., A.F.M.P., I.S.V.J. and C.T.

Critical revision of the article: M.A.X., L.T., A.F.M.P., J.K.D., J.R.Y.,

**Table 5**

Proteins related to sterol metabolism found in GO proteome.

Contig <sup>a</sup>	Protein	NSAF in DET group	NSAF in OVP group
	Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs)		
Rm-17271	C-3 sterol dehydrogenase/3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase	27.87	4.17
Rm-27216	17 beta-estradiol 17-dehydrogenase / very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	142.83	94.69
Rm-27217	17 beta-estradiol 17-dehydrogenase / very-long-chain 3-oxoacyl-CoA reductase	161.81	108.26
Rm-24527	Hydroxysteroid dehydrogenase like protein 2	11.43	10.81
Rm-17111	Oxidoreductases		
Rm-17111	Dehydrogenase/reductase SDR family member 4	14.13	25.95
Rm-20284	20-hydroxysteroid dehydrogenase	89.76	64.52
Rm-44374	20-hydroxysteroid dehydrogenase	91.60	68.64
Rm-74118	20-hydroxysteroid dehydrogenase	66.89	56.19
	Cholesterol metabolism		
Rm-76179	Cholesterol desaturase daf-36	0.00	6.74
RmGO-5901	Cholesterol desaturase daf-36	0.00	40.45
	Lipid secretion regulation		
Rm-120182	Vigilin	19.63	3.97
	Oxysterol and cholesterol-binding		
Rm-46794	Oxysterol-binding protein	16.82	37.85
Rm-19473	Oxysterol-binding protein	8.32	4.03
	Lipoprotein		
Rm-6525	Hemelipoprotein (HeLp)	84.17	5.08
Rm-89257	Hemelipoprotein (HeLp) 2	109.32	5.41
	Lipid absorption		
Rm-32890	Niemann-Pick C1 protein	8.66	0.00
Rm-74103	Niemann-Pick C1 protein	119.50	219.01
Rm-57573	Niemann-Pick C2 protein	59.99	111.66
Rm-18926	Niemann-Pick C2 protein	0.00	24.52
	Sterol catabolism		
Rm-71018	Methylmalonyl-CoA mutase	21.59	11.44
Rm-70838	Methylmalonyl-CoA mutase	20.16	8.78
Rm-7892	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	0.00	34.40

<sup>a</sup> Contig = sequence name in current GO proteome.

S.G., M.F., I.S.V.J., and C.T.

#### Conflict of interest

The authors certify that they have no affiliations with, or involvement in any organization or entity with any financial interest in the subject matter or materials discussed in this manuscript.

#### Acknowledgements

This research was supported by FAPERJ, INCT-Entomologia Molecular, CNPq and CAPES from Brazil; by CONICET from Argentina; by National Institute of General Medical Sciences (8 P41 GM103533) from USA. The authors would like to thank Dr. José M.C. Ribeiro for providing the VB programs used in transcriptomic analysis and protein annotation.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.013>.

#### References

Adeva-Andany, M.M., Carneiro-Freire, N., Seco-Filgueira, M., Fernández-Fernández, C., Mourino-Bayolo, D., 2018. Mitochondrial  $\beta$ -oxidation of saturated fatty acids in



- humans. Mitochondrion 1–18. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2018.02.009>.
- Altmann, S.W., Davis, H.R., Zhu, L.J., Yao, X., Hoos, L.M., Tetzloff, G., Iyer, S.P.N., Maguire, M., Golovko, A., Zeng, M., Wang, L., Murgolo, N., Graziano, M.P., 2004. Niemann-Pick C1 Like 1 Protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science* 303, 1201–1204. <https://doi.org/10.1126/science.1093131>.
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J., 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
- Arrese, E.L., Soulagès, J.L., 2010. Insect fat body: energy, metabolism, and regulation. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 207–225. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-112408-085356>.
- Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., Kaufman, W.R., 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 39, 297–313. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9014-5>.
- Beaufays, J., Adam, B., Decrem, Y., Prévôt, P.P., Santini, S., Brasseur, R., Brossard, M., Lins, L., Vanhamme, L., Godfroid, E., 2008. *Ixodes ricinus* tick lipocalins: identifications, cloning, phylogenetic analysis and biochemical characterization. *PLoS ONE* 3, e3941. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003941>.
- Bellés, X., Martín, D., Piulachs, M.-D., 2005. The mevalonate pathway and the synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 50, 181–199. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.50.071803.130356>.
- Bolger, A.M., Lohse, M., Usadel, B., 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Booth, T.F., 1989. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. *Tissue Cell* 21, 113–122. [https://doi.org/10.1016/0040-8166\(89\)90026-8](https://doi.org/10.1016/0040-8166(89)90026-8).
- Booth, T.F., 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 14, 137–149. <https://doi.org/10.1007/BF01219106>.
- Booth, T.F., Beadle, D.J., Hart, R.J., 1985. An ultrastructural and physiological investigation of the retractor muscles of Gené's organ in the cattle ticks *Boophilus microplus* and *Amblyomma variegatum*. *Exp. Appl. Acarol.* 1, 165–177. <https://doi.org/10.1007/BF01270595>.
- Canavoso, L.E., Jouni, Z.E., Karnas, K.J., Pennington, J.E., Wells, M.A., 2001. Fat metabolism in insects. *Annu. Rev. Nutr.* 21, 23–46. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.21.1.23>.
- Carvalho, P.C., Lima, D.B., Leprevost, F.V., Santos, M.D.M., Fischer, J.S.G., Aquino, P.F., Moresco, J.J., Yates, J.R., Barbosa, V.C., 2016. Integrated analysis of shotgun proteomic data with PatternLab for proteomics 4.0. *Nat. Protoc.* 11, 102–117. <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>.
- Clark, A.J., Block, K., 1959. The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.* 234, 2578–2582.
- De Lima-Netto, S., Pinheiro, A., Nakano, E., Zucatelli Mendonça, R.M., Barros-Battesti, D.M., Mendonça, R.Z., 2012. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Cytotechnology* 64, 601–606. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9444-3>.
- Deutsch, E.W., Csordas, A., Sun, Z., Jarnuczak, A., Perez-Riverol, Y., Ternent, T., Campbell, D.S., Bernal-Llinares, M., Okuda, S., Kawano, S., Moritz, R.L., Carver, J.J., Wang, M., Ishihama, Y., Bandeira, N., Hermjakob, H., Vizcaíno, J.A., 2017. The ProteomeXchange consortium in 2017: supporting the cultural change in proteomics public data deposition. *Nucleic Acids Res.* 45, D1100–D1106. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw936>.
- dos Santos, M.F., Maltauro Soares, M.A., Lallo, M.A., Barros-Battesti, D.M., de Lima-Netto, S., Spadacci-Morena, D.D., 2018. Morphodifferentiation of Gené's organ in engorged *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 female ticks (Acari: Ixodidae). *Ticks Tick Dis.* 9, 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.01.004>.
- Dubland, J.A., Francis, G.A., 2015. Lysosomal acid lipase: at the crossroads of normal and atherogenic cholesterol metabolism. *Front. Cell Dev. Biol.* 3, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fcell.2015.00003>.
- Edelmann, B., Gothe, R., 2000. The mechanism of oviposition in *Argas (Percicargas) walkerae* (Acari: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 24, 927–940. <https://doi.org/10.1023/A:1010613202269>.
- El Shoura, S.M., 1987. Fine structure of the Gené's organ in the camel tick *Hyalomma (Hyalomma) dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). *J. Morphol.* 193, 91–98. <https://doi.org/10.1007/BF01197927>.
- El Shoura, S.M., 1988. Fine structure of the vagina, accessory glands, uterus, oviducts and Gené's organ in the unfed tick, *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea: Argasidae). *Exp. Appl. Acarol.* 4, 95–108. <https://doi.org/10.1007/BF01193868>.
- Eng, J.K., Jahan, T.A., Hoopmann, M.R., 2013. Comet: an open-source MS/MS sequence database search tool. *Proteomics* 13, 22–24. <https://doi.org/10.1002/pmic.201200439>.
- Esteves, E., Fogaça, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P.A., Pelajo-Machado, M., Valle, D., Daffre, S., 2009. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.009>.
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.08.001>.
- Fogaça, A.C., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Tanaka, A.S., Bulet, P., Daffre, S., 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* 27, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.013>.
- Forn, P., Froese, D.S., Suormala, T., Yue, W.W., Baumgartner, M.R., 2014. Functional characterization and categorization of missense mutations that cause methylmalonyl-CoA mutase (MUT) deficiency. *Hum. Mutat.* 35, 1449–1458. <https://doi.org/10.1002/humu.22633>.
- Gibellini, F., Smith, T.K., 2010. The Kennedy pathway-*de novo* synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62, 414–428. <https://doi.org/10.1002/iub.337>.
- Glomset, J.A., Gelb, M.H., Farnsworth, C.C., 1990. Prenyl proteins in eukaryotic cells: a new type of membrane anchor. *Trends Biochem. Sci.* 15, 139–142. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90213-U](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90213-U).
- Grabherr, M.G., Haas, B.J., Yassour, M., Levin, J.Z., Thompson, D.A., Amit, I., Adiconis, X., Fan, L., Raychowdhury, R., Zeng, Q., Chen, Z., Mauceli, E., Hacohen, N., Gnirke, A., Rhind, N., Di Palma, F., Birren, B.W., Nusbaum, C., Lindblad-Toh, K., Friedman, N., Regev, A., 2011. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. <https://doi.org/10.1038/nbt.1883>.
- Kakuda, H., Mori, T., Shiraishi, S., 1992. Functional morphology of Gené's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 16, 263–275. <https://doi.org/10.1007/BF01193809>.
- Kakuda, H., Nishimura, H., Mari, T., Shiraishi, S., 1995. Structural changes of the female genital system during and after feeding in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). *J. Fac. Agric. - Kyushu Univ.* 40, 61–71.
- Karim, S., Singh, P., Ribeiro, J.M.C., 2011. A deep insight into the sialotranscriptome of the gulf coast tick, *Amblyomma maculatum*. *PLoS One* 6, e28525. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028525>.
- Kihara, A., 2012. Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J. Biochem.* 152, 387–395. <https://doi.org/10.1093/jb/mvs105>.
- Kluck, G.E.G., Silva Cardoso, L., De Cicco, N.N.T., Lima, M.S., Folly, E., Atella, G.C., 2018. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Ticks Tick Dis.* 9, 850–859. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.03.010>.
- Lagace, T.A., Ridgway, N.D., 2013. The role of phospholipids in the biological activity and structure of the endoplasmic reticulum. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1833, 2499–2510. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.05.018>.
- Langmead, B., Salzberg, S.L., 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Lees, A.D., Beament, J.W.L., 1948. An egg-waxing organ in ticks. *Q. J. Microsc. Sci.* 89, 291–322.
- Magóç, T., Salzberg, S.L., 2011. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics* 27, 2957–2963. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr507>.
- Majerowicz, D., Gondim, K.C., 2013. Insect lipid metabolism: insights into gene expression regulation. In book: recent trends in Gene expression, edition 1, chapter 7. *Recent Trends in Gene Expression*. pp. 147–190.
- Marchler-Bauer, A., Panchenko, A.R., Shoemaker, B.A., Thiesen, P.A., Geer, L.Y., Bryant, S.H., 2002. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 30, 281–283. <https://doi.org/10.1093/nar/30.1.281>.
- Maroun, N.A., Kamal, K.A., 1976. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Absence of sterol biosynthesis in *Dermacentor andersoni stiles* (Acarina: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 13, 219–220. <https://doi.org/10.1093/jmedent/13.2.219>.
- Maya-Monteiro, C.M., Daffre, S., Logullo, C., Lara, F.A., Alves, E.W., Capurro, M.L., Zingali, R., Almeida, I.C., Oliveira, P.L., 2000. HeLP, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275, 36584–36589. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007344200>.
- Mobin, M.B., Gerstberger, S., Teupser, D., Campana, B., Charisse, K., Heim, M.H., Manoharan, M., Tuschl, T., Stoffel, M., 2016. The RNA-binding protein vigilin regulates VLDL secretion through modulation of Apob mRNA translation. *Nat. Commun.* 7, 12848. <https://doi.org/10.1038/ncomms12848>.
- Neelakanta, G., Sultana, H., Sonenshine, D.E., Andersen, J.F., 2018. Identification and characterization of a histamine-binding lipocalin-like molecule from the relapsing fever tick *Ornithodoros turicata*. *Insect Mol. Biol.* 27, 177–187. <https://doi.org/10.1111/imb.12362>.
- Neess, D., Bek, S., Engelsby, H., Gallego, S.F., Færgeman, N.J., 2015. Long-chain acyl-CoA esters in metabolism and signaling: role of acyl-CoA binding proteins. *Prog. Lipid Res.* 59, 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2015.04.001>.
- Olkonen, V.M., Li, S., 2013. Oxysterol-binding proteins: sterol and phosphoinositide sensors coordinating transport, signaling and metabolism. *Prog. Lipid Res.* 52, 529–538. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.06.004>.
- Penning, T.M., 1997. Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr. Rev.* 18, 281–305. <https://doi.org/10.1016/j.ada.2014.12.008>.
- Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzfel, A., Jung, G., Diehl, P.A., Petri, O., 1997. Boophilin, an antimicrobial sterol amide from the cattle tick *Boophilus microplus*. *Helv. Chim. Acta* 80, 2066–2072. <https://doi.org/10.1002/hlca.19970800707>.
- Qu, Z., Kenny, N.J., Lam, H.M., Chan, T.F., Chu, K.H., Bendena, W.G., Tobe, S.S., Hui, J.H.L., 2015. How did arthropod sesquiterpenoids and ecdysteroids arise? Comparison of hormonal pathway genes in noninsect arthropod genomes. *Genome Biol. Evol.* 7, 1951–1959. <https://doi.org/10.1093/gbe/evv120>.
- Raychaudhuri, S., Prinz, W.A., 2010. The diverse functions of oxysterol-binding proteins. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 26, 157–177. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.042308.113334>.
- Reck, J., Berger, M., Terra, R.M.S., Marks, F.S., da Silva Vaz, I., Guimarães, J.A., Termignoni, C., 2009. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. *Res. Vet. Sci.* 86, 56–62. <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.007>.
- Ribeiro, J.M.C., Martin-Martin, I., Arcá, B., Calvo, E., 2016. A deep insight into the sialome of male and female *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS One* 11, e0151400. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151400>.

- [doi.org/10.1371/journal.pone.0151400](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151400).
- Roberts, A., Pachter, L., 2013. Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat. Methods* 10, 71–73. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2251>.
- Robinson, M.D., McCarthy, D.J., Smyth, G.K., 2009. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>.
- Roversi, P., Johnson, S., Preston, S.G., Nunn, M.A., Paesen, G.C., Austyn, J.M., Nuttall, P.A., Lea, S.M., 2017. Structural basis of cholesterol binding by a novel clade of dendritic cell modulators from ticks. *Sci. Rep.* 7, 16057. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16413-2>.
- Ryan, R.O., van der Horst, D.J., 2000. Lipid transport biochemistry and its role in energy production. *Annu. Rev. Entomol.* 45, 233–260. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.233>.
- Schöl, H., Sieberz, J., Göbel, E., Gothe, R., 2001. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 25, 327–352. <https://doi.org/10.1023/A:1017963531560>.
- Sieberz, J., Gothe, R., 2000. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 24, 63–76. <https://doi.org/10.1023/A:1006351019078>.
- Silva, F.D., Rezende, C.A., Rossi, D.C.P., Esteves, E., Dyszy, F.H., Schreier, S., Gueiros-Filho, F., Campos, C.B., Pires, J.R., Daffre, S., 2009. Structure and mode of action of microplusin, a copper II-chelating antimicrobial peptide from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Biol. Chem.* 284, 34735–34746. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.016410>.
- Tidwell, J.T., 2015. Differential Gene Expression Between Two Developmental Stages of the Gené's Organ in the Cattle Fever Tick, *Rhipicephalus (Boophilus) Microplus*. University of Texas-pan American.
- Vizcaíno, J.A., Csordas, A., Del-Toro, N., Dienes, J.A., Griss, J., Lavidas, I., Mayer, G., Perez-Riverol, Y., Reisinger, F., Ternent, T., Xu, Q.W., Wang, R., Hermjakob, H., 2016. 2016 update of the PRIDE database and its related tools. *Nucleic Acids Res.* 44, D447–D456. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1145>.
- Voght, S.P., Fluegel, M.L., Andrews, L.A., Pallanck, L.J., 2007. Drosophila NPC1b promotes an early step in sterol absorption from the midgut epithelium. *Cell Metab.* 5, 195–205. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.011>.
- Wessel, D., Flugge, U.I., 1984. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141–143. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90782-6](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90782-6).
- Wollam, J., Magomedova, L., Magner, D.B., Shen, Y., Rottiers, V., Motola, D.L., Mangelsdorf, D.J., Cummins, C.L., Antebi, A., 2011. The Rieske oxygenase DAF-36 functions as a cholesterol 7-desaturase in steroidogenic pathways governing longevity. *Aging Cell* 10, 879–884. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2011.00733.x>.
- Yu, Z., Thomson, E.L.S., Liu, J., Dennis, J.J., Jacobs, R.L., Kaufman, W.R., 2012. Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. *Exp. Appl. Acarol.* 58, 453–470. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9586-1>.
- Zhu, J., Khalil, S.M., Mitchell, R.D., Bissinger, B.W., Egekwu, N., Sonenshine, D.E., Roe, R.M., 2016. Mevalonate-farnesal biosynthesis in ticks: comparative synganglion transcriptomics and a new perspective. *PLoS One* 11, 1–27. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141084>.
- Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Giordani, R.B., Conceição, J.M., Nicastro, G.G., Boechat, A.L., Baldini, R.L., Abraham, W.R., Termignoni, C., 2013a. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 15, 2008–2018. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12082>.
- Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Nicastro, G.G., Baldini, R.L., Termignoni, C., 2013b. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Ticks Tick. Dis.* 4, 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.005>.
- Zybaylov, B., Mosley, A.L., Sardiu, M.E., Coleman, M.K., Florens, L., Washburn, M.P., 2006. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.* 5, 2339–2347. <https://doi.org/10.1021/pr060161n>.

### 3.2. Capítulo 2

Reducing tick cholesterol absorption impairs embryo development and egg protection against  
bacteria

Manuscrito em redação

Marina Amaral Xavier, Flávia Roberta Brust, Alexandre José Macedo, Itabajara da Silva Vaz  
Júnior, Carlos Termignoni

Projeção dos experimentos: M.A.X., F.R.B., A.J.M., I.S.V.J. e C.T.

Execução dos experimentos: M.A.X. e F.R.B.

Contribuição com reagentes/materiais/ferramentas de análise: A.J.M., I.S.V.J., e C.T.

Escrita do artigo: M.A.X., I.S.V.J. e C.T.

Revisão do artigo: M.A.X., F.R.B., A.J.M., I.S.V.J., e C.T.

Title:

Reducing tick cholesterol absorption impairs embryo development and egg protection against bacteria

Marina Amaral Xavier<sup>1</sup>, Flávia Roberta Brust<sup>2</sup>, Alexandre José Macedo<sup>1,2</sup>, Itabajara da Silva Vaz Júnior<sup>1,3</sup>, Carlos Termignoni<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>3</sup>Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

\*Corresponding author: [ctermignoni@cbiot.ufrgs.br](mailto:ctermignoni@cbiot.ufrgs.br)

## 1. Introduction

Besides the crucial role of cholesterol as a component of cellular membranes, it is also a precursor of tick molecules, such as the 20-hydroxyecdysone hormone (Sonenshine et al., 1985) and the antimicrobial molecule boophilin (Potterat et al., 1997; Zimmer et al., 2013a), which is one of the components of egg wax protective coat. In spite the importance of cholesterol and cholesterol derivatives, ticks lack the cholesterol biosynthesis pathway (Maroun and Kamal, 1976), as well as insects (Clark and Block, 1959) and some other parasites (Bansal et al., 2005). Thus, for ticks the unique cholesterol source is the host blood. Indeed, blood is a rich source of cholesterol. *Amblyomma americanum* has sterol derivatives semiochemicals (Renthal et al., 2019) in its surface. Females and males which fed together present cholesteryl esters that may be related to mating pheromones, and these females also have dehydrodeoxyecdysone, a sexual pheromone derivative from ecdysone. In addition, unfed females and males present dihydrocholesteryl esters, which may be related to tick survival while searching for a host.

In ticks, cholesterol absorption pathway in gut is not yet known, but in insects it is reasonably understood (Majerowicz and Gondim, 2013; Turunen and Crailsheim, 1996). In gut lumen, a cholesterol esterase converts esterified cholesterol in free cholesterol and fatty acids. Then, free cholesterol is transported into enterocytes by a Niemann-Pick C (NPC) transmembrane protein. An acyl-CoA acyltransferase (ACAT) reconverts it into esterified cholesterol on the endoplasmic reticulum membrane. Later, the cholesterol ester is transported by lipophorins through the hemolymph, to be stored in lipid droplets in other tissues, such as ovary and fat body (Majerowicz and Gondim, 2013). In mammals, ezetimibe inhibits Niemann-Pick C1 like 1 protein (Garcia-Calvo et al., 2005), leading to a reduction in the formation and secretion of chylomicrons and the inhibition of biliary cholesterol resorption, thus depleting the cholesterol stocks in the liver (Benito-Vicente et al., 2018). Meanwhile, avasimibe inhibits ACAT, provoking an *in vitro* reduction of foamy macrophages by decreasing oxidized LDL uptake and increasing cholesterol efflux, and reducing apolipoprotein B secretion by the liver (Llaverías et al., 2003).

The effects of cholesterol metabolism inhibition by ezetimibe and avasimibe were studied in some protozoa. Ezetimibe, *in vitro*, decreased *Cryptosporidium parvum* growth (Ehrenman et al., 2013) and led to morphological alterations in *Leishmania amazonensis* promastigotes (Andrade-Neto et al., 2016), both in a dose-dependent manner. Also, besides decreasing *L. amazonensis* loads *in vivo*, it decreased the development of cutaneous lesions (Andrade-Neto et al., 2016). Also, in a dose-dependent manner,

avasimibe decreases storage of cholesterol esters in *Trypanosoma cruzi* (Pereira et al., 2015).

The current study is based on the hypothesis that interfering in cholesterol metabolism, a fundamental and supposedly not redundant pathway in ticks, could be an approach to impair tick viability and be useful to support tick new control methods. Data show that *Rhipicephalus microplus* females, a tick of husbandry importance, artificially fed with blood containing ezetimibe and avasimibe have the reproductive ability, egg development and resistance to bacterial colonization impaired. In conclusion, data presented support the hypothesis that enzymes and other proteins involved in the cholesterol metabolism are molecules suitable as targets for tick control.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Ethic statements**

The current research was conducted in accordance to the ethic and methodological guidance, in agreement with the International and National Directives and Norms by Animal Experimentation Ethics Committee of Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) (project n° 27559).

### **2.2. Animals**

Hereford calves (*Bos taurus taurus*), brought from a naturally tick-free area and maintained in insulated pens, was infested with 15-day-old larvae of a laboratory colony of *R. microplus* (Porto Alegre strain, Porto Alegre, Brazil) (Reck et al., 2009). After 21 days, partially engorged female ticks were removed from host, weighted and placed on plates for artificial feeding.

### **2.3. Artificial feeding**

For the first experiment, tick females were randomly distributed in four groups, each containing 15 partially engorged females weighting between 25 and 60 mg. Ticks were fed on capillaries filled with calf blood, according to previously established protocol (Fabres et al., 2010; Gonsioroski et al., 2012). Ticks in the control groups fed only on calf blood (blood group) or with 25 µL calf blood containing 1% DMSO (Sigma Aldrich) per female (DMSO group). Ticks from the third group (AVS group) fed with 25 µL calf blood containing avasimibe (Sigma Aldrich) (7.5 nmol + 1% DMSO per female), and ticks from the fourth group (EZT group) fed withon ezetimibe-containing blood (Sigma Aldrich) (9.2 nmol + 1% DMSO per female). After 24h, ticks from all groups fed *ad libitum* on calf blood without drugs. Subsequently, ticks were weighted, placed on plates and maintained in an incubator (28° C ± 1° C, 85-90% humidity) for egg laying. In the first oviposition day, a little amount of eggs (from 1 to 3 mg) from each female was collected and frozen to later be used on biofilm formation assay (section 2.6) After 10 days, the egg mass laid by each female were weighted, placed on tubes and maintained in the same incubator for larvae hatching. After 20 days, larvae mass was weighted. The experiment was performed twice.

For the second artificial feeding experiment, 30 partially engorged females (also weighting between 25 and 60 mg) were randomly distributed in three groups. Similarly to the previous artificial feeding experiment, the first group was fed only on calf blood

(blood group), the second group was fed with 50  $\mu$ L calf blood containing 0.3% DMSO per female (DMSO group), and the third group was fed with 50  $\mu$ L calf blood containing avasimibe (15 nmol + 0.3% DMSO per female) (AVS group). The same procedures and analysis used in the first artificial feeding experiment were performed. Midgut and Gené's organ from three females from each group were dissected for lipid extraction. In addition, lipids were extracted from the protective wax coat of eggs that did not hatch (AVS group) (i.e. 30-dayold). This experiment was performed three times.

#### **2.4. Lipid extraction and quantification**

Tissues (midgut and Gené's organ) from females of blood, DMSO and AVS (15 nmol per female) groups were dissected using scissors and forceps, with the help of a stereoscope. Each tissue was immersed in a chloroform/methanol/water solution (2:2.5:0.8 v/v), in a proportion of 5 mL solution per 5 mg tissue (wet weight), homogenized with the help of a pestle and stored at -20° C. Lipid extraction was performed according to Bligh and Dyer (1959), with modifications. Each tissue-containing solution was vigorously stirred for 30 s, each 5 min, during 1 h. Then, the solution was centrifuged at 3,000 g, for 20 min at 4° C. The supernatant was saved in a new tube and the pellet was submitted to a new lipid extraction: vigorously stirred for 30 s, each 5 min, during 1 h. The solution was centrifuged at 3,000 g, for 20 min at 4° C, and the supernatant was mixed with the first supernatant. The pellet was discarded. For each 5 mL of the mixed supernatants, it was added 1 mL of chloroform and 1 mL of water. Solution was vigorously stirred for 45 s and centrifuged at 3,000 g, for 20 min at 4° C. Aqueous and organic phases were separated and stored at -20° C until use. Nitrogen stream was used to dry the organic phase and the precipitate was weighted.

Eggs (220 mg) from AVS group (15 nmol AVS per female), which did not hatch, were pooled after the end of the artificial feeding. Control eggs (220 mg, circa 15 days old) were collected from tick females that were not submitted to artificial feeding experiments. Wax coat from both egg groups were extracted according to Arrieta et al. (2006). Aqueous and organic phases were separated and stored at -20° C until use. Nitrogen stream was used to dry the organic phase and the precipitate was weighted.

Cholesterol Quantitation Kit (Sigma Aldrich) was used to quantify cholesterol content in tissues and eggs wax coat extracts. Each organic phase sample precipitate was diluted in the assay buffer provided by the manufacture to a final concentration of 5 mg/mL. For these assays it was used 15  $\mu$ g of midgut, 75  $\mu$ g of Gené's organ and 150  $\mu$ g



of eggs wax coat extracts. Fluorescence was measured in a SpectraMax M2 microplate reader (Molecular Devices),  $\lambda_{\text{ex}} = 535 \text{ nm}$  and  $\lambda_{\text{em}} = 587 \text{ nm}$ .

## **2.5. Statistical analyzes**

Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA test (multiple comparisons) or Welch's *t*-test (total cholesterol quantification from eggs wax coat) in GraphPad Prism v. 7.00.

## **2.6. Biofilm formation on egg surface**

*Pseudomonas aeruginosa* was used as a model for biofilm formation. *P. aeruginosa* strain UCBPP-PA14 was grown in plates containing Mueller-Hinton agar medium at 37°C, overnight. For the biofilm formation assay, bacterial optical density (600 nm) was adjusted to an equivalent of  $10^8$  CFU/mL (Colony Forming Units) in sterile 0.9% saline solution, and then tryptone soya broth (TSB) was added. Biofilm formation protocol (Zimmer et al., 2013a) was adapted from Trentin et al., (2011). Eggs from each female were kept separately in tubes. Eggs from females of each group (blood, DMSO, EZT and AVS) were washed twice in 0.9% saline solution and then incubated in 1 mL of the bacterial suspension for 24 h, at 37°C. Following incubation period, eggs were washed twice in 0.9% saline solution and fixed with 2.5% glutaraldehyde in cacodylate buffer until observed in a scanning electronic microscope.

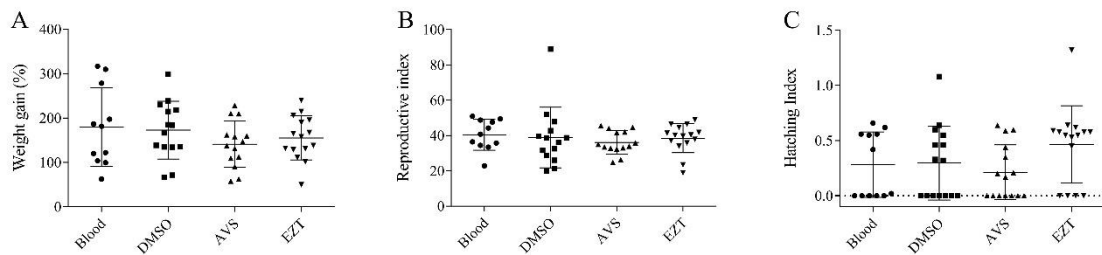
## **2.7. Scanning electron microscopy (SEM)**

Sample preparation was adapted from the technique described by Trentin et al. (2011). Tubes with eggs from each female were washed with 100 mM cacodylate buffer pH 7.2 and dehydrated successively in increasing concentrations of acetone. Then, eggs were dried by the CO<sub>2</sub> critical point technique (CPD 030 Balzers, Liechtenstein) and fixed on aluminum stubs to be covered with a gold film and examined in a JEOL JSM-6060 scanning electron microscope.

### 3. Results

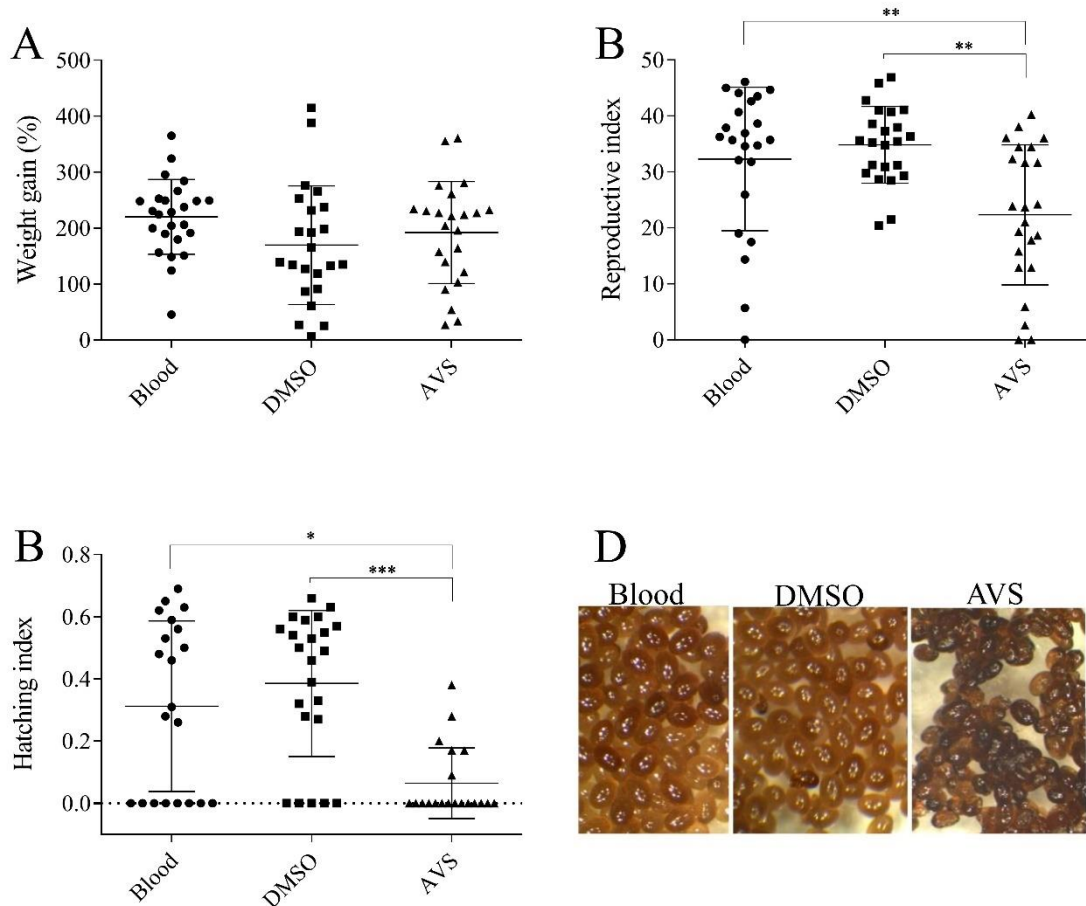
#### 3.1. Effects of cholesterol metabolism inhibitors

There was no difference in female engorgement, amount of eggs laid and larvae hatching between ticks fed on blood alone or blood plus DMSO (controls) and ticks fed with blood supplied with cholesterol metabolism inhibitors (EZT and AVS) (Fig. 1). On the other hand, despite no difference was observed in female engorgement (Fig. 2A), females which received increased concentration of avasimibe are less fertile and larvae have a lower hatching index (Fig. 2B and C), compared to the control groups (fed on blood and blood with DMSO added). Additionally, eggs laid by ticks fed with AVS are darker and shriveled (Fig. 2D).



**Figure 1: Effect of cholesterol metabolism inhibitors on tick biological parameters.**

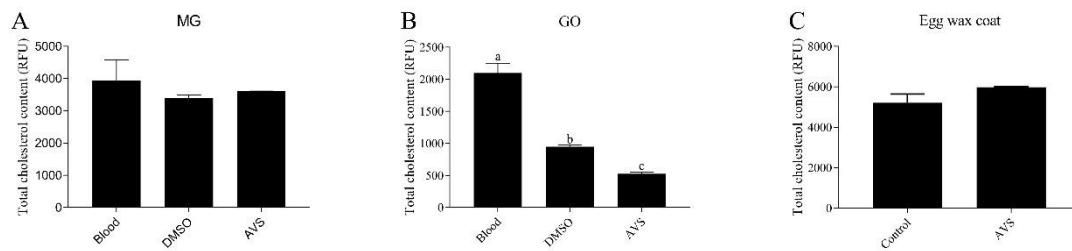
*R. microplus* partially engorged females were fed in blood containing the inhibitors avasimibe (AVS) (7.5 nmol per female) or ezetimibe (EZT) (9.2 nmol per female). (A) Ticks weight gain (the difference in percentage between the female weight after and before feeding). (B) Ticks reproductive index (a ratio between the eggs laid weight and the female final weight). (C) Larvae hatching index (a ratio between larvae weight and eggs weight). Statistical analyzes were performed using ANOVA test.



**Figure 2: Effect of avasimibe on tick physiological parameters.** The inhibitor avasimibe (AVS) (15 nmol per female) was added to the blood used to artificially feed *R. microplus* partially engorged females. (A) Ticks weight gain (the difference in percentage between the female weight after and before feeding). (B) Ticks reproductive index (a ratio between the eggs laid weight and the female final weight). (C) Larvae hatching index (a ratio between larvae weight and eggs weight). (D) Eggs laid by the females of each group (Blood, DMSO and AVS). Statistical analyzes were performed using ANOVA test, \* $p=0.01$ , \*\* $p<0.005$ , \*\*\* $p=0.0003$ .

### 3.2. Cholesterol content in midgut, GO and egg wax coat

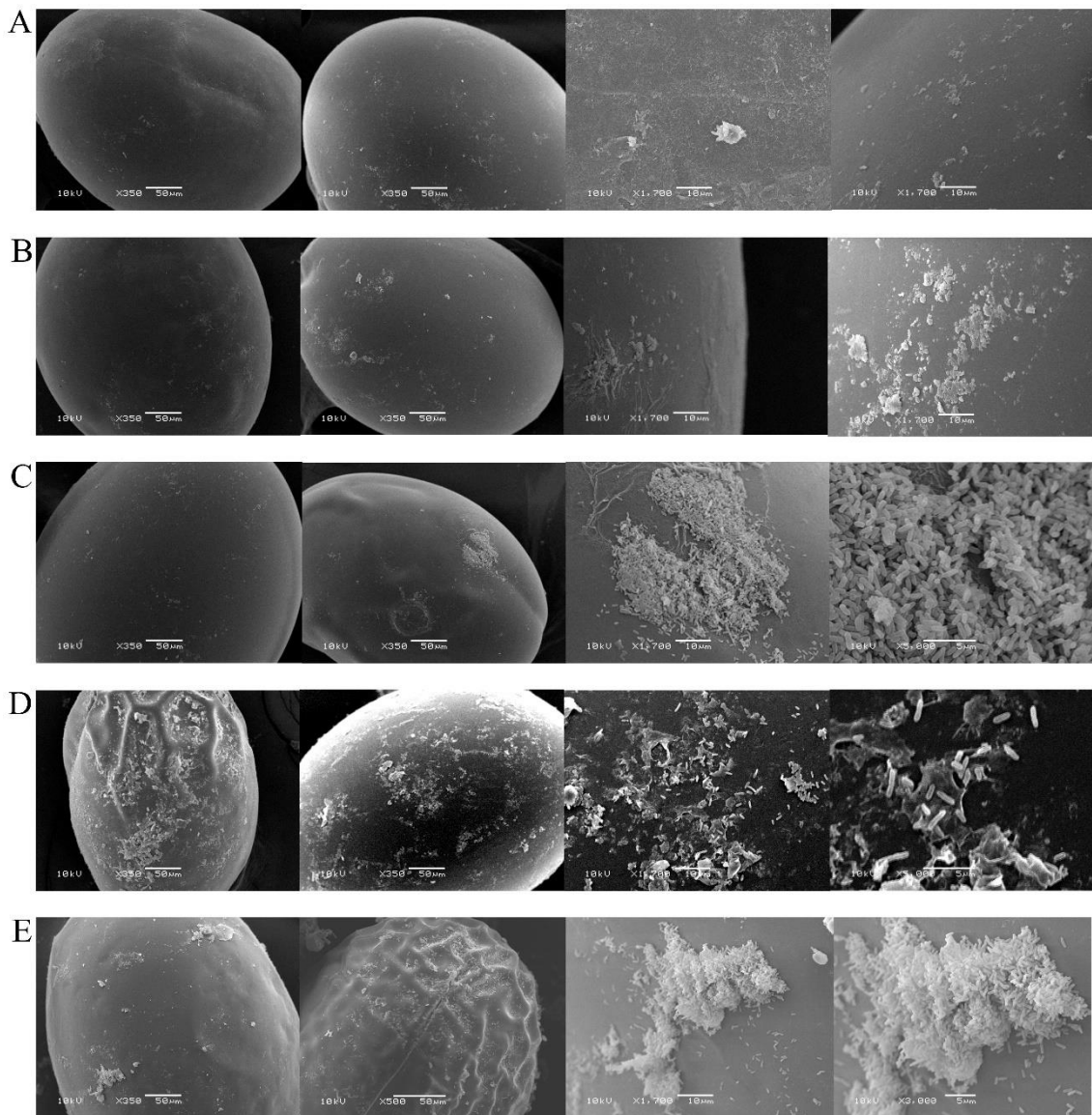
No difference in cholesterol content was observed in midgut (blood group, 14 ng/ $\mu$ L; DMSO group, 12 ng/ $\mu$ L; AVS group, 13 ng/ $\mu$ L) and egg wax (control, 40 ng/ $\mu$ L; AVS, 46 ng/ $\mu$ L) of tick female fed with blood containing avasimibe (15 nmol per tick). On the other hand, the cholesterol amount in GO is lower (4 ng/ $\mu$ L) in ticks from AVS group compared to ticks fed only on blood (16 ng/ $\mu$ L) or on blood containing DMSO (7 ng/ $\mu$ L).



**Figure 3: Cholesterol content in tick tissues.** Lipids were extracted from midgut (MG), Gené's organ (GO) and egg wax coat of tick female fed with blood containing avasimibe (AVS, 15 nmol per female) and the control groups (fed on blood and blood containing DMSO). Statistical analyzes were performed using one-way ANOVA test (multiple comparisons) for MG and GO, or Welch's *t*-test for egg wax coat, in GraphPad Prism v. 7.00. RFU = relative fluorescent units. Treatments with different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ) and, if no letters are shown, no statistically significant differences were detected among treatments.

### 3.3. Biofilm formation on egg surface

Cholesterol metabolism inhibitors led to a decreased antibacterial property of the egg wax coat, since bacterial adherence and biofilm formation is higher in eggs laid by ticks that received EZT and AVS, when compared to the control groups. From the first experiment, it is clear that *P. aeruginosa* adhere to eggs laid by ticks that received AVS, while *P. aeruginosa* forms a biofilm on the surface of eggs laid by ticks that receive EZT (Fig. 4). The second experiment shows *P. aeruginosa* biofilm formation on the egg surface of ticks that received a higher avasimibe concentration.



**Figure 4: Egg susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation.** SEM images of eggs laid by ticks fed on blood with and without DMSO, EZT and AVS. (A) Blood. (B) DMSO (1%). (C) EZT (9.2 nmol per female). (D) AVS (7.5 nmol per female). (E) AVS (15 nmol per female).

#### 4. Discussion

Tick embryo development depends on the wax coat that covers the eggshell, which is secreted by Gené's organ just before the end of oviposition process (Lees and Beament, 1948). Besides the waterproof property, which protects the eggs from the humidity and temperature conditions (Lees and Beament, 1948), this wax also have antimicrobial activity (Arrieta et al., 2006; De Lima-Netto et al., 2012; Esteves et al., 2009; Potterat et al., 1997; Yu et al., 2012; Zimmer et al., 2013b). The mainly known components of egg wax coat are long-chain alkanes, unsaturated fatty acid esters (Booth, 1992), cholesterol esters and free cholesterol (Yu et al., 2012). Despite the fact that ticks do not synthesize cholesterol, Gené's organ presents enzymes related to the modification, degradation and secretion of steroids (Xavier et al., 2019), which are possibly related to the synthesis of wax coat' steroids. Considering that sterols participate in important physiological processes, such as the protection against microorganisms, the addition of cholesterol metabolism inhibitors to the blood meal and use it to artificially feed *R. microplus* females is a suitable way to administrate these drugs.

Analogous to the observed in *T. cruzi* (Pereira et al., 2015), data presented here show that avasimibe inhibition of ACAT esterification activity was dose dependent. Tick females from AVS group (7.5 nmol) had no alterations in the biological parameters. On the other hand, when avasimibe amount was increased to 15 nmol, females from AVS group laid fewer eggs and most larvae did not hatch. Additionally, when tick females fed with blood containing ezetimibe, the inhibition of cholesterol absorption by NPC protein did not affect the evaluated tick biological parameters. Ezetimibe effect above *C. parvum* (Ehrenman et al., 2013) and *L. amazonensis* (Andrade-Neto et al., 2016) development *in vitro* was dose dependent. Unfortunately, it was not possible to analyze the effect of higher ezetimibe concentrations, due to toxicity of DMSO used as diluent.

The only known sterol with antimicrobial activity present in egg wax coat is boophiline. This cholesterol derivative contains a sulfate residue instead of the hydroxyl group (polar side of cholesterol) and a *L*-isoleucine residue next to the cholesterol lateral chain (Potterat et al., 1997; Zimmer et al., 2013a). Boophiline has antifungal activity to *Cladosporium cucumerinum*, and inhibits *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli* growth (Potterat et al., 1997). Also, it is bactericidal to *Staphylococcus epidermidis* and inhibits biofilm formation of *P. aeruginosa* by suppressing the transcription of the genes *cdrA* (codify to an extracellular protein from biofilm matrix) and *fliC* (codify to flagellin, from bacterial flagella) (Zimmer et al., 2013a). In this context, it was accessed whether

inhibiting cholesterol metabolism would make eggs susceptible to bacteria. It was observed that eggs from AVS group (both concentrations) and EZT group were susceptible to *P. aeruginosa* adhesion and biofilm formation. This indicates that components from egg wax coat with a role in protection against microorganisms were modified. However, *P. aeruginosa* does not adhere or forms a biofilm covering the eggshell possibly because not all cholesterol from diet was blocked. Moreover, fatty acids are also related to the egg wax antimicrobial activity (Yu et al., 2012). Possibly other non-lipid molecules may be implicated in this role, like microplusin (Fogaça et al., 2004) and ixodidin (Fogaça et al., 2006), since these peptides were identified in Gené's organ during oviposition (Xavier et al., 2019) and are perhaps secreted along in the wax.

To analyze the cholesterol transport from the midgut to other organs and the egg wax coat, total cholesterol from midgut, Gené's organ and egg wax coat was quantified. Although total cholesterol amount in the midgut of AVS group was not altered, the decrease in total cholesterol of Gené's organ indicates that the absorbed cholesterol distribution among organs was changed. These data suggest that cholesterol abundance in midgut is so high that no difference could be observed between the absorbed and the remaining in lumen. On contrary, the cholesterol that is distributed among the tissues is low and interfere on it disturbs the metabolism and tick reproduction is impaired. The same effect could not be observed in the interference of another missing pathway in ticks, the heme synthesis (Braz et al., 1999; Perner et al., 2016). Even when a minimal amount of heme (0.1%) is present, tick reproduction is not altered (Perner et al., 2016). Surprisingly, no differences could be observed in total cholesterol amount from egg wax coat between control and AVS group. Even though, these eggs are susceptible to bacteria adhesion and biofilm formation. These results raised the hypothesis that the decreased amount of Gené's organ cholesterol led to a decreased synthesis of boophilin but did not alter the cholesterol deposit on wax.

Altogether, data from this work show that cholesterol metabolism is a suitable pathway to be used as target on tick control. Furthermore, as far as we know, this is the first report of the use of cholesterol absorption and esterification inhibitors in non-protozoan parasites.

## 5. References

- Andrade-Neto, V.V., Cunha-Júnior, E.F., Do Canto-Cavalheiro, M.M., Atella, G.C., De Almeida Fernandes, T., Costa, P.R.R., Torres-Santos, E.C., 2016. Antileishmanial activity of ezetimibe: Inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles, and efficacy in experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60, 6844–6852. <https://doi.org/10.1128/AAC.01545-16>
- Arrieta, M.C., Leskiw, B.K., Kaufman, W.R., 2006. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *Exp. Appl. Acarol.* 39, 297–313. <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9014-5>
- Bansal, D., Bhatti, H.S., Sehgal, R., 2005. Role of cholesterol in parasitic infections. *Lipids Health Dis.* 4. <https://doi.org/10.1186/1476-511X-4-10>
- Benito-Vicente, A., Uribe, K.B., Jebari, S., Galicia-Garcia, U., Ostolaza, H., Martin, C., 2018. Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19. <https://doi.org/10.3390/ijms19113426>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911–917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Booth, T.F., 1992. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp. Appl. Acarol.* 14, 137–149. <https://doi.org/10.1007/BF01219106>
- Braz, G.R.C., Coelho, H.S.L., Masuda, H., Oliveira, P.L., 1999. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr. Biol.* 9, 703–706. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(99\)80312-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(99)80312-1)
- Clark, A.J., Block, K., 1959. The absence of sterol synthesis in insects. *J. Biol. Chem.* 234, 2578–2582.
- De Lima-Netto, S., Pinheiro, A., Nakano, E., Zucatelli Mendonça, R.M., Barros-Battesti, D.M., Mendonça, R.Z., 2012. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). *Cytotechnology* 64, 601–606. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9444-3>
- Ehrenman, K., Wanyiri, J.W., Bhat, N., Ward, H.D., Coppens, I., 2013. *Cryptosporidium parvum* scavenges LDL-derived cholesterol and micellar cholesterol internalized into enterocytes. *Cell. Microbiol.* 15, 1182–1197. <https://doi.org/10.1111/cmi.12107>
- Esteves, E., Fogaça, A.C., Maldonado, R., Silva, F.D., Manso, P.P.A., Pelajo-Machado, M., Valle, D., Daffre, S., 2009. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus*



- (*Boophilus microplus*) eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 913–919. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.02.009>
- Fabres, A., De Andrade, C.P., Guizzo, M., Sorgine, M.H.F., De O. Paiva-Silva, G., Masuda, A., Da Silva Vaz, I., Logullo, C., 2010. Effect of GSK-3 activity, enzymatic inhibition and gene silencing by RNAi on tick oviposition and egg hatching. *Parasitology* 137, 1537–1546. <https://doi.org/10.1017/S0031182010000284>
- Fogaça, A.C., Almeida, I.C., Eberlin, M.N., Tanaka, A.S., Bulet, P., Daffre, S., 2006. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. *Peptides* 27, 667–674. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2005.07.013>
- Fogaça, A.C., Lorenzini, D.M., Kaku, L.M., Esteves, E., Bulet, P., Daffre, S., 2004. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: Isolation, structural characterization and tissue expression profile. *Dev. Comp. Immunol.* 28, 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2003.08.001>
- Garcia-Calvo, M., Lisnock, J.M., Bull, H.G., Hawes, B.E., Burnett, D.A., Braun, M.P., Crona, J.H., Davis, H.R., Dean, D.C., Detmers, P.A., Graziano, M.P., Hughes, M., MacIntyre, D.E., Ogawa, A., O’Neil, K.A., Iyer, S.P.N., Shevell, D.E., Smith, M.M., Tang, Y.S., Makarewicz, A.M., Ujjainwalla, F., Altmann, S.W., Chapman, K.T., Thornberry, N.A., 2005. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 8132–8137. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500269102>
- Gonsioroski, A.V., Bezerra, I.A., Utiumi, K.U., Driemeier, D., Farias, S.E., da Silva Vaz, I., Masuda, A., 2012. Anti-tick monoclonal antibody applied by artificial capillary feeding in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* females. *Exp. Parasitol.* 130, 359–363. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.02.006>
- Lees, A.D., Beament, J.W.L., 1948. An egg-waxing organ in ticks. *Q. J. Microsc. Sci.* 89, 291–322.
- Llaverías, G., Laguna, J.C., Alegret, M., 2003. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). *Cardiovasc. Drug Rev.* 21, 33–50.
- Majerowicz, D., Gondim, K.C., 2013. Insect lipid metabolism: Insights into gene expression regulation, in: Mandal, S. (Ed.), *Recent Trends in Gene Expression*. Nova Science Publishers, Inc., pp. 147–189.

- Maroun, N.A., Kamal, K.A., 1976. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Absence of sterol biosynthesis in *Dermacentor andersoni* stiles (Acarina: Ixodidae). J. Med. Entomol. 13, 219–220.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/13.2.219>
- Pereira, M.G., Visbal, G., Salgado, L.T., Vidal, J.C., Godinho, J.L.P., De Cicco, N.N.T., Atella, G.C., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N., 2015. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to manage internal cholesterol levels under nutritional lipid stress conditions. PLoS One 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128949>
- Perner, J., Sobotka, R., Sima, R., Konvickova, J., Sojka, D., de Oliveira, P.L., Hajdusek, O., Kopacek, P., 2016. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. Elife 5, e12318. <https://doi.org/10.7554/eLife.12318>
- Potterat, O., Hostettmann, K., Hölzel, A., Jung, G., Diehl, P.A., Petrini, O., 1997. Boophilin, an Antimicrobial Sterol Amide from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. Helv. Chim. Acta 80, 2066–2072.  
<https://doi.org/10.1002/hlca.19970800707>
- Reck, J., Berger, M., Terra, R.M.S., Marks, F.S., da Silva Vaz, I., Guimarães, J.A., Termignoni, C., 2009. Systemic alterations of bovine hemostasis due to *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation. Res. Vet. Sci. 86, 56–62.  
<https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2008.05.007>
- Renthal, R., Lohmeyer, K., Borges, L.M.F., Pérez de León, A.A., 2019. Surface lipidome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, provides leads on semiochemicals and lipid metabolism. Ticks Tick. Borne. Dis. 10, 138–145.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.09.009>
- Sonenshine, D.E., Homsher, P.J., Beveridge, M., Dees, W.H., 1985. Occurrence of Ecdysteroids in Specific Body Organs of the Camel Tick, *Hyalomma dromedarii*, and the American Dog Tick, *Dermacentor Variabilis* (Acari: Ixodidae), With Notes on their Synthesis from Cholesterol. J. Med. Entomol. 22, 303–311.  
<https://doi.org/10.1093/jmedent/22.3.303>
- Trentin, D.D.S., Giordani, R.B., Zimmer, K.R., Da Silva, A.G., Da Silva, M.V., Correia, M.T.D.S., Baumvol, I.J.R., MacEdo, A.J., 2011. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. J. Ethnopharmacol. 137, 327–335.  
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>
- Turunen, S., Crailsheim, K., 1996. Lipid and sugar absorption, in: Lehane, M.,

- Billingsley, P. (Eds.), *Biology of the Insect Midgut*. Chapman & Hall, London, pp. 293–320.
- Xavier, M.A., Tirloni, L., Pinto, A.F.M., Diedrich, J.K., Yates, J.R., Gonzales, S., Farber, M., da Silva Vaz, I., Termignoni, C., 2019. Tick Gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 10, 787–797.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.03.013>
- Yu, Z., Thomson, E.L.S., Liu, J., Dennis, J.J., Jacobs, R.L., Kaufman, W.R., 2012. Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. *Exp. Appl. Acarol.* 58, 453–470. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9586-1>
- Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Giordani, R.B., Conceição, J.M., Nicastro, G.G., Boechat, A.L., Baldini, R.L., Abraham, W.R., Termignoni, C., 2013a. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. *Environ. Microbiol.* 15, 2008–2018.  
<https://doi.org/10.1111/1462-2920.12082>
- Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Nicastro, G.G., Baldini, R.L., Termignoni, C., 2013b. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. *Ticks Tick. Borne. Dis.* 4, 366–376.  
<https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.01.005>

#### 4. Discussão

A ausência de determinadas vias metabólicas é uma das características que distingue os carrapatos de outros organismos. Diferentemente de vários animais, inclusive outros hematófagos, como *R. prolixus*, os carrapatos não sintetizam heme (BRAZ et al., 1999), devido à ausência de genes que codificam para algumas das enzimas das vias de síntese de heme e também de sua degradação (PERNER et al., 2016). Contudo, o heme é fundamental para o desenvolvimento e viabilidade dos ovos, embora não seja essencial para a nutrição da fêmea e postura de ovos (PERNER et al., 2016). Outra via metabólica ausente em carrapatos, assim como em insetos (CLARK; BLOCK, 1959), parasitos intestinais e protozoários (BANSAL; BHATTI; SEHGAL, 2005; BARRETT; CAIN; FAIRBAIRN, 1970), é a via de síntese de COL. Foi demonstrado que precursores esteroides não são incorporados em esteroides livres e ésteres de esteroides (MAROUN; KAMAL, 1976). Efetivamente, genes que codificam para enzimas da via de síntese de COL não foram identificados em transcriptoma de singânglio (ZHU et al., 2016) e no transcriptoma e proteoma do GO (XAVIER et al., 2019). No entanto, o COL é essencial na fisiologia de carrapatos, tanto por ser componente de membranas, quanto por ser precursor de moléculas como o hormônio 20-hidroxicdisona (ROE et al., 2013) e o antimicrobiano boophilina (POTTERAT et al., 1997; ZIMMER et al., 2013a), que está presente na cera dos ovos. Apesar da relevância de moléculas lipídicas para o desenvolvimento e reprodução de carrapatos, poucos estudos tratam sobre metabolismo de lipídeos nestes organismos, e por isso o conhecimento é extrapolado do que é conhecido em insetos e insetos hematófagos. Dessa forma, o objetivo desta tese foi explorar a participação de lipídeos e o papel do GO na reprodução de carrapatos e examinar a possibilidade que o metabolismo de colesterol possa ser um alvo para intervir na reprodução e na viabilidade dos ovos.

Os dados apresentados no primeiro capítulo reforçam o conhecimento do papel do GO em ser indispensável para a reprodução dos carrapatos, pois além de secretar a cera, é um órgão de síntese de lipídeos. O enriquecimento de retículo endoplasmático e complexo de Golgi nas células de GO (BOOTH, 1989; DOS SANTOS et al., 2018; KAKUDA; MORI; SHIRAIISHI, 1995) e a incorporação de acetato radioativo nas glândulas de GO e na cera secretada (BOOTH, 1992) indicam que este é um sítio de síntese de moléculas. No entanto, a presença de microvilosidades nas células tubulares levou alguns autores a sugerirem que os componentes da cera seriam absorvidos da hemolinfa e então secretados na superfície dos ovos (DOS SANTOS et al., 2018; KAKUDA; MORI; SHIRAIISHI, 1995). Em contra ponto,

os dados de transcriptoma e proteoma de GO apresentados no primeiro capítulo revelam que o GO tem capacidade de sintetizar, alongar, modificar, oxidar e secretar AG, além de modificar, degradar e secretar esteroides.

Em confluência com o desenvolvimento das células tubulares e da estrutura do GO durante a hematofagia observados por KAKUDA; MORI; SHIRAIISHI (1995a) e SCHÖL et al. (2001), os dados de transcriptoma e proteoma mostram que GO prepara-se para desenvolver seu papel durante o período de postura. Antes do início da postura, destaca-se a presença de proteínas envolvidas na divisão celular, transcrição e síntese de proteínas, incluindo aquelas que participam da composição do citoesqueleto. Por outro lado, durante a postura de ovos, ocorre a secreção, transporte e metabolismo de componentes da cera, embora a síntese de proteínas também se mantenha presente.

Os dados ômicos identificaram que o GO, antes e durante a postura de ovos, possui uma maquinaria completa de metabolismo de AG. KLUCK et al. (2018) observaram que após a injeção de AG na hemolinfa das fêmeas, os AG incorporados no GO mantêm-se majoritariamente na forma de AG livre. Em proporções menores, há incorporação em FL, MAG, DAG e TAG, e não há incorporação em COL-E. Contudo, há transporte de COL para o GO pela hemolinfa, através da proteína carreadora RmLCP, embora em menores proporções do que para outros órgãos (ovário, intestino e corpo gorduroso) (KLUCK et al., 2018). A presença de RmLCP no GO não pôde ser confirmada pelas análises transcriptômica e proteômica, uma vez que sua sequência completa de aminoácidos não é conhecida. No entanto, as vitelogeninas 2 e 5, que são as proteínas com o maior grau de identidade com a RmLCP (KLUCK et al., 2018), estão presentes no GO antes e durante a postura de ovos. Outra proteína carreadora, HeLp (MAYA-MONTEIRO et al., 2000), está presente no GO. Possivelmente, ambas carreadoras atuam em conjunto no tráfego de moléculas para o GO.

Outras proteínas envolvidas na absorção, modificação, processamento, conversão e secreção de esteroides estão presentes e demonstram que o GO participa ativamente da síntese de componentes da cera protetora que recobre os ovos. Este dado levanta a hipótese de que o antibacteriano boophilina (ZIMMER et al., 2013a) é processado pelo GO para então ser secretado na cera. Por outro lado, a análise do proteoma mostrou que os peptídeos antimicrobianos microplusina (FOGAÇA et al., 2004) e ixodidina (FOGAÇA et al., 2006) estão presentes no GO. Não é conhecido se esses peptídeos são secretados para a cera, de modo que não se sabe se participam na proteção dos ovos contra a ação de micro-organismos. Além disso, a atividade antimicrobiana pode estar associada com a proteção do órgão durante

os movimentos de eversão durante a postura dos ovos, pois assim o GO fica exposto ao ambiente e, conseqüentemente, mais propenso a colonização por micro-organismos.

Baseado no conhecimento de que os carrapatos não sintetizam COL, a propõe-se a hipótese é de que essa via é um alvo potencial para o controle do parasito, já que é uma via essencial e sem redundância. Assim, o segundo capítulo desta tese utiliza inibidores do metabolismo de COL para alimentar artificialmente fêmeas de *R. microplus* e analisa os parâmetros reprodutivos da fêmea e de desenvolvimento dos ovos. Como o processo de absorção de COL obtido da dieta ainda não é conhecido em carrapatos, o conhecimento deste mecanismo em insetos foi extrapolado para carrapatos.

Os resultados mostram que a inibição da absorção do COL pela proteína transmembrana NPC usando o inibidor ezetimibe (9,2 nmol por fêmea), e da esterificação do COL pela ACAT por meio do inibidor avasimibe (7,5 nmol por fêmea), não altera os parâmetros reprodutivos de *R. microplus*. Apesar disso, os ovos provenientes de fêmeas alimentadas com os inibidores são suscetíveis à adesão e formação de biofilme de *P. aeruginosa*. Por outro lado, quando a dose de avasimibe é dobrada (15 nmol por fêmea), além da suscetibilidade dos ovos a adesão e formação de biofilme bacteriano, há diminuição da postura de ovos e eclosão de larvas. A inibição de absorção de COL por ezetimibe foi estudada em outros parasitos, *L. amazonensis* (ANDRADE-NETO et al., 2016) e *C. parvum* (EHRENMAN et al., 2013), e por avasimibe em *T. cruzi* (PEREIRA et al., 2015). Assim como em *R. microplus*, o efeito de inibição do crescimento destes protozoários é dose-dependente. Além disso, ezetimibe diminui a carga parasitária *in vivo* de *L. amazonensis*.

A suscetibilidade dos ovos à adesão bacteriana e/ou formação de biofilme bacteriano após a ingestão dos inibidores do metabolismo de COL indica que componentes da proteção antimicrobiana da cera são alterados pela administração dos inibidores. Apesar de boophilina (POTTERAT et al., 1997; ZIMMER et al., 2013a) ser o único componente esteroide conhecido que possui atividade antimicrobiana na cera, é possível que outros esteroides ou derivados de esteroides também exerçam tal atividade. No entanto, não foi observada adesão e/ou formação de biofilme por toda a superfície dos ovos provenientes de fêmeas alimentadas com os inibidores. Possivelmente, isto se deve ao fato de que não houve um bloqueio total de absorção do COL. Além disso, AG também estão associados a inibição de crescimento bacteriano (YU et al., 2012) e é possível que peptídeos antimicrobianos, como microplusina (FOGAÇA et al., 2004) e ixodidina (FOGAÇA et al., 2006), também sejam secretados na cera.

A quantidade de COL total presente nos tecidos de fêmeas alimentadas com avasimibe (15 nmol por fêmea) é condizente com os efeitos biológicos observados na reprodução de *R. microplus*. Apesar de não haver alteração na quantidade de COL total no intestino entre os grupos controle e inibidor, a diminuição na quantidade de COL total no GO indica que a distribuição por entre os tecidos do COL absorvido no intestino foi alterada. Estes dados sugerem que a abundância de COL no intestino é alta o bastante para que não seja observada diferença entre o que é absorvido e o que é mantido no lúmen. Ao contrário, a quantidade de COL que é distribuído por entre os tecidos é baixa, e a interferência nesta perturba o metabolismo em um grau que acarreta efeitos biológicos na reprodução dos carrapatos. O mesmo efeito não foi observado quando se interfere na via de transporte de heme, pois PERNER et al. (2016) mostraram que, mesmo uma pequena quantidade de heme (1%) residual é suficiente para que a reprodução não seja inviabilizada.

Segundo BOOTH, (1992), os componentes lipídicos presentes no GO e na cera dos ovos de *R. microplus* são os mesmos, porém diferem nas quantidades. Embora no estudo de BOOTH (1992) a presença de esteroides (COL e COL-E) não foi observada na cera dos ovos de *R. microplus*, o contrário ocorre em *A. hebraeum* (YU et al. 2012). Além disso, o antimicrobiano derivado de colesterol boophilina (POTTERAT et al., 1997; ZIMMER et al., 2013a) está presente na cera de ovos de *R. microplus*. Curiosamente, os resultados apresentados no Capítulo 2 mostram que não há alterações na abundância de COL total na cera dos ovos provenientes de fêmeas que receberam avasimibe misturado ao sangue, embora estes ovos sejam suscetíveis à adesão de bactérias e formação de biofilme bacteriano. Estes dados sugerem que a diminuição de COL no GO leva a diminuição na síntese de boophilina, mas não altera a deposição de COL na cera.

## **5. Conclusão**

Os dados gerados nesta tese demonstram que o metabolismo de COL é uma via com potencial de ser usada como alvo de novos métodos de controle, para reduzir infestações por carrapatos. Os resultados também mostram que o GO, que tem papel crucial por sintetizar e secretar a cera protetora que recobre os ovos, a qual é indispensável para viabilidade dos ovos, merece estudos mais detalhados. A inibição das proteínas NPC e ACAT, relacionadas com o metabolismo do COL proveniente da dieta, diminui capacidade reprodutiva das fêmeas e inviabiliza o desenvolvimento embrionário. Além disso, os ovos tornam-se suscetíveis à colonização por bactérias.



## Referências

- AHMED, Rehab; FADLELMOLA, Faisal M. Ezetimibe Repurposing: an In-Silico Testing of its Potential Anti-Giardia Activity. **UK Journal of Pharmaceutical Biosciences**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 63–70, 2016.
- ALABASTER, Amy et al. Deficiencies in acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase 1 differentially affect eggshell formation and blood meal digestion in *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 41, n. 12, p. 946–955, 2011.
- ALI, Abid et al. A revision of two distinct species of *Rhipicephalus*: *R. microplus* and *R. australis*. **Ciencia Rural**, [s. l.], v. 46, n. 7, p. 1240–1248, 2016.
- ALMAZAN, Consuelo et al. Immunological control of ticks and tick-borne diseases that impact cattle health and production. **Frontiers in bioscience (Landmark edition)**, [s. l.], v. 23, p. 1535–1551, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29293449>>
- ANDRADE-NETO, Valter Viana et al. Antileishmanial activity of ezetimibe: Inhibition of sterol biosynthesis, in vitro synergy with azoles, and efficacy in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 60, n. 11, p. 6844–6852, 2016.
- ARRIETA, M. Claire; LESKIW, Brenda K.; KAUFMAN, W. Reuben. Antimicrobial activity in the egg wax of the African cattle tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 39, n. 3–4, p. 297–313, 2006.
- AW, Kimberly Moon San; HUE, Seow Mun. Mode of Infection of *Metarhizium* spp. Fungus and Their Potential as Biological Control Agents. **Journal of Fungi**, [s. l.], v. 3, n. 4, p. 30, 2017.
- BALASHOV, YU S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) — vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, [s. l.], v. 8, n. 5, p. 160–376, 1972.
- BANSAL, Devendra; BHATTI, Harinderpal Singh; SEHGAL, Rakesh. Role of cholesterol in parasitic infections. **Lipids in Health and Disease**, [s. l.], v. 4, n. 10, 2005.
- BANUMATHI, Balan et al. Exploitation of chemical, herbal and nanoformulated acaricides to control the cattle tick, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* – A review. **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 244, p. 102–110, 2017.
- BARRETT, John; CAIN, George D.; FAIRBAIRN, Donald. Sterols in *Ascaris lumbricoides* (Nematoda), *Macracanthorhynchus hirudinaceus* and *Moniliformis dubius* (Acanthocephala), and *Echinostoma revolutum* (Trematoda). **The Journal of Parasitology**, [s. l.], v. 56, n. 5, p. 1004, 1970.
- BENITO-VICENTE, Asier et al. Familial hypercholesterolemia: The most frequent cholesterol metabolism disorder caused disease. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 11, 2018.
- BOCK, R. et al. Babesiosis of cattle. In: **Parasitology**., 2004.
- BOOTH, T. F. Wax lipid secretion and ultrastructural development in the egg-waxing (Gené's) organ in ixodid ticks. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 113–122, 1989.
- BOOTH, T. F. Observation on the composition and biosynthesis of egg wax lipids in the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Experimental & Applied Acarology**, [s. l.], v. 14, n. 2, p. 137–149, 1992.

- BOOTH, Timothy F.; BEADLE, David J.; HART, Richard J. Ultrastructure of the accessory glands of Gené's organ in the cattle tick, *Boophilus*. **Tissue and Cell**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 589–599, 1984.
- BRAZ, Glória R. C. et al. A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. **Current Biology**, [s. l.], v. 9, n. 13, p. 703–706, 1999.
- BULLARD, Rebekah et al. Structural characterization of tick cement cones collected from in vivo and artificial membrane blood-fed Lone Star ticks (*Amblyomma americanum*). **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 880–892, 2016.
- CANAVOSO, Lilián E. et al. Fat metabolism in insects. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 23–46, 2001.
- CANAVOSO, Lilián E.; FREDE, Silvia; RUBIOLO, Edilberto R. Metabolic pathways for dietary lipids in the midgut of hematophagous *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 34, n. 8, p. 845–854, 2004.
- CHANG, Ta Yuan et al. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferases. **American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism**, [s. l.], v. 297, n. 1, p. E1–E9, 2009.
- CHINO, H. et al. Lipophorins, a major class of lipoproteins of insect haemolymph. **Insect Biochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 4, p. 491, 1981.
- CLARK, A. J.; BLOCK, K. The absence of sterol synthesis in insects. **The Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 234, p. 2578–2582, 1959.
- COELHO, Heloisa S. L. et al. Lipophorin density variation during oogenesis in *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 301–313, 1997.
- DANTAS-TORRES, Filipe; CHOMEL, Bruno B.; OTRANTO, Domenico. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 28, n. 10, p. 437–446, 2012.
- DE LIMA-NETTO, Solange et al. Antiviral effect of the egg wax of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Cytotechnology**, [s. l.], v. 64, n. 5, p. 601–606, 2012.
- DIEHL, P. A.; AESCHLIMANN, A.; OBENCHAIN, F. D. Tick reproduction: oogenesis and oviposition. In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. (Eds.). **Physiology of Ticks**. [s.l.] : Oxford, UK: Pergamon Press, 1982. p. 277–350.
- DOS SANTOS, Marcelo Francisco et al. Morphodifferentiation of Gené's organ in engorged *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888 female ticks (Acari: Ixodidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 519–525, 2018.
- EDELMANN, B.; GOTHE, R. The mechanism of oviposition in *Argas (Persicargas) walkerae* (Acari: Argasidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 927–940, 2001.
- EHRENMAN, Karen et al. *Cryptosporidium parvum* scavenges LDL-derived cholesterol and micellar cholesterol internalized into enterocytes. **Cellular Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 1182–1197, 2013.
- EL SHOURA, Samir M. Fine structure of the gene's organ in the camel tick *Hyalomma (Hyalomma) dromedarii* (Ixodoidea: Ixodidae). **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 193, n. 1, p. 91–98, 1987.

- EL SHOURA, Samir M. Fine structure of the vagina, accessory glands, uterus, oviducts and Gene's organ in the unfed tick, *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Ixodoidea: Argasidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 4, n. 2, p. 95–108, 1988.
- ESTEVEZ, E. et al. Antimicrobial activity in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* eggs: Cellular localization and temporal expression of microplusin during oogenesis and embryogenesis. **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 33, n. 8, p. 913–919, 2009.
- ESTRELA, Andréia B. et al. Vitellin- and hemoglobin-digesting enzymes in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae and females. **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 157, n. 4, p. 326–335, 2010.
- FELDMAN-MUHSAM, B.; HAVIVI, Y. Accessory glands of gene's organ in ticks. **Nature**, [s. l.], v. 187, n. 4741, p. 964, 1960.
- FIELDING, C. J.; FIELDING, P. E. Molecular physiology of reverse cholesterol transport. **Journal of Lipid Research**, [s. l.], v. 36, n. 2, p. 211–228, 1995.
- FOGAÇA, Andréa C. et al. Cysteine-rich antimicrobial peptides of the cattle tick *Boophilus microplus*: Isolation, structural characterization and tissue expression profile. **Developmental and Comparative Immunology**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 191–200, 2004.
- FOGAÇA, Andréa C. et al. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 667–674, 2006.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. The role of saliva in tick feeding. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. Volume, n. 14, p. 2051, 2009. Disponível em: <<http://www.bioscience.org/2009/v14/af/3363/list.htm>>
- GAGNÉ, Claude et al. Efficacy and safety of ezetimibe added to ongoing statin therapy for treatment of patients with primary hypercholesterolemia. **American Journal of Cardiology**, [s. l.], v. 90, n. 10, p. 1084–1091, 2002.
- GARCIA-CALVO, Margarita et al. The target of ezetimibe is Niemann-Pick C1-Like 1 (NPC1L1). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 102, n. 23, p. 8132–8137, 2005.
- GARCÍA-GARCÍA, José C. et al. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 23, n. 11, p. 883–895, 1999.
- GONDIM, Katia C. et al. Lipid metabolism in insect disease vectors. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 101, p. 108–123, 2018.
- GOTHE, Rainer; GÖBEL, Edward; NEITZ, Albert W. H. Histology and ultrastructure of the glands associated with the porose areas on the gnathosoma of *Rhipicephalus evertsi evertsi* before and during oviposition. **Experimental & Applied Acarology**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 255–265, 1987.
- GRILLO, Luciano A. M.; MAJEROWICZ, David; GONDIM, Katia C. Lipid metabolism in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera: Reduviidae): Role of a midgut triacylglycerol-lipase. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 37, n. 6, p. 579–588, 2007.
- GRISI, Laerte et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 23, n. 2, p. 150–6, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25054492>>

GRUNDY, S. M. Absorption and Metabolism of Dietary Cholesterol. **Annual Review of Nutrition**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 71–96, 1983.

GUDDERRA, Nanda P. et al. Developmental profile, isolation, and biochemical characterization of a novel lipoglycochome-carrier protein from the american dog tick, *dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and observations on a similar protein in the soft tick, *ornithodoros parkeri* (. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v. 31, n. 4–5, p. 299–311, 2001.

HOLLMANN, Taylor et al. Identification and characterization of proteins in the *Amblyomma americanum* tick cement cone. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 48, n. 3–4, p. 211–224, 2018.

HU, Longbo et al. Avasimibe: A novel hepatitis C virus inhibitor that targets the assembly of infectious viral particles. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 148, p. 5–14, 2017.

HURTADO, Oscar Jaime Betancur; GIRALDO-RÍOS, Cristian. Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals. In: ABUBAKAR, Muhammad; PERERA, Piyumali Kanchana (Eds.). **Ticks and Tick-borne Diseases**. [s.l: s.n.]. v. Ip. 13.

HUTTER-PAIER, Birgit et al. The ACAT inhibitor CP-113,818 markedly reduces amyloid pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. **Neuron**, [s. l.], v. 44, n. 2, p. 227–238, 2004.

IKONEN, Elina. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [s. l.], v. 9, n. 2, p. 125–138, 2008.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, [s. l.], v. 129, p. S3–S14, 2004.

KAKUDA, H.; MŌRI, T.; SHIRAIISHI, S. Functional morphology of Gené's organ in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Experimental & Applied Acarology**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 263–275, 1992.

KAKUDA, Hiroyuki et al. Ultrastructure of the tubular accessory gland in *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 221, n. 1, p. 65–74, 1994.

KAKUDA, Hiroyuki et al. Ultrastructure of the Lobular Accessory Glands in *Haemaphysalis longicornis*(Acari: Ixodidae). **Journal of the Acarological Society of Japan**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 17–24, 1997.

KAKUDA, Hiroyuki; MORI, Takayuki; SHIRAIISHI, Satoshi. Effects of feeding and copulation on ultrastructural changes of the tubular glands of Gene's organ in female *Haemaphysalis longicornis* (Acari: Ixodidae). **Journal of the Acarological Society of Japan**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 1–13, 1995.

KLOWDEN, Marc J. Metabolic Systems. In: **Physiological Systems in Insects**. 3rd. ed. San Diego, USA: Elsevier, 2013. p. 305–364.

KLUCK, George E. G. et al. A new lipid carrier protein in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 850–859, 2018.

KNÖPFEL, Martin et al. Multiple plasma membrane receptors but not NPC1L1 mediate high-affinity, ezetimibe-sensitive cholesterol uptake into the intestinal brush border membrane. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1771, n. 9, p. 1140–1147, 2007.

LABRUNA, Marcelo B. et al. Allopatric speciation in ticks: Genetic and reproductive

divergence between geographic strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Evolutionary Biology**, [s. l.], v. 9, n. 46, 2009.

LEE, Stephen D. et al. Inhibition of cholesterol absorption: Targeting the intestine. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 29, n. 12, p. 3235–3250, 2012.

LEE, Steve Seung Young et al. Avasimibe encapsulated in human serum albumin blocks cholesterol esterification for selective cancer treatment. **ACS Nano**, [s. l.], v. 9, n. 3, p. 2420–2432, 2015.

LEEMON, D. M.; TURNER, L. B.; JONSSON, N. N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). **Veterinary Parasitology**, [s. l.], v. 156, n. 3–4, p. 248–260, 2008.

LEES, A. D.; BEAMENT, J. W. L. An egg-waxing organ in ticks. **The Quarterly Journal of Microscopical Science**, [s. l.], v. 89, n. Pt 3, p. 291–322, 1948. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18888183>>

LEHANE, M. J. Managing the blood meal. In: **The Biology of Blood-Sucking in Insects**. 2nd. ed. New York, USA: Cambridge University Press, 2005. p. 84–115.

LLAVERÍAS, Gemma; LAGUNA, Juan C.; ALEGRET, Marta. Pharmacology of the ACAT inhibitor avasimibe (CI-1011). **Cardiovascular Drug Reviews**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 33–50, 2003.

MAJEROWICZ, David; GONDIM, Katia C. Insect lipid metabolism: Insights into gene expression regulation. In: MANDAL, SS (Ed.). **Recent Trends in Gene Expression**. [s.l.] : Nova Science Publishers, Inc., 2013. p. 147–189.

MAROUN, N. A.; KAMAL, K. A. Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Absence of sterol biosynthesis in *Dermacentor andersoni* stiles (Acarina: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, [s. l.], v. 13, n. 2, p. 219–220, 1976.

MAYA-MONTEIRO, Clarissa M. et al. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 275, n. 47, p. 36584–36589, 2000.

MCCOY, Karen D.; LÉGER, Elsa; DIETRICH, Muriel. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [s. l.], v. 3, p. 1–12, 2013.

MIYAZAKI, Akira; KANOME, Tomoko; WATANABE, Takuya. Inhibitors of acyl-coenzyme A: Cholesterol acyltransferase. **Current Drug Targets - Cardiovascular and Haematological Disorders**, [s. l.], v. 5, n. 6, p. 463–469, 2005.

NARDONI, Simona et al. Sensitivity of entomopathogenic fungi and bacteria to plants secondary metabolites, for an alternative control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in cattle. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 9, n. AUG, 2018.

NGHIEM-RAO, T. H.; MAVIS, A.; PATEL, S. B. Cholesterol and Lipoproteins. In: **Reference Module in Biomedical Sciences**. 3rd editio ed. [s.l.] : Elsevier, 2014.

PARIZI, Luís F. et al. The quest for a universal vaccine against ticks: Cross-immunity insights. **Veterinary Journal**, [s. l.], v. 194, n. 2, p. 158–165, 2012.

PATARROYO, J. H. et al. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, [s. l.], v. 88, n. 3–4, p. 163–172, 2002.

- PAVELA, Roman et al. Application of ethnobotanical repellents and acaricides in prevention, control and management of livestock ticks: A review. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 109, p. 1–9, 2016.
- PEREIRA, Cícero Donizete; SOUZA, Guilherme Rocha Lino; BAFFI, Milla Alves. Carrapato dos Bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas. In: **Embrapa Cerrados**. Planaltina, DF. p. 28.
- PEREIRA, Miria Gomes et al. Trypanosoma cruzi epimastigotes are able to manage internal cholesterol levels under nutritional lipid stress conditions. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2015.
- PERNER, Jan et al. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. **eLife**, [s. l.], v. 5, n. MARCH2016, p. e12318, 2016.
- PERNER, Jan et al. Haem Biology in Metazoan Parasites – ‘The Bright Side of Haem’. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 213–225, 2019.
- POLAR, Perry et al. Assessment of Fungal Isolates for Development of a Myco-Acaricide for Cattle Tick Control. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 276–284, 2005.
- POTTERAT, Olivier et al. Boophiline, an Antimicrobial Sterol Amide from the Cattle Tick *Boophilus microplus*. **Helvetica Chimica Acta**, [s. l.], v. 80, n. 7, p. 2066–2072, 1997.
- RENTHAL, Robert et al. Surface lipidome of the lone star tick, *Amblyomma americanum*, provides leads on semiochemicals and lipid metabolism. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 138–145, 2019.
- RIBEIRO, José M. C.; FRANCISCHETTI, Ivo M. B. Role of arthropod saliva in blood feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 48, n. 1, p. 73–88, 2003.
- ROCHA, Christiane M. B. M. Da. Aspectos Relevantes da Biologia de *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887). In: **Boletim técnico: série Extensão da Universidade Federal de Lavras**. [s.l: s.n.]. v. ano VIIp. 1–24.
- RODRIGUEZ-VIVAS, Roger I.; JONSSON, Nicholas N.; BHUSHAN, Chandra. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. **Parasitology Research**, [s. l.], v. 117, n. 1, p. 3–29, 2018.
- RODRÍGUEZ, Manuel et al. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, [s. l.], v. 33, n. 2, p. 135–146, 1994.
- RODRÍGUEZ, Manuel et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, [s. l.], v. 13, n. 18, p. 1804–1808, 1995.
- ROE, R. Michael et al. Hormonal regulation of metamorphosis and reproduction in ticks. In: SONENSHINE, Daniel E.; ROE, R. Michael (Eds.). **Biology of ticks**. Second edi ed. New York, USA: Oxford University Press, 2013. p. 416–448.
- RYAN, Robert O.; VAN DER HORST, Dick J. Lipid Transport Biochemistry and Its Role in Energy Production. **Annual Review of Entomology**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 233–260, 2000.
- SANDERS, Heather R. et al. Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, [s. l.], v.

33, n. 11, p. 1105–1122, 2003.

SANTI, Lucélia et al. *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. **Fungal Biology**, [s. l.], v. 114, n. 4, p. 312–319, 2010.

SANTOS, Rachel et al. Lipid accumulation and utilization by oocytes and eggs of *Rhodnius prolixus*. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 1–16, 2011.

SCHMITT, Sebastian; CANTUTI CASTELVETRI, Ludovici; SIMONS, Mikael. Metabolism and functions of lipids in myelin. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1851, n. 8, p. 999–1005, 2015.

SCHÖL, H. et al. Morphology and structural organization of Gené's organ in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 327–352, 2001.

SEMENKOVICH, Clay F.; GOLDBERG, Anne C.; GOLDBERG, Ira J. Disorders of Lipid Metabolism. In: **Williams Textbook of Endocrinology**. 13th. ed. [s.l.] : Content Repository Only!, 2016. p. 1660–1700.

SIEBERZ, J.; GOTHE, R. Modus operandi of oviposition in *Dermacentor reticulatus* (Acari: Ixodidae). **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 63–76, 2000.

SILVA AFONSO, Milessa et al. Molecular pathways underlying cholesterol homeostasis. **Nutrients**, [s. l.], v. 10, n. 6, 2018.

SONENSHINE, Daniel E.; ROE, R. Michael. **Biology of ticks, volume 1**. Second Edi ed. [s.l.] : Oxford University Press, 2013.

SPATES, George E.; BULL, Don L.; CHEN, Andrew C. Hydrolysis of sphingomyelin and phosphatidylcholine by midgut homogenates of the stable fly. **Archives of Insect Biochemistry and Physiology**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 1–12, 1990.

TURUNEN, S.; CRAILSHEIM, K. Lipid and sugar absorption. In: LEHANE, MJ; BILLINGSLEY, PF (Eds.). **Biology of the Insect Midgut**. London: Chapman & Hall, 1996. p. 293–320.

VALLE, Manuel Rodriguez; GUERRERO, Felix D. Anti-tick vaccines in the omics era. **Frontiers in Bioscience**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 122–136, 2018.

VAN DER HORST, D. J. et al. Interconversions of diacylglycerol-transporting lipoproteins in the haemolymph of *Locusta migratoria*. **Insect Biochemistry**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 717–723, 1981.

VAN HEEK, Margaret et al. In vivo metabolism-based discovery of a potent cholesterol absorption inhibitor, SCH58235, in the rat and rhesus monkey through the identification of the active metabolites of SCH48461. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 283, n. 1, p. 157–163, 1997.

VELDHUIZEN, Ruud et al. The role of lipids in pulmonary surfactant. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease**, [s. l.], v. 1408, n. 2–3, p. 90–108, 1998.

VERMEULEN, N. M. et al. Investigations into the function and chemical compositions of the porose areas secretion of *Rhipicephalus evertsi evertsi* during oviposition. **The Onderstepoort Journal of Veterinary Research**, [s. l.], v. 53, n. 3, p. 147–152, 1986.

VOGHT, Stephen P. et al. *Drosophila* NPC1b Promotes an Early Step in Sterol Absorption from the Midgut Epithelium. **Cell Metabolism**, [s. l.], v. 5, n. 3, p. 195–205, 2007.

WANG, Helen H. et al. Cholesterol and lipoprotein metabolism and atherosclerosis: Recent advances in reverse cholesterol transport. **Annals of Hepatology**, [s. l.], v. 16, p. s27–s42, 2017.

WANG, Li Juan; SONG, Bao Liang. Niemann-Pick C1-Like 1 and cholesterol uptake. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, [s. l.], v. 1821, n. 7, p. 964–972, 2012.

WEINGLASS, Adam B. et al. Extracellular loop C of NPC1L1 is important for binding to ezetimibe. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 105, n. 32, p. 11140–11145, 2008.

WELLS, M. A. et al. The role of apolipoprotein III in in vivo lipoprotein interconversions in adult *Manduca sexta*. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 262, n. 9, p. 4172–4176, 1987.

WILLADSEN, P. et al. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, [s. l.], v. 143, n. 4, p. 1346–51, 1989. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2745982>>

WILLADSEN, P. et al. Commercialisation of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. **Parasitology**, [s. l.], v. 110, n. S1, p. S43–S50, 1995.

XAVIER, Marina Amaral et al. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 4698, 2018.

XAVIER, Marina Amaral et al. Tick Gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 787–797, 2019.

YOON, Bo Kyeong et al. Antibacterial free fatty acids and monoglycerides: Biological activities, experimental testing, and therapeutic applications. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 19, n. 4, 2018.

YU, Zhijun et al. Antimicrobial activity in the egg wax of the tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) is associated with free fatty acids C16:1 and C18:2. **Experimental and Applied Acarology**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 453–470, 2012.

ZHU, Jiwei et al. Mevalonate-farnesal biosynthesis in ticks: Comparative synganglion transcriptomics and a new perspective. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. e0141084, 2016.

ZIMMER, Karine R. et al. A steroidal molecule present in the egg wax of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits bacterial biofilms. **Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. 2008–2018, 2013. a.

ZIMMER, Karine R. et al. Egg wax from the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* inhibits *Pseudomonas aeruginosa* biofilm. **Ticks and Tick-borne Diseases**, [s. l.], v. 4, n. 5, p. 366–376, 2013. b.



## Anexo A

### Curriculum Vitae

XAVIER, M.A.

#### 1. Dados Pessoais

Nome: Marina Amaral Xavier

Local de nascimento: Pelotas/RS – Brasil

Data de nascimento: 28/08/1991

Endereço eletrônico: xaviermarinaa@gmail.com

#### 2. Formação Acadêmica

- 2009**                    Graduação em Nutrição.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil  
Ano de interrupção: 2009
- 2010 - 2013**        Graduação em Biotecnologia.  
Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas, Brasil  
Título: Inibidores de trombina presentes na saliva do carrapato  
*Rhipicephalus microplus*  
Orientador: Cláudia Pinho Hartleben; Carlos Termignoni  
Bolsista: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
- 2014 - 2016**        Mestrado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Atividade anticoagulante da cathepsina L-like protease BmCL1 do  
carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*  
Orientador: Carlos Termignoni  
Co-orientador: Adriana Seixas  
Bolsista: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
- 2016 - atual**        Doutorado em Biologia Celular e Molecular.  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil  
Título: Metabolismo de lipídeos na reprodução de carrapatos  
Orientador: Carlos Termignoni

Co-orientador: Itabajara da Silva Vaz Júnior

Bolsista: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

### **3. Formação complementar**

**2017 - 2017** Curso de curta duração - Proteômica: identificação de proteínas por MALDI-TOF/TOF. (Carga horária: 80h).

Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, Brasil

**2016 - 2016** Curso de curta duração - Transcritomas de artrópodes vetores por RNAseq. (Carga horária: 120h).

Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, Porto Alegre, Brasil

**2013 - 2013** Curso de curta duração - VI Curso de Inverno em Imunologia. (Carga horária: 80h).

Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, Brasil

**2012 - 2012** Estágio Extra-Curricular.

United States Department of Agriculture, USDA, Washington, D. C., Estados Unidos

**2012 - 2012** Curso de curta duração - Técnica de Coloração Gram. (Carga horária: 30h).

Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratórios de Saúde, TELE-LAB, Brasil

**2012 - 2012** Curso de curta duração - Técnicas para Coleta de Secreções. (Carga horária: 30h).

Sistema de Educação a Distância para Profissionais de Laboratórios de Saúde, TELE-LAB, Brasil

### **4. Atuação profissional**

**2011 – 2013**

Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Vínculo: Aluno

Enquadramento funcional: Estagiária

Carga horária: 20h

Regime: Parcial

### **2012 – 2012**

United States Department of Agriculture - USDA

Agricultural Research Service, Knipling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory. Kerrville, Texas, EUA.

Vínculo: Estagiário

Enquadramento funcional: Estagiário Visitante

Carga horária: 40h

Regime: Integral

### **2012 – 2013**

Universidade Federal de Pelotas - UFPEL

Monitoria na disciplina de Biotecnologia Microbiana I no curso de graduação em Biotecnologia durante o semestre 2012/2

Vínculo: Aluno

Enquadramento funcional: Monitora

Carga horária: 16h

Regime: Parcial

### **2013 – 2013**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Estágio Curricular de Final de Curso no Laboratório de Peptídeos e Enzimas Proteolíticas, sob orientação do prof. Dr. Carlos Termignoni

Vínculo: Aluno

Enquadramento funcional: Estagiária

Carga horária: 30h

Regime: Parcial

### **2014 – 2016**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Vínculo: Aluno

Enquadramento funcional: Aluno de Mestrado

Regime: Dedicção exclusiva

## **2016 – Atual**

Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS

Vínculo: Aluno

Enquadramento funcional: Aluno de Doutorado

Regime: Dedicção exclusiva

## **5. Prêmios e títulos**

**2011** Prêmio Jovem Pesquisador - 3º lugar pela apresentação na modalidade pôster na área de Ciências Biológicas - XX Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas

**2012** Trabalho Destaque na modalidade apresentação oral na área de Ciências Biológicas - 21 Congresso de Iniciação Científica, Universidade Federal de Pelotas

## **6. Artigos completos publicados em periódicos**

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; TORQUATO, R.; TANAKA, A.; PINTO, A.F.M.; DIEDRICH, J.K.; YATES III, J.R.; VAZ, I.S.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. Blood anticlotting activity of a *Rhipicephalus microplus* cathepsin L-like enzyme. *BIOCHIMIE*, v.163, p.12 - 20, 2019. [doi:10.1016/j.biochi.2019.04.025]

SABADIN, G. A.; XAVIER, M. A.; VAZ JUNIOR, I. S. Control of Redox Homeostasis in Tick Blood Feeding. *ACTA SCIENTIAE VETERINARIAE (ONLINE)*, v.47, p.1 - 11, 2019.

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; PINTO, A.F.M.; DIEDRICH, J.K.; YATES III, J.R.; GONZALES, S.; FARBER, M.; VAZ, I.S.; TERMIGNONI, C. Tick Gené's organ engagement in lipid metabolism revealed by a combined transcriptomic and proteomic approach. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.10, p.787 - 797, 2019. [doi:10.1016/j.ttbdis.2019.03.013]

XAVIER, M.A.; TIRLONI, L.; PINTO, A.F.M.; DIEDRICH, J.K.; YATES III, J.R.; MULENGA, A.; LOGULLO, C.; VAZ, I.S.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. A proteomic insight into vitellogenesis during tick ovary maturation. *Scientific Reports.* , v.8, p.4698 - , 2018. [doi:10.1038/s41598-018-23090-2]

SABADIN, G.A.; PARIZI, L.F.; KIIO, I.; XAVIER, M.A.; MATOS, R.S.; CAMARGO-MATHIAS, M.I.; GITHAKA, N.W.; NENE, V.; VAZ JUNIOR, I. S. Effect of recombinant glutathione S-transferase as vaccine antigen against *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus sanguineus* infestation. *VACCINE*, v.35, p.6649 - 6656, 2017.

SÁ, G.L.; PACHECO, D.B.; MONTE, L.G.; SINNOTT, F.A.; XAVIER, M.A.; RIZZI, C.; BORSUK, S.; BERNE, M.E.A.; ANDREOTTI, R.; HARTLEBEN, C.P. Diagnostic Potential of Anti-rNcp-43 Polyclonal Antibodies for the Detection of *Neospora caninum*. *CURRENT MICROBIOLOGY*, v.68, p.472 - 476, 2013.

MONTE, L.G.; JORGE, S.; XAVIER, M.A.; LEAL, F.M.A.; AMARAL, M.G.; SEIXAS, F.K.; DELLAGOSTIN, O.A.; HARTLEBEN, C.P. Molecular characterization of virulent *Leptospira interrogans* serogroup Icterohaemorrhagiae isolated from *Cavia aperea*. *ACTA TROPICA*, v.126, p.164 - 166, 2013.

#### **7. Capítulos de livros publicados**

VALIATI, F.E.; RODRIGUES, F.M.; PEREIRA, M.B.; XAVIER, M.A.; RAMIREZ, R. Microsatélites (STR) In: *Biotecnologia Forense*. 1 ed. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2014, v.1, p. 67-94. ISBN: 9788571929494

#### **8. Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)**

SILVEIRA, L.M.; XAVIER, M.A.; DI MAGGIO, L.S.; VAZ JUNIOR, I.S.; TERMIGNONI, C. Heparin-binding proteins from *Rhipicephalus microplus* and *Fasciola hepatica* In: 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Joinville. 2018.

XAVIER, M. A.; TIRLONI, LUCAS; PINTO, ANTÔNIO F.M.; FARBER, MARISA; DA SILVA VAZ, ITABAJARA; TERMIGNONI, C. Proteomic profile of Gené organ from fully engorged *Rhipicephalus microplus* females In: 47a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de

Bioquímica e Biologia Molecular, Joinville. 2018.

XAVIER, M. A.; TIRLONI, L.; PINTO, A. F. M.; SEIXAS, A.; VAZ JUNIOR, I. S.; TERMIGNONI, C. A kinetic proteomic study of *Rhipicephalus microplus* ovaries In: 46th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Águas de Lindoia. 2017.

XAVIER, M. A.; TIRLONI, L.; VAZ JUNIOR, I. S.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. Anticlotting activity of a cathepsin L-like protease from *Rhipicephalus microplus* tick In: 45a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, Natal. 2016.

XAVIER, M. A.; TIRLONI, L.; OLDIGES, D. P.; VAZ JUNIOR, I. S.; SEIXAS, A.; TERMIGNONI, C. Cloning of a *Rhipicephalus microplus* midgut thrombin inhibitor In: 23rd Congress of IUBM and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu. 2015.

KINAPPE, L.; TIRLONI, L.; DI MAGGIO, L. S.; XAVIER, M. A.; DOURADO, T.; TERMIGNONI, C.; VAZ JUNIOR, I. S. Heparin-binding proteins in the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae In: 23rd Congress of IUBM and 44th Annual Meeting of the Brazilian Society for Biochemistry and Molecular Biology (SBBq), Foz do Iguaçu. 2015.

JORGE, S.; XAVIER, M. A.; MONTE, L. G.; OLIVEIRA, N. R.; LEAL, F. M. A.; AMARAL, MARTA G.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTLEBEN, C. P. Isolamento e caracterização de *Lepstospira interrogans* de *Cavia aperea* (preá) In: VI Simpósio de Microbiologia Aplicada e II Encontro Latino-Americano de Microbiologia Aplicada, Porto Alegre. 2012.

XAVIER, Marina A.; SÁ, G. L.; BORSUK, S.; BERNE, M. E. A.; HARTLEBEN, CLÁUDIA P. Produção de proteína imunodominante de *Neospora caninum* em sistema procarioto: caracterização da antigenicidade e imunogenicidade In: 21 Congresso de Iniciação Científica, Pelotas. 2012.

LEAL, F. M. A.; XAVIER, M. A.; MONTE, L. G.; SÁ, G. L.; HARTWIG, D.; SEIXAS, F.

K.; HARTLEBEN, C. P. Avaliação da Proteína Recombinante LigBrep no Diagnóstico da Leptospirose Suína In: 20º Congresso de Iniciação Científica, 10º Mostra de Pós-Graduação e 3º Congresso de Extensão UCPel, Pelotas. 2011.

COLLARES, T. F.; XAVIER, M. A.; COLLARES, T.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTLEBEN, C. P. Produção de Anticorpos Monoclonais e Policlonais Anti Eritropoetina Recombinante Humana In: XXII Encontro de Pós-Graduação UFPel, Pelotas. 2011.

COLLARES, T. F.; PEREIRA, W. M.; XAVIER, M. A.; SEIXAS, F. K.; DELLAGOSTIN, O. A.; HARTLEBEN, C. P. Produção de Anticorpos Policlonais Anti Eritropoetina Recombinante Humana para Detecção em Doping In: XXXVI Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia, Foz do Iguaçu. 2011.

XAVIER, M. A.; LEAL, F. M. A.; RIZZI, C.; COLLARES, T.; HARTLEBEN, C. P. Purificação de Anticorpos Policlonais de Coelho Através da Precipitação por Sulfato de Amônio In: XX Congresso de Iniciação Científica e III Mostra Científica UFPel, Pelotas. 2011.

XAVIER, M. A.; LEAL, F. M. A.; LUIZ, J. P. M.; PEREIRA, W. M.; MONTE, L. G.; BROD, C.; MOREIRA, C. N.; HARTLEBEN, C. P. Soroprevalência de Leptospirose em Cães Errantes In: IV Simpósio Sul de Imunologia e XXII Encontro Gaúcho de Imunologia, Bento Gonçalves. 2011.

## **9. Organização de evento**

ROLOFF, B. C.; SANTOS, B. C.; COUTO, C. A. T.; GARCIA, C. S.; LEAO, D. P.; NUNES, E. M.; PEREIRA, F. R.; VALIATI, F. E.; RODRIGUES, F. M.; DUTRA, F. S. P.; MAAGH, F. B.; RIBEIRO, F. V.; KREMER, F. S.; DE PAULA, G. C.; DEBOM, G. N.; OLIVEIRA, G. B.; ABREU, H. S.; PLACA, J. R.; ESLABAO, L. B.; TAVARES, L. A.; GOEDERT, L.; RODRIGUES, L. P.; PEREIRA, M. B.; XAVIER, M. A.; TAVARES, M. G. P.; WOLOSKI, R. S.; FORMOSO, R. S.; PIRAINÉ, R. E. A.; SCHUCH, R. A.; CASARIN, T.; TAVARES, V. R. S. Simpósio de Biotecnologia: Pesquisa e Desafios para Inovação, 2013.

## **10. Participação em banca de comissões julgadoras**

XXX Salão de Iniciação Científica da UFRGS - Sessão Bioinformática II, 2018. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.