CISTEÍNO Y SERINO PROTEINASAS EN LOS HUEVOS DE *BOOPHILUS MICROPLUS*

A. FERNÁNDEZ-CALIENES VALDÉS [1], J. MENDIOLA MARTÍNEZ [1], H. HERNÁNDEZ ALVAREZ [1] & RAFAEL DE LA VEGA [2]

(Accepted December 2002)

BOOPHILUS MICROPLUS, EMBRIOGÉNESIS, PROTEINASA SERINO, CISTEÍNO PROTEINASA

RESUMEN : Para comprender mejor la embriogénesis de las garrapatas, se profundizó en el estudio del complejo proceso de degradación de proteínas del huevo en *Boophilus microplus*. Mediante electroforesis en geles de poliacrilamida se evidenció la presencia de un perfil complejo de polipéptidos en los huevos con predominio de proteínas de alto peso molecular, 191.1, 138.3, 128.5, 114.9, 103.1, 83.0, 71.7 y 45.4 kDa. Los cambios en el perfil se hicieron evidentes a partir del tercer día de incubación de los huevos indicando el posible inicio de la embriogénesis. La proteólisis en los huevos ocurrió a pH ácido. La presencia de inhibidores de cisteíno proteinasas evitó la degradación de las proteínas en diferentes momentos de incubación, con mayor significación en momentos avanzados de la embriogénesis. La caracterización de la actividad proteolítica dependiente de cisteína reveló la coincidencia de semejantes a la catepsina B y a la catepsina L. Ambas actividades enzimáticas se incrementaron en los estadíos finales del desarrollo del embrión, alcanzando niveles más elevados con la eclosión, especialmente la semejante a catepsina L. Una actividad semejante a quimotripsina se detectó en la última etapa de la embriogénesis con mayor intensidad, también, después de la eclosión.

BOOPHILUS MICROPLUS, EMBRYOGENESIS, SERINE PROTEINASE, CYSTEINE PROTEINASE

SUMMARY: To a better understanding of tick embryogenesis, the *Boophilus microplus* egg proteins degradation was studied. A complex profile mainly represented by 191.1, 138.3, 128.5, 114.9, 103.1, 83.0, 71.7 and 45.4 kDa peptides was showed, using polyacrylamide gel electrophoresis in denaturing conditions. Changes in protein composition began at third day of egg incubation suggesting the beginning of embryogenesis. Egg proteolysis occurred at low pH and cysteine proteinase inhibitors avoid degradation at different times of incubation preferentially at advanced embryogenesis. The cysteine-dependent acid proteolysis was represented by the presence of cathepsin B and L-like activities. Both activities increased at latest stages of embryo development, reaching the highest levels with hatching, especially the cathepsin L- like activity. A chymotrypsin like activity also appeared in the eggs at late embryogenesis and its value also reached a maximum with hatching.

1. Departamento de Parasitología, Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí",Autopista Novia del Mediodía Km 6 ½, Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad de La Habana, Cuba.Email: ayme@ipk.sld.cu

2. Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos, Ciudad de la Habana, Cuba.

Introducción

El desarrollo temprano de los animales ovíparos tiene lugar en ausencia de un suplemento nutricional, por lo que la embriogénesis procede dependiendo de la degradación de las reservas maternas. Estos materiales se localizan principalmente en los gránulos o esferas de yema, el organelo subcelular más abundante de los ovocitos maduros y que puede almacenar alrededor del 80 % de las proteínas totales en el huevo.

En la yema de artrópodos se han hallado proteasas semejantes a tripsina, catepsina B, L y D responsables de la hidrólisis de las proteínas (Medina *et al.* 1988; Fagotto, 1990[a]; Nussenzveig *et al.*, 1992; Ribolla *et al.* 1993; Yamamoto & Takahashi, 1993; Sappington & Raikhel, 1995; Zhao *et al.*, 1996; Giorgi *et al.*, 1997; Logullo *et al.*, 1998). La actividad proteolítica en los huevos debe estar altamente regulada para prevenir la degradación inadecuada e incontrolada. Algunas serino proteinasas son reguladas al nivel transcripcional y sintetizadas en el estadío específico en que son requeridas (Garesse *et al.*, 1980; Esquieta & Vallejo, 1985; Indrasith *et al.*, 1988; Masetti & Giorgi, 1989), mientras las cisteíno proteinasas son reguladas en el paso de activación de la *proenzima* (Yamamoto & Takahashi, 1993; Ribolla & De Bianchi, 1995).

Las fluctuaciones de las actividades proteolíticas en las células también son posibles debido a cambios en sus inhibidores (Garesse *et al.*, 1980). En huevos de garrapatas ixodidas se han encontrado y aislado varios componentes proteicos con actividad inhibitoria de la proteólisis: *Rhiphicephalus evertsi evertsi*, *Hyalomma truncatum*, *Boophilus decoloratus* y *Boophilus microplus* (Willadsen & Riding, 1979; Viljoen *et al.*, 1985). En presencia de estas moléculas se inhiben la tripsina pancreática y la quimotripsina bovinas (Vermeulen *et al.*, 1988, Willadsen & Riding, 1980). Ninguno de estos inhibidores ha sido descubierto por su habilidad de inhibir proteinasas realmente disponibles en las propias células.

De las proteasas presentes en los huevos de las garrapatas se conoce poco. Vermeulen *et al*, (1988), detectaron que los huevos de *B. decoloratus* y *Amblyomma hebraeum* contienen entre 10 y 18 μg de proteasas por mg de peso fresco de huevos, respectivamente, utilizando la tripsina como patrón, aunque estos autores no caracterizaron las actividades enzimáticas encontradas. En la garrapata blanda *Ornithodorous moubata* se demostró la presencia de una actividad semejante a la catepsina L y su responsabilidad en la degradación de las proteínas de la yema (Fagotto, 1990[a]). Recientemente, se purificó una proteinasa dependiente de ácido aspártico de los huevos de *B. microplus*, que enlaza grupos hemo y degrada vitelina *in vitro* (Logullo *et al.*, 1998; Sorgine *et al.*, 2000).

La hidrólisis acídica de las proteínas de los huevos de *B. microplus* por una actividad cisteíno proteinasa y la aparición de actividad proteolítica semejante a quimotripsina en estadíos avanzados del desarrollo del embrión próximos a la eclosión, fueron estudiadas para contribuir a un mejor entendimiento del complejo proceso de la degradación de proteínas durante la embriogénesis de las garrapatas y a la búsqueda de nuevos blancos para el control de este artrópodo.

Materiales y Métodos

Para la realización de este trabajo empleamos inhibidores y péptidos sintéticos de Sigma Chemical Co. Los reactivos para la electroforesis fueron adquiridos de Riedel-deHaen. La albúmina de suero bovino y los patrones de peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS se obtuvieron de BDH.

La cepa de *B. microplus* (libre de *Babesia*, sps.) se mantuvo por pases sucesivos sobre ganado Holstein en los Laboratorios Biológicos y Farmacéuticos (LABIOFAM). Los huevos puestos el tercer día de oviposición se incubaron a 30° C y 90 % de humedad relativa. Se tomó una muestra de estos huevos en los días 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10, 14, 16, 18 y 21 de incubación. Se homogeneizaron manualmente en una relación de 100 mg de huevos por mL de NaCl 0.9%. Después de centrifugar a 10^4 x g durante 30 min, el sobrenadante se almacenó a —70° C para ensayos posteriores. La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry *et al.* (1951) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

Para determinar el pH óptimo de la hidrólisis proteica endógena, el extracto de huevos se incubó con 2 vol. de soluciones tampón (citrato100 mM-fosfato 200 mM pH 2.6-7.0 y tris-HCl 200 mM pH 8.0-9.0) y 1 vol. de 0.9 NaCl % a 37° C durante 2 horas; en el caso de valores de pH mayores de 7.0 se ensayó también la incubación durante 24 horas. El análisis de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10 %) con SDS (0.1 %) según Laemmli (1970).

Los estudios de inhibición de la hidrólisis de las proteínas de los huevos por las proteinasas endógenas se realizaron pre-incubando el extracto en tampón citrato- fosfato pH 3.6 a 25° C durante 1 hora con los siguientes inhibidores: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)-butano (E-64), quimostatin, pepstatin, tosillisilclorometilcetona (TLCK) preparados en dimetilsulfóxido (DMSO), fluoruro de difenilmetilsulfonilo (PMSF) preparado en etanol y ácido etilendiamina tetracético (EDTA) preparado en agua destilada (concentración final de cada inhibidor *cf* Fig. 3). Para los inhibidores que requirieron DMSO y etanol en sus soluciones se añadió una cantidad equivalente de estos solventes como control. La reacción enzimática se desarrolló a 37° C durante 2 horas. El análisis de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (10 %) con SDS (0.1 %) según Laemmli (1970).

Para el análisis de la autoproteólisis en diferentes valores de pH, de su inhibición y del cambio en el perfil de las proteínas de los huevos en el transcurso de la embriogénesis, se aplicaron 20 μg de proteínas de cada muestra. Los geles de poliacrilamida se tiñeron con azul brillante de Coomasie. El peso molecular de cada banda de proteína de las muestras se determinó por interpolación lineal a partir de las siguientes proteínas patrones: Citocromo c (12,300 kDa), Mioglobina (17,200 kDa), Anhidrasa carbónica (30,000 kDa), Ovoalbúmina (42,700 kDa), Glutamato-Deshidrogenasa (55,500 kDa), Albúmina (66,250 kDa), Ovotransferrina (76-78,000 kDa), Fosforilasa b (97,400 kDa), β-Galactosidasa (116,300 kDa) y Miosina (200,000 kDa). Cada ensayo se realizó por triplicado.

El análisis densitográfico se desarrolló mediante el Programa ImageMaster 1D Software versión 4.00 de Amershan Pharmacia Biotech a partir de las imágenes de los geles digitalizadas mediante capturador de barrido ImageScanner también de Amershan Pharmacia Biotech.

El método utilizado con los sustratos arginil-4-metoxi-β-naftilamida (Arg-βNa), N-carbobenzoxi-arginina-arginina-4-metoxi-β-naftilamida (Z-Arg-Arg-βNa), N-carbobenzoxi-fenilalanina-arginina-4-metoxi-β-naftilamida (Z-Phe-Arg-βNa) y N-carbobenzoxi-arginil-4-metoxi-β-naftilamida (Z-Arg-βNa) fue descrito por Barrett (1972) mientras el ensayo con Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA se realizó empleando la metodología descrita por Buttle & Barrett (1984). La inhibición de la hidrólisis de los péptidos sintéticos se determinó preincubando cada extracto con tampón (pH 4.0 para Z-Phe-Arg-βNa, pH 6.5 para Z-Arg-Arg-βNa y pH 7.5 para Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA) e inhibidor durante 1 hora a 25° C previo a la adición del sustrato (Mendiola *et al.* 1996). Se emplearon además de los inhibidores ya mencionados, iodoacetamida, inhibidor de tripsina de la soya, preparados en agua destilada y o-fenantrolina preparado en etanol (concentraciones finales: *cf*. Tabla 3.

Resultados

Polipéptidos. Para estudiar el comportamiento de la totalidad de las proteínas del huevo durante la embriogénesis analizamos la misma cantidad de proteínas de cada muestra mediante electroforesis bajo condiciones desnaturalizantes y no reductoras. Observando el cambio de las bandas, pudimos corroborar la presencia de un perfil complejo, con predominio de proteínas de alto peso molecular. Los polipéptidos más representados mostraron masas moleculares de: 191.1, 138.3, 128.5, 114.9, 103.1, 83.0, 71.7 y 45.4 kDa (Tabla 1, Fig. 2B). Los cambios en el perfil proteico, posiblemente generado por degradación, desoligomerización y/o disociación, se evidenciaron a partir del tercer día de la embriogénesis, teniendo la mayor significación en las bandas de 191.1 y 83.0 kDa (Tabla 1). Como resultado de la embriogénesis se afecta de manera considerable la distribución relativa de los polipéptidos mayoritarios y se generan nuevas bandas polipeptídicas (Tabla 1).

Día	Peso Molecular (kDa)													
	191.3	138.3	128.5	120.1	117.1	114.9	105.0	103.1	83.0	80.2	71.1	69.3	45.4	40.0
1	7.2	14.2	12.1	-	-	8.2	-	10.9	9.7	-	15.0	-	9.1	-
2	6.7	14.6	12.3	-	-	9.0	-	10.1	9.7	-	15.7	-	9.4	-
3	5.5	15.0	12.8	-	-	11.0	-	9.8	9.7	-	15.1	-	10.0	-
4	2.0	15.6	12.2	-	-	10.0	-	10.6	4.2	-	15.5	-	9.6	-
5	1.6	16.2	4.7	-	-	10.0	-	11.7	4.9	-	16.0	-	-	12.9
7	-	4.2	17.0	-	-	13.2	-	10.6	4.9	-	15.7	-	-	14.5
10	-	2.0	13.8	-	-	12.7	-	12.2	-	10.2	14.1	-	-	13.6
14	-	2.4	13.9	-	-	14.0	-	12.8	-	-	16.4	4.0	-	15.3
16	-	-	-	17.2	-	-	14.9	10.9	-	-	13.2	10.2	-	15.4
18	-	-	-	18.4	-	-	11.5	17.1	-	-	13.6	10.8	-	16.0
21	-	-	-	-	11.80	-	11.5	14.4	-	-	10.4	12.5	-	14.7

TABLA 1. Distribución relativa (%) de las bandas proteicas (obtenidas mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS) más representadas en extractos de huevos de *Boophilus microplus*, muestreados a diferentes intervalos de tiempo durante la embriogénesis y analizadas por densitografía.

La cantidad de proteínas totales con respecto al peso total de los huevos en cada extracto el primer y el tercer día mantuvieron valores casi idénticos mientras que a partir de esa fecha los niveles descienden lentamente hasta el inicio de la eclosión, momento en que se observó la mayor disminución (FIG. 1).

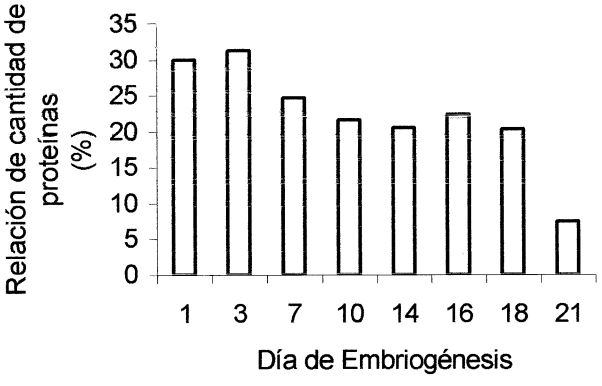


Fig. 1. — Comportamiento de la cantidad de proteínas respecto a la masa de huevos de *Boophilus microplus* durante la embriogénesis.

Proteólisis. Se observa proteólisis al incubar los extractos de huevos de *B. microplus* de cualquier edad en medio ácido durante 2 horas, en la Figura 2 (A y B) se muestra el efecto del pH en extractos de huevos del día 1 y 14. La degradación máxima ocurrió a pH 3.6 mientras a valores de pH iguales y por encima de 5.0 no se aprecia hidrólisis. Esta hidrólisis proteica solo se redujo en presencia de inhibidores de cisteíno proteinasas (FIG. 3). Resulta interesante destacar que la inhibición de la degradación no incluye la de los polipéptidos que se afectaron al inicio de la incubación, esto unido al intenso efecto de los inhibidores en el día 14 (FIG. 3B) sugiere una mayor participación de las cisteíno proteinasas en estadíos avanzados de la embriogénesis. Por otra parte, en ningún extracto ensayado se observó inhibición en presencia de pepstatin, aunque sí al ensayar la hemoglobina bovina como sustrato (datos no mostrados), al parecer se requieren mayores concentraciones de inhibidor que la empleada por nosotros para observar el efecto, de hecho LOGULLO *et al.* (1998) demostraron la actividad degradativa de vitelina por BYC (*Boophilus* Yolk Cathepsin) a una concentración de pepstatin de 10^{-4} M después de 24 horas de incubación. Además, la extracción de esta proteinasa se realizó en presencia de inhibidores de serino y cisteíno proteinasas en el medio.

Caracterización de la actividad proteolítica. El extracto de huevos de *B. microplus* hidrolizó los péptidos sintéticos Z-Arg-Arg-βNA y Z-Phe-Arg-βNA. Estas hidrólisis se hicieron máximas a pH 6.5 para el primero y pH 4.0 para el segundo (TABLA 2) ambas actividades se afectaron solamente por inhibidores de cisteíno proteinasas (TABLA 3) y se incrementaron con la eclosión. Sin embargo, Z-Phe-Arg-βNA aumentó en relación al primer día 8.35 veces y Z-Arg-Arg-βNA 3 veces. La hidrólisis de Z-Phe-Arg-βNA de ser 3.3 veces mayor que la de Z-Arg-Arg-βNA en el

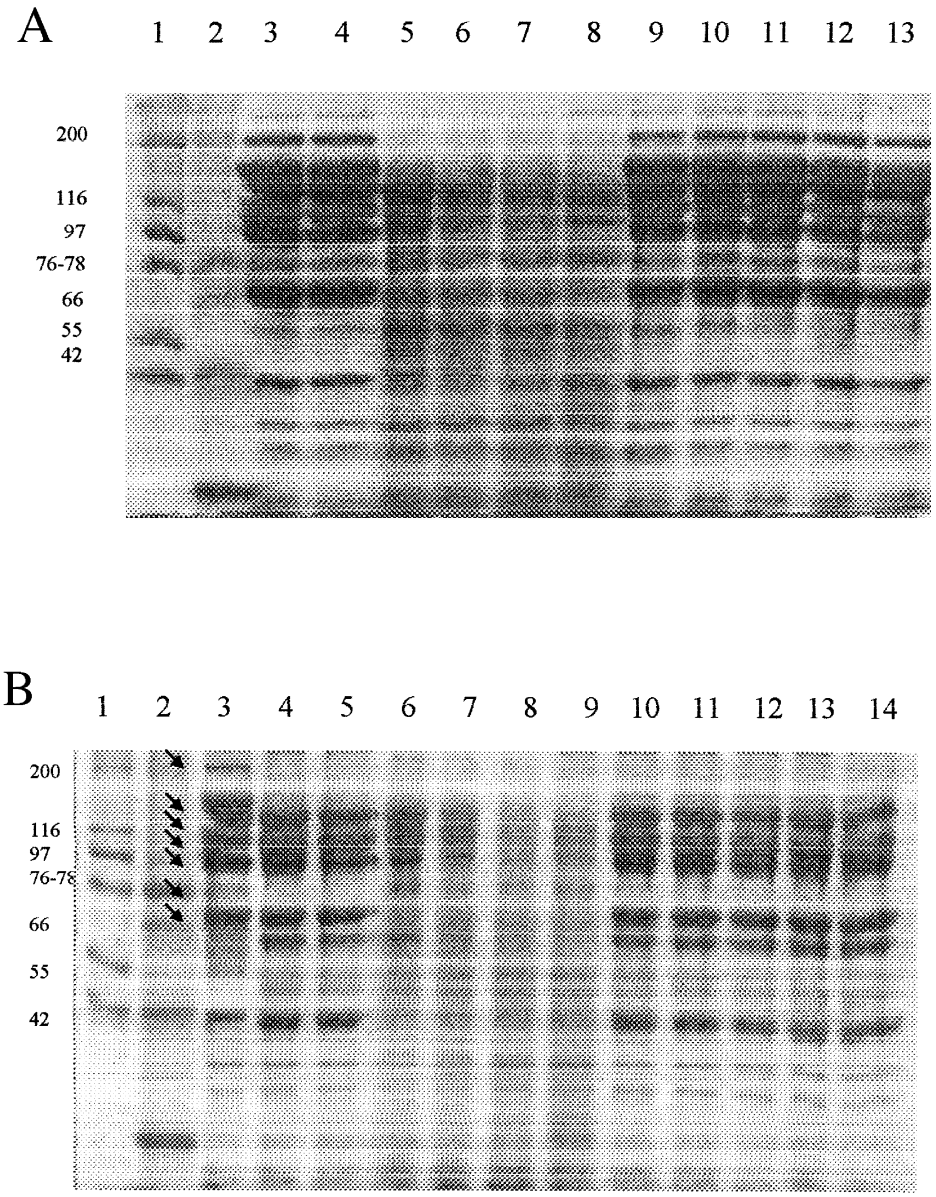


FIG. 2. — Efecto del pH sobre la hidrólisis endógena de proteínas de huevos de *Boophilus microplus.* — A. Día 1 de incubación. B. — Día 14 de incubación:

A: *1, Marcadores de peso molecular (42.7-200 kDa); 2, Marcadores de peso molecular (12.3-78 kDa); 3 y 4, Proteínas totales del extracto sin preincubar, 5, Proteínas totales del extracto preincubado a pH 2.6; 6, pH 3.0; 7, pH 3.6; 8, pH 4.0; 9, pH 5.0; 10, pH 6.0; 11, pH 7.0; 12, pH 8.0; 13, pH 9.0*.

B: *3, Proteínas totales del extracto en el día 1 de incubación, el resto de los carriles conservaron el mismo orden de A), las flechas indican los péptidos de 191.3, 138.3, 128.5, 114.9, 103.1, 83.0, 71.1 y 45.4 kDa.*

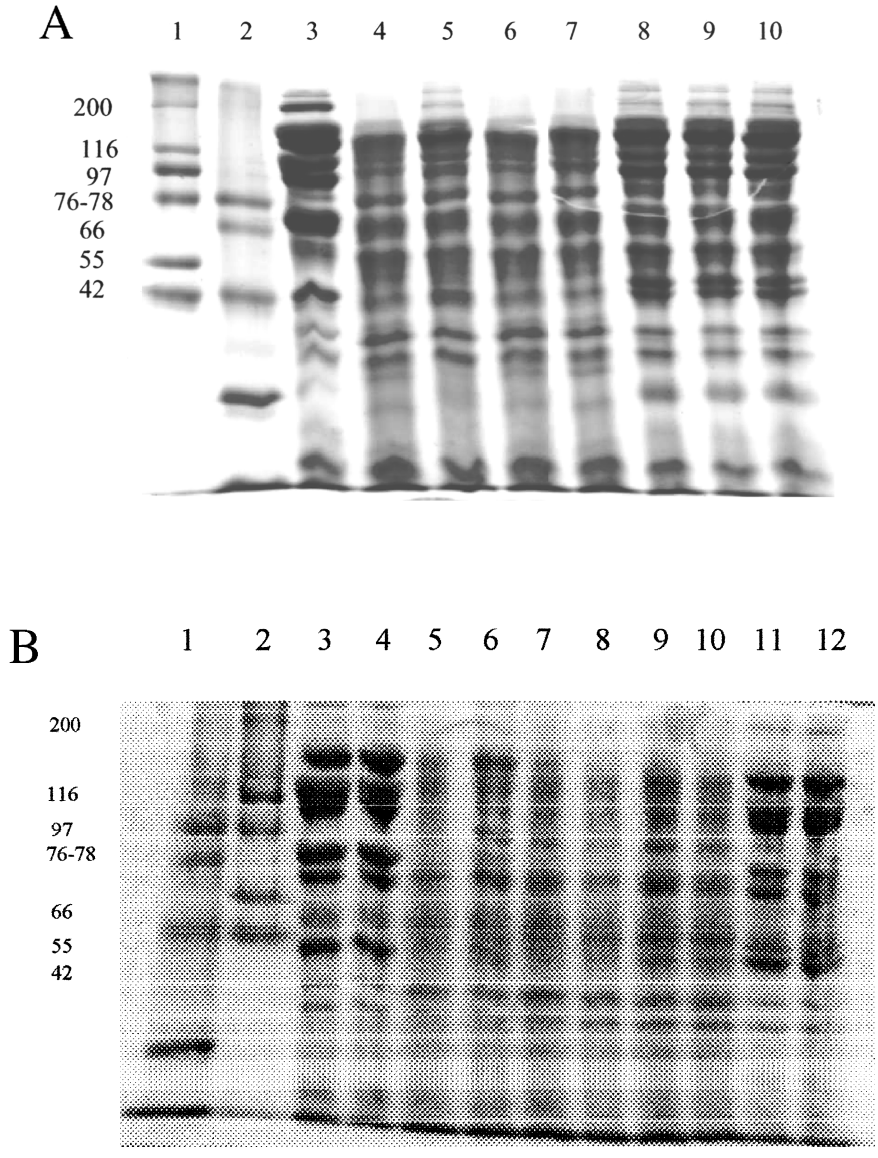


FIG. 3. — Efecto de varios inhibidores de proteinasas sobre la hidrólisis de las proteínas de los huevos de *Boophilus microplus*. A) Día 1 de incubación:B) Día 14 de incubación:

A: *1, Marcadores de peso molecular (42.7-200 kDa); 2, Marcadores de peso molecular (12.3-78 kDa); 3, Proteínas totales del extracto sin preincubar; 4, Proteínas totales del extracto preincubado a pH 3.6; 5, Proteínas totales del extracto preincubado a pH 3.6 en presencia de DMSO; 6, EDTA 10 mM; 7, Pepstatin 14 μM; 8, E-64 100 μM; 9, TLCK 1 mM; 10, quimostatin 1 mM.*

B*: 7, Proteínas totales del extracto preincubado a pH 3.6 en presencia de etanol; 10, PMSF (2 mM) y se excluyó TLCK, el resto mantuvo el orden de A).*

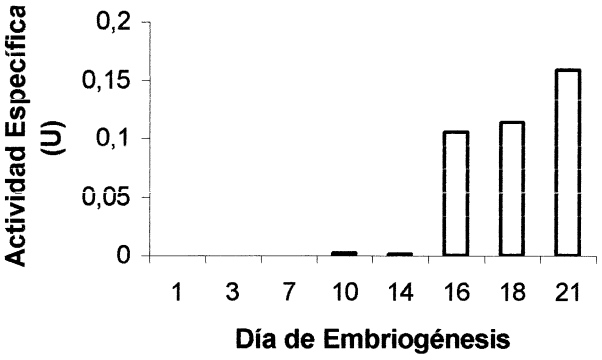


FIG. 5. — Cinética de la actividad hidrolítica del sustrato Suc-Ala-Ala-Pro-Phe-pNA durante la embriogénesis de *Boophilus microplus*.

incrementando la complejidad del análisis de sus resultados y haciéndoles sugerir la posibilidad de interconversión de la hemovitelina.

El cambio hallado en el comportamiento de las proteínas a partir del tercer día de embriogénesis no ha sido reportado anteriormente en garrapatas, quizás porque el período de toma de la muestra por otros autores lo excluyó. El hecho de que la fusión de los núcleos de los gametos ocurra a partir de la puesta del ovocito maduro (DIEHL *et al.* 1982) pudiera estar relacionado con este resultado pues sería a partir de este suceso que se iniciaría la embriogénesis. Por otra parte, coincidiendo con lo observado por CHINZEI & YANO (1985) en *O. moubata*, se observó una disminución muy significativa de la cantidad de proteínas al iniciarse la eclosión.

La presencia de cisteíno proteinasas ácidas ha sido reportada en huevos de varios artrópodos: *Bombyx (*KAGEYAMA *et al.* 1981); *Artemia* (PERONA & VALLEJO, 1982); *Periplaneta* (STORELLA *et al.* 1985); *Drosophila* (MEDINA *et al.* 1988); *Ornithodorous* (FAGOTTO, 1990[a]), *Musca* (RIBOLLA *et al.* 1993), *Antheraea* (ZHAO, 1996), *Aedes* (SAPPINGTON & RAIKHEL, 1995), *Blattella* (GIORGI *et al.*, 1997). En garrapatas solo se ha descrito para el argásido *O. moubata* (FAGOTTO, 1990[a]). Esta actividad enzimática, responsable de la degradación de las proteínas de la yema, se clasificó como semejante a catepsina L y se activó por proteólisis parcial a pH ácido (FAGOTTO, 1990[b]). En nuestro estudio las actividades proteolíticas halladas muestran semejanzas con la estudiada por FAGOTTO (1990[b]) aunque este no observó hidrólisis del dipéptido de arginina. Este autor en 1991, demostró que los gránulos de yema en *O. moubata* se van acidificando durante el desarrollo hasta llegar a la totalidad con la eclosión. Precisamente, la activación por proteólisis limitada a pH ácido parece ser una etapa importante en la regulación fisiológica de cisteíno proteinasas en los huevos de artrópodos (FAGOTTO, 1990[b]; YAMAMOTO & TAKAHASHI, 1993; RIBOLLA & DE BIANCHI, 1995). Si el incremento en actividad semejante a catepsina L en *B. microplus* está relacionado o no con la acidificación queda por dilucidar.

En huevos de especies de aves, anfibios y crustáceos la degradación controlada de vitelina se debe a la acción de inhibidores específicos de proteasas que se asocian con las proteínas de la yema (BAINTNER & FEHIR, 1974; SUGIMOTO *et al.*, 1984). En huevos de garrapatas han sido descubiertos varios tipos de polipéptidos inhibidores de serino proteinasas (WILLADSEN & RIDING, 1980; VERMEULEN *et al.*, 1988). La mayoría de estos se han ensayado y purificado utilizando tripsina y quimotripsina de páncreas bovino. Sin embargo, las enzimas similares a tripsina halladas frecuentemente en los huevos de artrópodos (GARESSE *et al.*, 1980; EZQUIETA & VALLEJO, 1985; INDRASITH *et al.*, 1988; MASETTI & GIORGI, 1989), se expresan en diferentes períodos del desarrollo embriónico constituyendo este el factor más importante en su regulación.

Nuestros hallazgos excluyen la posibilidad de que serino proteinasas semejantes a tripsina o quimotripsina jueguen un papel importante en la degradación de algún componente proteico mayoritario de los huevos de *B. microplus*, aunque no excluye la degradación controlada y específica, de alguna proteína poco representada en el extracto con una función importante. En *Drosophila* la proteinasa semejante a catepsina B se activa como resultado de una proteólisis parcial por una serino proteinasa también presente en los ovocitos (MEDINA *et al.*, 1988).

Es significativo señalar que de los huevos de *B. microplus* se han aislado dos proteínas que inhiben la tripsina y la quimotripsina bovina (WILLADSEN & RIDING, 1979 y 1980; VILJOEN *et al.*, 1985; VERMEULEN *et al.*, 1988). Según WILLADSEN & RIDING (1980) las cantidades de inhibidor en los huevos al principio de la embriogénesis son muy altas y declinan lenta-

mente hasta la eclosión, las larvas y las cáscaras de los huevos contienen menos inhibidor que los huevos originales y su concentración disminuye gradualmente con la edad de las larvas hasta caer rápidamente después del inicio del estadío parasítico del ciclo de vida (Willadsen & Riding, 1980). El comportamiento de la actividad semejante a quimotripsina de *B. microplus* en la etapa de desarrollo estudiada sugiere que su regulación no transita por una inhibición enzimática sino por la regulación de su expresión.

Hamdaoui *et al.* (1998) encontraron una regulación inversa, en cuanto a la expresión de la enzima y sus inhibidores, en los procesos dependientes de serino proteinasas en el grillo del desierto *Schistocerca gregaria* por los inhibidores SGPI (*Schistocerca gregaria* proteinase inhibitors). Un mecanismo similar pudiera explicar que el aumento de la actividad neutra detectada por nosotros ocurra en momentos en que se hace palpable cierta disminución de la concentración del inhibidor (con la eclosión). Otros estudios realizados por nuestro grupo han revelado la presencia de actividad proteolítica, semejante a la que describimos, en ninfas (datos no publicados) y en el intestino de teleoginas de *B. microplus* (Mendiola *et al.*, 1996), estadíos donde no se observó la presencia del inhibidor (Willadsen & Riding, 1980). Sin embargo, para dilucidar completamente el mecanismo por el cual se regularía esta enzima se requiere de ensayos a nivel de ARN mensajero para estudiar su expresión y además, comprobar el efecto del inhibidor sobre la enzima purificada.

Debido a que da silva *et al.* (1997) encontraron cierto grado de protección a la infestación por *B. microplus* al inmunizar bovinos con BYC, es posible que las enzimas descritas por nosotros en este trabajo puedan ser utilizadas como blancos para futuros métodos de control de garrapatas.

BIBLIOGRAFÍA

Baintner (K.) & Fehir (G.), 1974. — Fate of Egg White Trypsin Inhibitor and start of proteolysis in developing chick embryo and newly hatched chick. — Dev. Biol., 36: 272-278.

Barrett (A. J.), 1970. — Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. — Biochem. J., 117: 601-607.

Barrett (A. J.), 1972. — A new assay for cathepsin B1 and other thiol proteinases. — Anal. Biochem., 47: 280-293.

Buttle (D. J.) & Barrett (A. J.), 1984. — Chymopapain, chromatographic purification and immunological characterization. — Biochem. J., 223: 81-88.

Canal (C. W.), Maia (H. M.), Vaz Junior (I. S.), Chies (J. M.), Farias (N. A. R.), Masuda (A.), Gonzales (J. C.), Osaki (L. S.) & Dewes (H.), 1995. — Changing patterns of vitellin-related peptides during developmentof the cattle tick *Boophilus microplus*. — Exp. & Appl. Acarol., 19: 325-336.

Chinzei (Y.) & Yano (I.), 1985. — Vitellin is the nutrient reserve during starvation in the nymphal stage of a tick. — Experientia, 41: 948-950.

Da Silva (I.), Logullo (C.), Sorgine (M.), Velloso (F. F.), Rosa De Lima (M. F.), Gonzales (J. C.), Masuda (H.), Oliveira (P. L.) & Masuda (A.), 1998. — Immunization of Bovines with an aspartic proteinase precursor isolated from *Boophilus microplus* eggs. — Vet. Immunol. Immunopathol., 66: 331-341.

Diehl (P. A.), Aeschlimann (A.) & Obenchain (F. D.), 1982. — Tick reproduction: oogenesis and oviposition. — In Obenchain, F.D. & Galun, R. (eds), Physiology of ticks: 277-350. Pergamon Press, New York.

Ezquieta (G.) & Vallejo (C. G.), 1985. — Trypsin-like proteinase of *Artemia*: yolk localization and developmental activation. — Comp. Biochem. Physiol., 82B: 731-736.

Fagotto (F.), 1990. — Yolk Degradation in tick eggs: I. Occurrence of a cathepsin L-like acid proteinase in yolk spheres. — Arch. Insect Biochem. Physiol., 14: 217-235.

Fagotto (F.), 1990. — Yolk Degradation in tick eggs: II. Evidence that cathepsin L-like proteinase is stored as a latent, acid activable proenzyme. — Archs. Insect Biochem. Physiol., 14: 237-252.

Fagotto (F.), 1991. — Yolk Degradation in tick eggs: III. Developmentally regulates acidification of the yolk spheres. — Dev. Growth & Differ., 33: 57-66.

Garesse (R. R.), Perona (R.), Marco (R.) & Vallejo (C. G.), 1980. — The unmasking of proteolytic activity during the early development of *Artemia salina*. Identification of a precursor after hatching. — Eur. J. Biochem., 106: 225-231.

Giorgi (F.), Yin (L.), Cecchetini (A.) & Nordin (J. H.), 1997. — The vitellin-processing protease of *Blattella germanica* is derived from a pro-protease of maternal origin. — Tissue & Cell, 29: 293-303.

Hamdaoui (A.), Wataleb (S.), Devreese (B.), Chiou (S.), Van Den Broeck (J.), Van Beeumen (J.), De Loof (A.) & Schoofs (L.), 1988. — Purification and characterization of a group of five novel peptide serine protease inhibitors from ovaries of desert locust, *Schistocerca gregaria*. — *FEBS Letters, 422: 74-78.*

Indrasith (L. S.), Sasaki (T.) & Yamashita (O.), 1988. — A unique protease responsible for selective degradation of a yolk protein in *Bombyx mori*. — J. Biol. Chem., 263: 1045-1051.

Kageyama (T.), Takahashi (S. Y.) & Takahashi (K.), 1981. — Occurrence of three proteinase in the eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. — J. Biochem., 90: 665-671.

Larmmli (U. K.), 1970. — Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. — Nature, 227: 680-685.

Logullo (C.), Da Silva (I.), Sorgine (M. H. F.), Paiva-Silva (G. O.), Faria (F. S.), Zingali (R. B.), De Lima (M. F. R.), Abreu (L.), Oliveira (E. F.), Alves (E. W.), Masuda (H.), Gonzales (J. C.), Masuda (A.) & Oliveira (P. L.), 1998. — Isolation of an aspartic proteinase precursor from the egg of a hard tick, *Boophilus microplus*. — Parasitol., 116: 525-532.

Lowry (O. H.), Rosebrough (N. J.), Farr (A. L.), RandallL (R. J.), 1951. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. — J. Biol. Chem., 113: 265-275.

Masetti (M.) & Giorgi (F.), 1989. — Vitellin degradation in developing embryos of the stick insect, *Carausius morosus*. — J. Insect Physiol., 35: 689-697.

Medina (M.), Leon (P.) & Vallejo (C.G.), 1988. — *Drosophila* cathepsin B-like proteinase: a suggested role in yolk degradation.—Arch. Biochem. Biophys., 263: 355-363.

Mendiola (J.), Alonso (M.), Marquetti (M. C.) & Finlay (C. M.), 1996. — *Boophilus microplus* : multiple proteolytic activities in the midgut. — Exp. Parasitol., 82: 27-33.

Nussenzveig (R. H.), Oliveira (P. L.) & Masuda (H.), 1992.—Identification of yolk platelet-associated hydrolases in the oocytes of *Rhodnius prolixus*.—Arch. Insect Biochem. Biophys. 21: 253-262.

Perona (R.) & Vallejo (C. G.), 1982. — Acid hydrolases during *Artemia* development: a role in yolk degradation. — Comp. Biochem. Physiol., 81B: 993-1000.

Ribolla (P. E. M.) & De Bianchi (A. G.), 1995. — Processing of procathepsin from *Musca domestica* eggs. — Insect Biochem. Molec. Biol., 25: 1011-1017.

Ribolla (P. E. M.), Daffre (S.) & De Bianchi (A. G.), 1993. — Cathepsin B and acid phosphatase activities during *Musca domestica* embryogenesis. — Insect Biochem. Molec. Biol., 23: 217-223.

Sappington (T. W.), Raikhel (A. S.), 1995. — Receptor-mediated endocytosis of yolk proteins by insect oocytes. — In Ohnishi E., Sorobe H., Takahashi S. Y. (eds.), Rec. Advan. Insect Biochem. Molec. Biol. University of Nagoya Press.

Sorgine (M. H. F.), Logullo (C.), Zingali (R. B.), Paiva-Silva (G. O.), Juliano (L.) & Oliveira (P. L.), 2000. — A heme-binding aspartic proteinase from the eggs of the hard tick *Boophilus microplus*. — J. Biol. Chem., 275: 28659-28665.

Storella (J. R.), Wejchowski (D. M.) & Kunkel (J. G.), 1985. — Structure and embryonic degradation of the two native vitellins in he cockroach, *Periplaneta americana*. — Insect Biochem., 15: 65-76.

Sugimoto (Y.), Hanada (S.), Kogo (K.) & Sakaguchi (B.), 1984. — Egg-Yolk trypsin inhibitor identical to albumen ovomucoid. — Biochem. Biophys. Acta., 788: 117-123.

Vermeulen (N. M. J.), Viljoen (G. J.), Bezuidenhout (J. D.), Visser (L.) & Neitz (A. W. H.), 1988. — Kinetic properties of toxic protease inhibitors isolated from tick eggs. — Int. J. Biochem., 20: 621-631.

Viljoen (G. J.), Neitz (A. N. H.), Brozesky (L.), Bezuidenhout (J. D.) & Vermeulen (N. M. J.), 1985. — Purification and properties of tick egg toxic proteins. — Insect Biochem., 15: 475-482.

Willadsen (P.) & Riding (G. A.), 1980. — On the biological role of a proteolytic enzyme inhibitor from the ectoparasite tick *Boophilus microplus*. — Biochem J., 189: 295-303.

Willadsen (P.), Riding (G. A.), 1979. — Characterization of a proteolytic enzyme inhibitor with allergenic activity. — Biochem J., 177: 41-47.

Yamamoto (Y.) & Takahashi (S. Y.), 1993. — Cysteine Proteinase from *Bombyx* eggs: Role in programmed degradation of yolk proteins during embryogenesis. — Comp. Biochem. Physiol., 106B: 35-45.

Zhao (X.), Wang (J.), Yagi (N.), Yamamoto (Y.), Watabe (S.) & Tatahashi (S. Y.), 1996. — Occurrence of a cathepsin B-like acid cysteine proteinase in the eggs of Silkworm Moth, *Antheraea pernyi*. — Comp. Biochem. Physiol., 113B: 95-103.