

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

KATIUSSA PAULA COVER OZELAME

***SCREENING DE UMA BIBLIOTECA COM POTENCIAIS MOLÉCULAS
ACARICIDAS***

Porto Alegre, 2020

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

Screening de uma biblioteca com potenciais moléculas acaricidas

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e molecular do Centro de Biotecnologia da UFRGS como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências

Katiussa Paula Cover Ozelame
Orientador: Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior

Porto Alegre, outubro de 2020

INSTITUIÇÃO E FONTES FINANCIADORAS

Instituição:

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.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Itabajara da Silva Vaz Júnior pela orientação, pela contribuição de conhecimentos para execução do trabalho e pelo apoio.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Imunologia Aplicada a Sanidade Animal na UFRGS por toda ajuda em questionamentos teóricos e práticos que envolvem a pós-graduação. Em especial Jéssica, Marina, Lucía e Gabi que me apoiaram em momentos muito difíceis de ansiedade, depressão, desespero, mas que também compartilharam muitas risadas e fofocas. Em especial, especial a Jéssica por todos os croissants de chocolate na cantina, reclamações sobre o almoço do RU, falta de dinheiro mensal que nos habita até hoje, os vídeos de Onicofose nojentos e as fofocas sobre o De Férias Com o Ex Brasil.

Aos meus amigos de infância e faculdade que não me abandonaram e me deram força pra continuar: Ana Paula, Amanda, Fabiana, Rafael, Jaqueline e minha irmã, Kamila.

Ao que iniciou comigo a trajetória em Porto Alegre como namorado e hoje é meu marido, Daniel. Obrigada pelas milhares de vezes em que tu me abraçou e disse que ia passar. Obrigada por ser a minha fonte de paz depois de um dia exaustivo. Obrigada por me ouvir e apoiar minhas loucuras. Obrigada pelas tuas imperfeições abraçarem as minhas. Tu é incrível, meu amor.

Aos meu pais por serem o exemplo mais belo de simplicidade. Por me ensinarem sobre as verdadeiras riquezas, por me ensinarem a valorizar o esforço de obter um alimento pelas mãos, por terem me criado e me sustentando trabalhando na terra e em um salão de cabeleireiro de 4x4. Apesar de a vida ser muito mais fácil hoje, eu nunca esquecerei dos meus valores e do grande respeito a natureza que vocês sempre se esforçaram pra que eu entendesse. Percebi depois de muito tempo e muito sofrimento que não existe nada melhor do que voltar pra casa. Vocês são meus heróis.

"Se ao escalar uma montanha na direção de uma estrela, o viajante se deixa absorver demasiado pelos problemas da escalada, arrisca-se a esquecer qual é a estrela que o guia."

Antoine de Saint-Exupéry

LISTA DE ABREVIATURAS

17b-IES	17b-Iodoacetoxiestradiol-3-sulfate
AvGST	GST de <i>Amblyomma variegatum</i>
C ₁₇ H ₂₈	Ciclopentanoperidrofenantreno
CDNB	1,2-dicloro-4-nitrobenzeno
DCNB	3,4-dicloronitrobenzeno
EA	Ácido etacrílico
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GSH	Glutationa
GST	Glutationa S-transferase
HIGST	GST de <i>Haemaphysalis longicornis</i>
IC50	Concentração inibitória média
IPTG	Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida
JSF	Febre maculosa japonesa
kdr	<i>knock-down resistance</i>
MAPEG	Proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo de eicosanóides e da glutatona
mRNA	RNA mensageiro
OP	Organofosfatos
ORF	<i>Open reading frame</i>
PS	Piretróide sintéticos
RaGST	GST de <i>Rhipicephalus appendiculatus</i>
RdGST	GST de <i>Rhipicephalus decoloratus</i>
RmGST	GST de <i>Rhipicephalus microplus</i>
RNAi	RNA de interferência
SFTS	Febre severa com síndrome da trombocitopenia
SFTSV	Vírus da febre severa com síndrome da trombocitopenia
TIA	Teste de imersão de adultos
TIM	Triosephosphate isomerase

TPL

Teste de pacote de larva

Resumo

Introdução: Carrapatos são ectoparasitos hematófagos responsáveis pela transmissão de diversos agentes patogênicos. O controle químico continua sendo o método mais eficaz para a supressão do parasita, mas o uso de acaricidas leva a seleção de populações resistentes de carrapatos. O aumento da biodegradação do acaricida por enzimas detoxificadoras, como as glutathione S-transferases (GST), é um dos mecanismos de resistência, por biotransformar compostos tóxicos, facilitando a eliminação dessas moléculas. **Objetivo:** Analisar *in vitro* o efeito de compostos sintéticos sobre a atividade da enzima GST de cinco diferentes espécies de carrapato: *Rhipicephalus microplus* (RmGST), *Haemaphysalis longicornis* (HIGST), *Amblyomma variegatum* (AvGST), *Rhipicephalus decoloratus* (RdGST) e *Rhipicephalus appendiculatus* (RaGST). **Métodos:** Para expressar as enzimas GST em sistema heterólogo de *Escherichia coli* (*E. coli*) na forma recombinante, foi utilizado plasmídeo pET-43 contendo as ORF (*open reading frames*) que codificam as GST de cada espécie. As proteínas foram purificadas através de cromatografia de afinidade à glutathione e testadas para os substratos CDNB (1,2-dicloro-4-nitrobenzeno) e DCNB (3,4-dicloronitrobenzeno) na presença do co-substrato glutathione. Inicialmente, foram testadas 60 moléculas com relação aos efeitos na atividade da enzima rRmGST. Os compostos que apresentaram inibição maior que 50% foram testados contra as GST de outras espécies de carrapato: rHIGST, rAvGST, rRdGST e rRaGST. **Resultados e discussão:** As GST recombinantes com massa molecular de 25 kDa foram expressas a 30 °C com 1 mM de IPTG e purificadas por cromatografia de afinidade à glutathione. Todas as enzimas tiveram atividade com o substrato CDNB, mas não contra DCNB. O composto 795 apresentou uma capacidade de inibição de 58,1% para rRmGST, 27,8% para rAvGST, 2,3% para rHIGST, 23,9% para rRdGST e 31,9% para rRaGST, enquanto o composto 1258 inibiu em 59,4% a atividade da rRmGST, 6,2% da

rAvGST, 24,3% da rHlGST, 1,9% da rRdGST e 100% da rRaGST. As moléculas sintéticas 795 e 1258 pertencem às classes químicas dos curcuminóides e esteróides, respectivamente.

Conclusão: Os resultados identificaram um grupo de possíveis compostos com potencial de ser usado para o controle do carrapato, necessitando de mais estudos para melhor avaliação deste efeito.

Palavras-chave: Carrapatos. Inibidores. Atividade acaricida. Glutathione S-transferase.

Abstract

Introduction: Ticks are hematophagous ectoparasites responsible for the transmission of numerous diseases. Chemical control remains the most effective method for suppressing the parasite, but the use of acaricides leads to the selection of resistant tick populations. The increased biodegradation of the acaricide by detoxifying enzymes, such as glutathione S-transferase (GSTs), is a mechanism of resistance mediated by the biotransformation of toxic compounds facilitating the excretion of these molecules. **Objective:** To analyze the *in vitro* effects of synthetic compounds about the activity of the enzyme GST of five different tick species: *Rhipicephalus microplus* (RmGST), *Haemaphysalis longicornis* (HIGST), *Amblyomma variegatum* (AvGST), *Rhipicephalus decoloratus* (RdGST) and *Rhipicephalus appendiculatus* (RaGST). **Methods:** For expression of recombinant GSTs enzymes in heterologous *E. coli* system, the plasmid pET-43 containing GST ORFs (open reading frames) that codify GSTs of different species were used. Proteins were purified by glutathione affinity chromatography and activity tested against the substrates CDNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzene) and DCNB (3,4-dichloronitrobenzene) in the presence of the co-substrate glutathione. Firstly, 60 molecules were tested against the rRmGST enzyme. Compounds that inhibited the enzyme activity in more than 50% were test with rHIGST, rAvGST, rRdGST and rRaGST. **Result and discussion:** Recombinant proteins with a molecular weight of 25 kDa were expressed at 30°C with 1mM of IPTG and purified with glutathione affinity chromatography. All enzymes showed activity against the CDNB substrate, but not against DCNB. Compound 795 inhibited the enzymatic activity in 58.1% for rRmGST, 27.8% for rAvGST, 2.3% for rHIGST, 23.9% for rRdGST and 31.9% for rRaGST, while compound 1258 inhibited 59.4% of rRmGST, 6.2% of rAvGST, 24.3% of rHIGST, 1.9% of rRdGST, 100% of rRaGST activity. The synthetic molecule 795 and 1258

belong to the chemical class of curcuminoids and steroids, respectively. **Conclusion:** These results identified a group of possible compounds with the potential to be used for tick control, requiring further studies for a better evaluation of these effect.

Keywords: Ticks. Inhibitors. Acaricidal activity. Glutathione S-transferase.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Carrapatos	9
1.2	Impactos econômicos causados pelos carrapatos	16
1.3	Métodos de Controle.....	17
1.3.1	Controle biológico e imunológico	17
1.3.2	Controle químico	18
1.3.2.1	Resistência aos acaricidas	20
1.4	Glutathione S-transferase	23
1.4.1	Metabolismo de xenobióticos	26
1.4.2	Inibidores de GST como potenciais parasiticidas.....	29
2	Objetivo	32
3	Resultados.....	33
4	Discussão	57
5	Conclusão	62
	Referências	63
	Anexo A.....	74

1 Introdução

1.1 Carrapatos

Carrapatos são ectoparasitos hematófagos de vertebrados, como mamíferos, anfíbios, répteis e aves e pertencem à classe Aracnida, subclasse Acari, ordem parasitiformes e subordem Ixodida (ANDERSON; MAGNARELLI, 2008; SONENSHINE; ROE, 2014). São classificados em três famílias: Ixodidae com cerca de 700 espécies, também conhecidos como carrapatos duros, Argasidae, representada por mais de 200 espécies, chamados de carrapatos moles, e Nutalliellidae, que possui uma única espécie (NAVA *et al.*, 2017).

Os carrapatos possuem potencial para a transmissão de uma grande variedade de agentes patogênicos, incluindo fungos, vírus, bactérias e protozoários (MADISON-ANTENUCCI *et al.*, 2020). Algumas espécies de carrapato, como *Dermacentor* e *Amblyomma*, são responsáveis por causar paralisia, reações alérgicas e toxicoses através de sua picada (CARTER *et al.*, 2016; ESPINOZA-GOMEZ *et al.*, 2011; SONENSHINE; ROE, 2014).

Em animais domésticos e em humanos, a importância das doenças causadas pelos patógenos que são transmitidos por carrapatos são medidas através da morbidade e mortalidade, enquanto os impactos na indústria pecuária estão associados aos efeitos diretos causados pelo parasitismo e pelo papel do carrapato como vetor de patógenos (DANTAS-TORRES; CHOMEL; OTRANTO, 2012; JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Os carrapatos utilizados neste estudo pertencem a família Ixodidae. Algumas espécies dessa família possuem o ciclo de vida de um hospedeiro, também chamado de monoxeno, no qual os ectoparasitas realizam o seu ciclo evolutivo em apenas um hospedeiro, ou seja, permanecem no hospedeiro durante todo o ciclo parasítico. No ciclo de vida de dois hospedeiros, o carrapato infesta o primeiro hospedeiro onde ocorre a muda de larva para

ninfa. A ninfa se destaca do indivíduo após a alimentação de sangue e se transformará em adulto que irá se alimentar em um segundo hospedeiro para completar seu ciclo parasitário. Já o ciclo de vida de três hospedeiros, que é realizado pela maioria das espécies pertencentes a família Ixodidae, é caracterizado pela larva ingurgitada que se destaca do hospedeiro, transforma-se em ninfa no ambiente, e procura por outro hospedeiro, após a alimentação se destacam ingurgitadas e se tornam fêmeas adultas, finalizando seu ciclo de vida em um terceiro hospedeiro (Figura 1) (NAVA *et al.*, 2017; ROBERT; DEBBOUN, 2020).

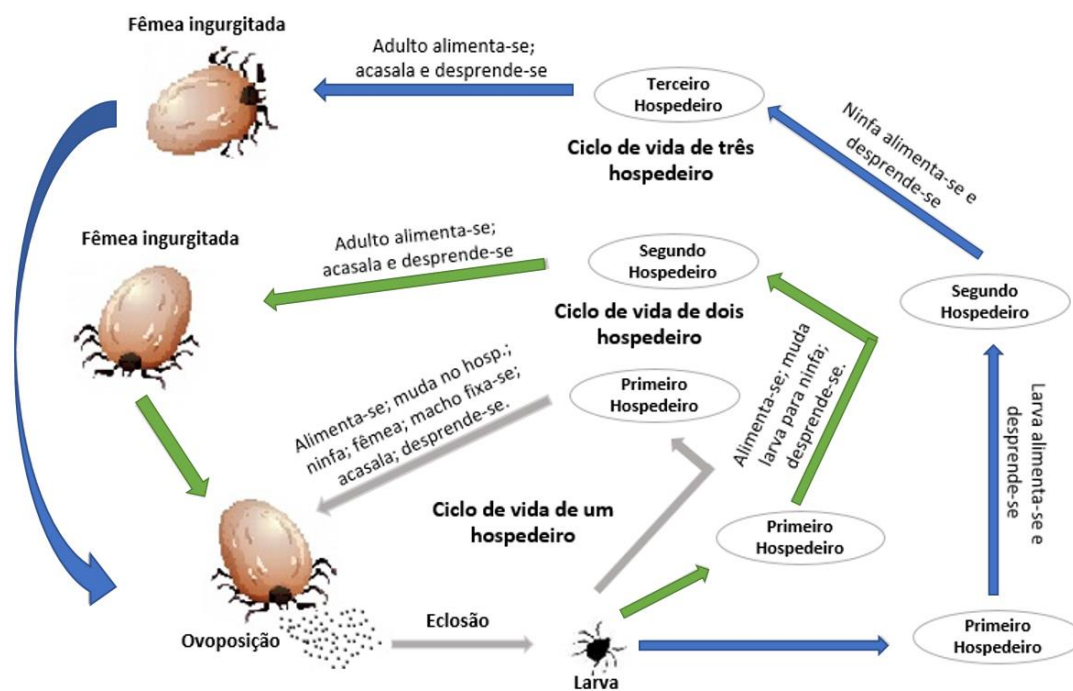


Figura 1: Três ciclos básicos de carrapatos Ixodidae: ciclo de vida de um, dois ou três hospedeiros. Adaptado: NICHOLSON *et al.*, 2019.

Esses artrópodes podem ser encontrados em diversas regiões do mundo, porém são mais comuns em regiões tropicais e subtropicais. A incidência de espécies varia de acordo

com a ecologia do local (DE LA FUENTE *et al.*, 2008). *Rhipicephalus microplus*, comumente chamado de carrapato-do-boi no Brasil (Figura 2), possuem ampla ocorrência na América do Sul, África e Oceania (ANDREOTTI; GARCIA; KOLLER, 2019; ADAKAL *et al.*, 2013; CUTULLÉ; JONSSON; SEDDON, 2009). É um carrapato monoxeno e seu principal hospedeiro é o bovino, mas pode parasitar, eventualmente, outros vertebrados como equinos e ovinos (ANDREOTTI; GARCIA; KOLLER, 2019). Esse carrapato é responsável pela transmissão agentes patogênicos como *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, causadores de um complexo de doenças chamado tristeza parasitária bovina (CAPELLI-PEIXOTO *et al.*, 2017; HUSSEIN *et al.*, 2019; MAIORANO *et al.*, 2019).



Figura 2: Fêmea do carrapato *Rhipicephalus microplus*. Fonte: XAVIER (2018), imagem cedida pela autora.

Haemaphysalis longicornis (Figura 3) está distribuído em países do leste da Ásia e Austrália (WANG *et al.*, 2019). É um carrapato de três hospedeiros e parasita animais selvagens, animais domésticos e até o homem. Esse ectoparasita transmite uma grande diversidade de microrganismos patogênicos, como *Theileria* spp., causador de teileriose (HAMMER *et al.*, 2015), flebovírus SFTSV, causador de febre severa com síndrome da trombocitopenia (SFTS) (LUO *et al.*, 2015) e também *Rickettsia japonica*, causador da febre maculosa japonesa (JSF) (TABARA *et al.*, 2011).



Figura 3: Carrapato da espécie *Haemaphysalis longicornis*. A esquerda uma ninfa e a direita uma fêmea adulta. Fonte: GATHANY (2018) CDC ID#22871.

Amblyomma variegatum (Figura 4) é um carrapato de três hospedeiros que parasita principalmente bovinos, mas também infestam ruminantes menores como cabras e ovelhas. É um artrópode de grande importância veterinária na África Ocidental (MANDARA, 2018), além de ser vetor do patógeno *Erilichia ruminantium*, o agente da coudriose (CANGI *et al.*, 2017). Sua saliva causa o desenvolvimento de uma doença bacteriana na pele dos animais, a dermatofilose aguda grave (NDHLOVU; MASIKA, 2014).



Figura 4: Imagem do macho de *Amblyomma variegatum* visto dorsalmente. Fonte: WALKER (2011) CC BY-AS 3.0.

Rhipicephalus decoloratus, também chamado carrapato azul africano (Figura 5) (HORAK *et al.*, 2018), é um carrapato de um hospedeiro presente na região da África Austral. Ele parasita bovinos, ovelhas, equinos e cabras (CHOUDHURY; BOSHE, 2013; SUNGIRAI *et al.*, 2018). Responsável pela transmissão de protozoários como *Babesia* spp. e riquetsias como *Anaplasma* spp.



Figura 5: Carrapatos da espécie *Rhipicephalus decoloratus*, macho à esquerda e fêmea à direita. Adaptado: ANIPEDIA, (2018) CC BY-NC 4.0.

Rhipicephalus appendiculatus (Figura 6) é o principal vetor de *Theileria parva*, o agente causador de teileriose bovina, também conhecida como Febre da costa leste da África que causa prejuízos ao setor pecuário (OLDS; MASON; SCOLES, 2018). É um ectoparasito de três hospedeiros e está amplamente distribuído em todo leste, centro e sul da África (LETA; DE CLERCQ; MADDER, 2013).



Figura 6: Carrapatos da espécie *Rhipicephalus appendiculatus* fêmea (esquerda) macho (direita). Fonte: DAKTARIDUDU, (2016). CC BY-SA 4.0.

1.2 Impactos econômicos causados pelos carrapatos

Os carrapatos são os principais agentes transmissores de patógenos causadores de doenças infecciosas a humanos e animais, juntamente com os mosquitos, afetando significativamente a economia pecuária bovina dos países onde estão presente (SONENSHINE; ROE, 2013). Cerca de 80% das populações de bovino no mundo correm risco de infestações por carrapatos (FAO, 2004). O impacto econômico do carrapato na indústria pecuária pode ser avaliado através do impacto decorrente da morbidade e mortalidade dos bovinos e as perdas de produção, assim com os custos para controle do parasito e das doenças causadas pelos parasitos transmitidos (GACHOHI *et al.*, 2012).

Na Austrália, os efeitos estimado da perda de peso de bovinos por cada fêmea de *R. microplus* foi 1,37g (JONSSON, 2006). Um estudo no México indicou um impacto anual de U\$ 573,61 milhões causado pelo parasitismo de *R. microplus* baseando-se em potenciais perdas de leite e carne (RODRÍGUEZ -VIVAS *et al.*, 2017). Outro estudo também no

México reportou um custo médio anual da estratégia de controle químico por animal em 408,29 pesos mexicanos. Sendo a perda potencial calculada em 12.248,7 milhões de pesos mexicanos devido ao controle químico usado para evitar *R. microplus* (DOMÍNGUEZ GARCÍA; TORRES AGATÓN; ROSARIO-CRUZ, 2016).

No Brasil, um estudo realizado em Minas Gerais, observou em um rebanho com 74 vacas, que o parasitismo causou um decréscimo de 90,24 L por vaca em lactação, em um ano (RODRIGUES; LEITE, 2013). Em todo o País considerando o número de cabeças de gado e as perdas econômicas potenciais causadas pelo carrapato-boi foi estimado uma perda de 3,4 bilhões de dólares anualmente (GRISI *et al.*, 2014).

1.3 Métodos de Controle

1.3.1 Controle biológico e imunológico

Controle biológico consiste no uso de organismos vivos que são capazes de suprimir a densidade populacional de espécies consideradas pragas (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004). Inimigos naturais do carrapato incluem aves (HORNOK *et al.*, 2016), vespas parasitoides (COLLATZ *et al.*, 2010), nematódeos (SAMISH; GLAZER, 2001), bactéria *Bacillus thuringiensis* (FERNÁNDEZ-RUVALCABA *et al.*, 2010) e, o mais utilizado como agente de biocontrole, o fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* (WASSERMANN *et al.*, 2016). Esse método de controle é atrativo devido ao aumento da preocupação com a segurança ambiental e também ao aumento da resistência dos carrapatos aos acaricidas, mas há a necessidade de mais estudos. Em geral, os predadores naturais de carrapato possuem uma capacidade limitada para serem utilizados como estratégia controle (SAMISH; GINSBERG; GLAZER, 2004).

O controle imunológico, com o uso de vacinas contra os carrapatos, é um método alternativo. Uma glicoproteína protetiva de *R. microplus*, denominada de Bm86, descoberta na década de 80, foi utilizada como base para duas vacinas: TickGARD[®], desenvolvida na Austrália e GAVAC[®], desenvolvida em Cuba (WILLADSEN, 2008; WILLADSEN; KEMP, 1988). Atualmente, a vacina GAVAC[®] é a única disponível comercialmente contra carrapato (SCHETTERS *et al.*, 2016), no entanto a variabilidade existente na sequência de aminoácidos de Bm86 resultou em uma vacina que apresenta uma variação de eficácia, dependendo da população de carrapato, condição nutricional do hospedeiro e da região geográfica onde a vacina foi testada. Como demonstrado por De La Fuente (1999), a eficácia da vacina GAVAC[®] contra *R. microplus* testada em diferentes locais (Brasil, Cuba, Argentina e México) variou de 51 a 91%. Devido a esses fatores e a necessidade de mais de uma dose em um ano, o uso desse antígeno é limitado, o que dificulta sua utilização como método alternativo no controle do carrapato. Assim, para o desenvolvimento de novas vacinas eficazes contra carrapato, é necessário identificar antígenos adequados, embora esse processo possa ser longo, complicado e muitas vezes, economicamente inviável (LANKENAU, 2016; MERINO *et al.*, 2013).

1.3.2 Controle químico

No final do século XIX estratégias baseadas no uso de químicos foram desenvolvidas para auxiliar no controle de parasitos agrícolas e até hoje continuam sendo o método mais usado para reduzir a população de carrapatos e impedir sua multiplicação. No entanto o uso de acaricidas resultada na seleção de populações de carrapatos resistentes (KLAFKE *et al.*, 2017; MUYOBELA *et al.*, 2015; VUDRIKO *et al.*, 2016).

Os primeiros tratamentos eficazes contra a infestação por carrapatos se deram através do uso de produtos rudimentares como substâncias oleosas, combinação de banha e enxofre ou banha e querosene e emulsão de querosene 10%. Essas misturas eram aplicadas duas ou três vezes por semana nos locais mais afetados nos bovinos (FRANCIS; CURTICE, 1892).

Mas o uso de acaricidas iniciou-se em 1896 quando foi relatado uma formulação de arsênico utilizada para imersão de gado na Austrália, conhecida como “Queensland Dip” que foi importante para o controle do parasita. Por mais de meio século, os compostos arsenicais continuaram sendo a base dos esforços para erradicar os carrapatos, mas com o uso dessa formulação populações de carrapatos resistentes ao arsênico foram selecionadas (ANGUS, 1996).

Novos produtos químicos foram desenvolvidos para fornecer alternativas para os compostos que se tornaram ineficazes e assim os arsênicos foram substituídos por hidrocarbonetos clorados (GRAHAM; HOURRIGAN, 1977). Mas devido à alta toxicidade desses compostos, os organofosforados foram introduzidos por volta de 1950 (SHANAHAN; HART, 1966). Com o tempo, outros produtos foram sendo disponibilizados para o controle do carrapato como piretróides sintéticos e compostos com amidina (GEORGE, 2006; KUNZ; KEMP, 1994).

Atualmente, seis principais classes de acaricidas são utilizados e incluem preparações com compostos organofosforado (ex. clorpirifós, clorfenvinfós), carbamatos (ex. carbaryl), formamidinas (ex. amitraz), piretróides (ex. cipermetrina), lactonas macrocíclicas (ex. ivermectina), fenolpirazoles (ex. fipronil) e benzoilfeniluréia (ex. fluazuron) (NICHOLSON *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-VIVAS *et al.*, 2014).

1.3.2.1 Resistência aos acaricidas

Os carrapatos que afetam bovinos têm mostrado uma resistência detectável a maioria dos compostos disponíveis comercialmente, prejudicando os produtores de bovinos (RODRÍGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). A definição de resistência desenvolvida pela World Health Organization Scientific Group (1965) foi de: “a capacidade de uma cepa do parasito sobreviver e/ou se multiplicar apesar da administração e absorção de um medicamento administrado em doses iguais ou superiores às geralmente recomendado, mas dentro dos limites de tolerância do sujeito”.

Alguns carrapatos pertencentes a uma certa população podem sobreviver após o uso de um acaricida químico e serem selecionados. A resistência não é uma adaptação que se desenvolve devido a exposição contínua ao acaricidas, mas ela se amplia entre a população devido a remoção dos indivíduos suscetíveis e o favorecimento de carrapatos com genótipos resistentes (ABBAS *et al.*, 2014).

Os bioensaios de identificação de populações de ectoparasitas resistentes permitem um diagnóstico confiável e capaz de padronizações em laboratórios, além de serem simples e baratos (FAO, 2004). Dois principais testes *in vitro* são utilizados com frequência em laboratórios de diagnóstico de resistência: o teste de pacote de larva (TPL) (FAO, 1984) e o teste de imersão de adultos (TIA) (DRUMMOND *et al.*, 1973).

Para verificação do nível de suscetibilidade dos carrapatos adultos é utilizado o ensaio de teste de imersão de adultos que são imersos em princípios ativos e acaricidas comerciais em uma única dose discriminante (KOLLER *et al.*, 2009), no qual são comparadas com a mortalidade dos carrapatos controle (não tratados). Após avalia-se também a fecundidade e fertilidade resultante do tratamento (ABBAS *et al.*, 2014).

O teste do pacote de larvas é baseado na exposição de larvas de carrapatos a papéis filtros que são impregnados com o acaricida químico e a mortalidade ou incapacidade das larvas de andar é quantificada após 24h, resultando no diagnóstico da resistência (ABBAS *et al.*, 2014). Entretanto esses testes não são sensíveis o suficiente para identificar a resistência durante os estágios iniciais e também não proporcionam conhecimentos sobre os mecanismos genéticos envolvidos no desenvolvimento da resistência (ABBAS *et al.*, 2014).

É necessário identificar e desenvolver novos compostos químicos de forma rápida e precisa, para limitar a dependência de produtos associados ao controle químico; entretanto novos compostos não são ofertados na mesma velocidade com que a resistência se consolida nas populações (VERÍSSIMO, 2015).

A identificação de populações resistentes também pode ser feita através da identificação de potenciais marcadores genéticos associados a resistência. O conhecimento adquirido pode ser útil para o estabelecimento de medidas para reduzir o desenvolvimento e dispersão de populações resistentes (NICHOLSON *et al.*, 2019)

Diversos mecanismos podem causar a resistência de carrapatos aos acaricidas (Figura 7), mas dois, em especial, foram bem estudados: a insensibilidade ao sítio alvo e a resistência metabólica, porém o papel de outros mecanismos como a resistência cuticular também já foi descrito. A modificação cuticular é ocasionada pela penetração mais lenta do acaricida, devido ao espessamento da cutícula, reduzindo a concentração de produto no interior do carrapato (COLES; DRYDEN, 2014).

A insensibilidade do sítio alvo ocorre quando a mudança de nucleotídeos no gene resulta na substituição de aminoácidos conferindo menor afinidade a ligação dos acaricidas. Essas mutações são chamadas de mutações *kdr* (*knock-down resistance*) (COLES; DRYDEN, 2014; KUMAR; KLAFKE; MILLER, 2020; NKYA *et al.*, 2013).

A resistência metabólica está relacionada com o sistema de detoxificação dos organismos que levam a metabolização de moléculas tóxicas, como acaricidas. Esse método consiste em elevar o nível ou aumentar a atividade de enzimas detoxificadoras, resultando em moléculas de acaricidas sendo metabolizadas antes de atingir seu sítio de ação (FEYEREISEN; DERMAUW; VAN LEEUWEN, 2015; NKYA *et al.*, 2013; RODRÍGUEZ-VIVAS; JONSSON; BHUSHAN, 2018). Enzimas detoxificantes como citocromos P450, esterases e glutatona S-transferases (GST) são algumas das responsáveis pela metabolização de compostos (LE GALL; KLAFKE; TORRES, 2018).

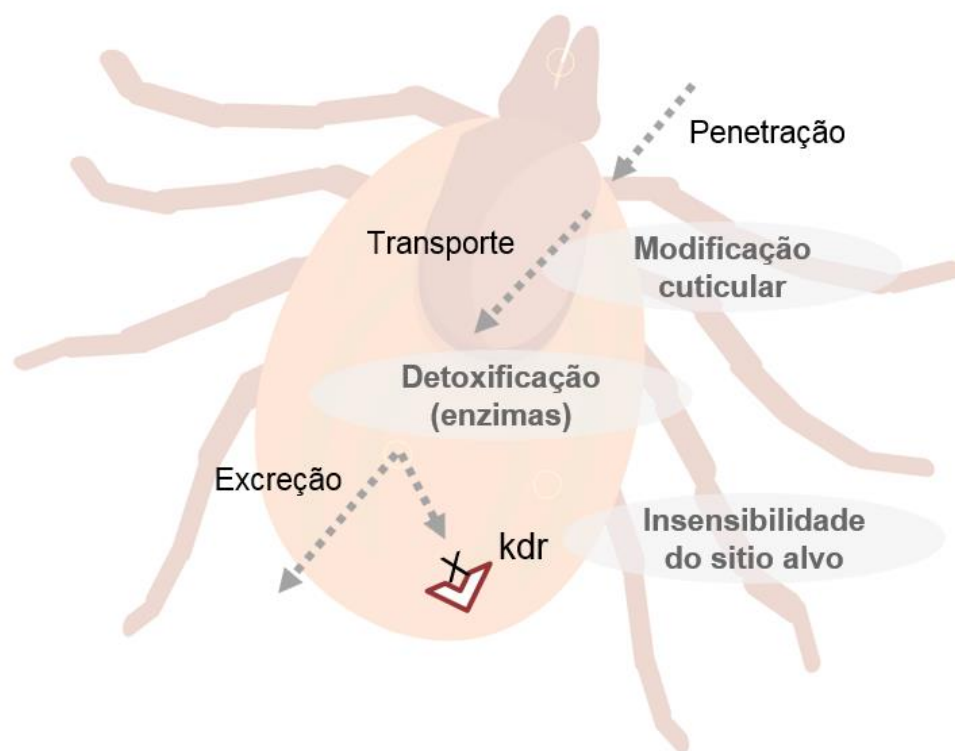


Figura 7: Os três principais mecanismos associados a resistência a acaricidas nos carrapatos: modificação cuticular, mutações kdr (*knock-down resistance*) e detoxificação enzimática. Adaptado: NKYA *et al.* (2013).

1.4 Glutathione S-transferase

Os carrapatos se adaptaram ao estilo de vida hematófago no qual estão naturalmente expostos a moléculas tóxicas exógenas e endógenas. Devido a isso, os ectoparasitos desenvolveram uma série de defesas enzimáticas que permitiram lidar com os desafios tóxicos. Esses mecanismos auxiliam tanto na manutenção da homeostase fisiológica do parasito para evitar os danos oxidativos gerados por espécies reativas de oxigênio (EROs), muitas vezes ocasionados pela ingesta de sangue, como também auxiliam o parasito a lidar com o crescente uso de acaricidas (FREITAS *et al.*, 2007; GALAY *et al.*, 2015; OAKLEY, 2011).

As glutathione S-transferases (E.C. 2.5.1.18) compõem uma família de enzimas detoxificadoras com papel chave na fase II do processo de biotransformação na qual catalisam a conjugação de uma ampla variedade de compostos eletrofílicos reativos ao átomo de enxofre nucleofílico do grupamento tiol do tripeptídeo glutathione (GSH) quando na forma reduzida (Figura 8). Os compostos resultantes dessa biotransformação são mais hidrossolúveis e conseqüentemente mais facilmente excretados da célula (ALLOCATI *et al.*, 2012; OAKLEY, 2011; SHAHEIN; ABOUELELLA; HAME, 2013; TOWNSEND; TEW, 2003; WU; DONG, 2012).

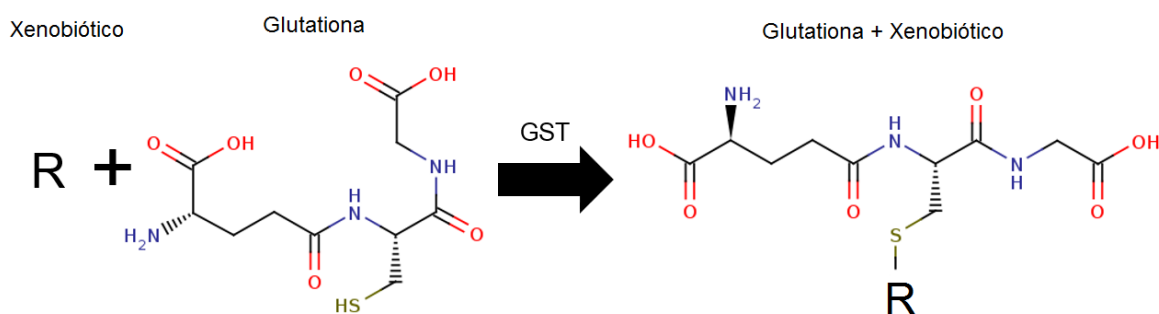


Figura 8: Catálise da adição da glutathiona a um xenobiótico genérico (R) após a ação da enzima glutathiona S-transferase (GST). Adaptado: BRENDA (2020).

As GST estão presentes em organismos eucarióticos e procarióticos. Em eucariotos as GST estão divididas em três grupos principais com base na localização celular: microsomal, citosólico e mitocondrial. Essas enzimas compreendem uma superfamília enzimática complexa subdividida em um número cada vez maior de classes definidas com base em suas propriedades físicas, químicas e biológicas (ALLOCATI *et al.*, 2012; OAKLEY, 2011; SHEEHAN *et al.*, 2001). GST presentes em mamíferos (principalmente humanos, ratos e camundongos) foram caracterizadas e classificadas de acordo com a estrutura primária (Figura 9). Enzimas pertencentes a mesma classe compartilham 40% ou mais de identidade na sequência de aminoácidos. Entre classes diferentes as enzimas têm menos de 25% de identidade. Sete principais classes citosólicas foram reconhecidas: alfa, mu, pi, teta, zeta, ômega e sigma (WU; DONG, 2012). Em insetos a classe épsilon foi identificada (DING *et al.*, 2003) e nas plantas estão presentes as classe phi e tau (DIXON; LAPHORN; EDWARDS, 2002). As GST mitocondriais são denominadas kappa, e as microsomais, conhecidas como MAPEG (proteínas associadas à membrana envolvidas no metabolismo dos eicosanóides e da glutathiona), são proteínas integrais da membrana que não são evolutivamente relacionadas às outras classes principais (ALLOCATI *et al.*, 2018).

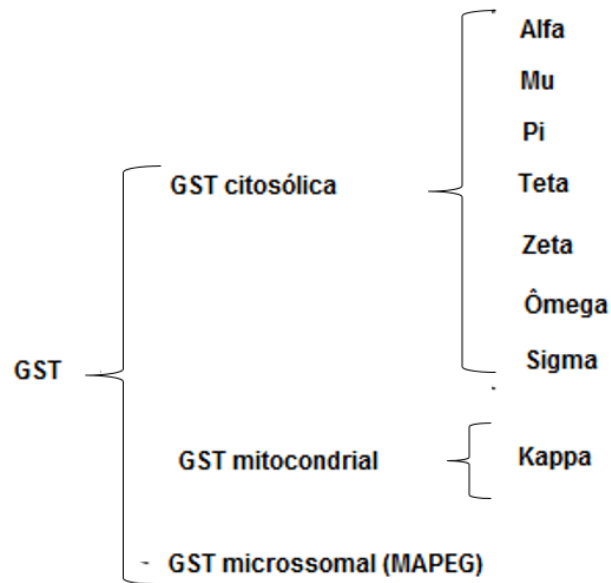


Figura 9: Classificação das GST humanas: citosólicas (alfa, mu, pi, teta, zeta, ômega, sigma), mitocondriais (kappa) e microsomal. Adaptado: WU; DONG, 2012

As GST citosólicas formam dímeros compostos de subunidades idênticas ou estruturalmente relacionadas. Cada subunidade tem uma massa molecular de cerca de 25 kDa. Dois domínios distintos são reconhecidos em cada monômero de GST, cada um contendo dois sítios de ligação, um sítio G altamente conservado presente no N-terminal da proteína que se liga ao tripeptídeo glutationa, e um sítio H, divergente presente no C-terminal, local de ligação ao substrato hidrofóbico. A grande variabilidade dos co-substratos de GST reflete-se nas diferentes formas dos sítios H permitindo que as GST reajam com uma grande variedade de substratos (ALLOCATI *et al.*, 2018; DANIELSON; MANNERVIK, 1985).

1.4.1 Metabolismo de xenobióticos

A principal função da enzima é metabolizar e detoxificar produtos químicos eletrofilicos, incluindo drogas, agentes cancerígenos ambientais e produtos do estresse oxidativo, tornando-os mais predispostos a eliminação pela célula. Isso ocorre durante o processo de biotransformação que é subdividido em três fases: fase I, II e III.

Compostos tóxicos ao entrar nas células podem ser alvo de enzimas chamadas de enzima do metabolismo da Fase I, como citocromo P450, que catalisam diversas reações como hidroxilação, oxidação e redução. Subsequentemente, os xenobióticos modificados na fase II serão conjugados com GSH pelas GST que realizam o principal papel dessa fase. Essa reação resulta em um produto mais hidrossolúvel que será transportado por bombas de efluxo transmembranar para fora da célula, sendo esse o processo de fase III (Figura 11) (ALLOCATI *et al.*, 2018).

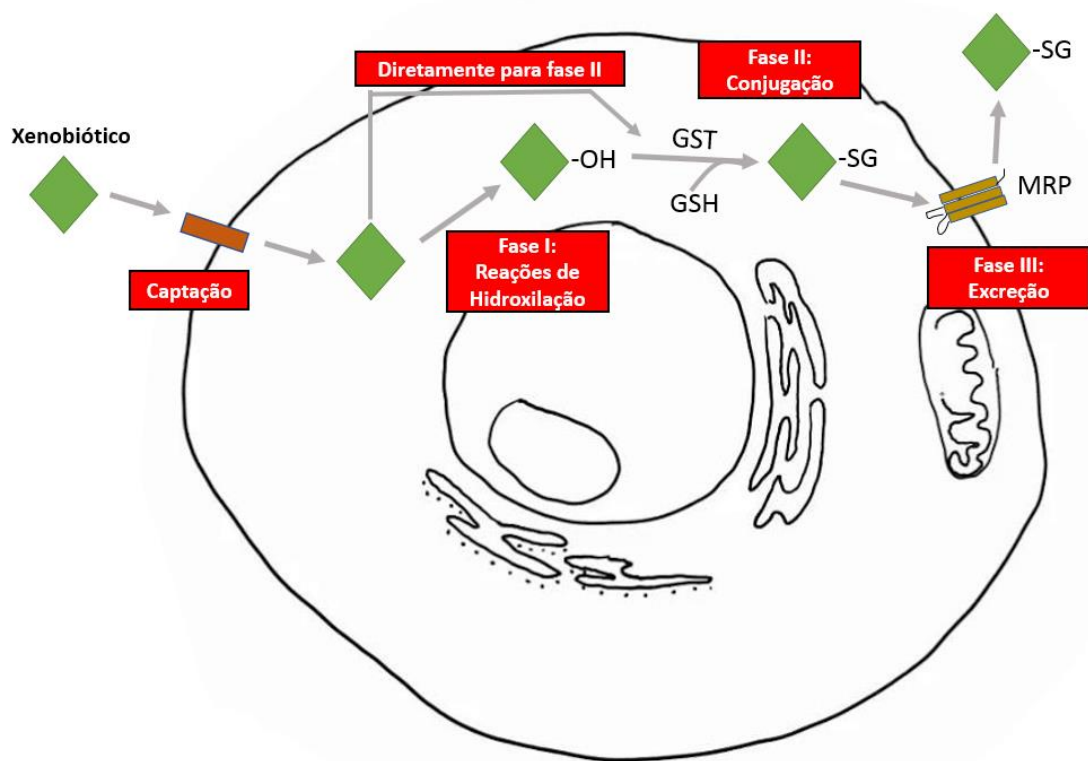


Figura 10: Visão geral da biotransformação de xenobióticos na célula.

Adaptado: ALLOCATI *et al.* (2018).

As GST têm sido relacionadas ao desenvolvimento de resistência aos acaricidas e, portanto, não é surpreendente que altos níveis de GST serem relatados em populações de carrapato resistentes (HERNANDEZ *et al.*, 2018). Uma enzima GST de *Rhipicephalus sanguineus* foi selecionada para estudos com RNA de interferência (RNAi) que foi sintetizado e depois injetado em fêmeas de carrapato. Grupos de carrapatos silenciados foram expostos por 12h a diferentes doses de permetrina. Subseqüentemente, as fêmeas foram postas para se alimentar em ovelhas. Os carrapatos fêmeas submetidos ao silenciamento por RNAi se mostraram mais suscetíveis a intoxicação por permetrina do que os controles não tratados (DUSCHER *et al.*, 2014).

R. microplus resistentes a piretróides sintéticos (PS) e organosfosfatos (OP) foram coletados na Índia para analisar o perfil enzimático de GST. Esse perfil apresentou atividades enzimáticas elevadas de GST, se comparado com os carrapatos suscetíveis (CHIGURE *et al.*, 2018). Uma população de fêmeas adultas de *Rhipicephalus annulatus*, totalmente ingurgitadas, chamada AM-29, foi coletada em bovinos no Irã e monitoradas para definir seu *status* de suscetibilidade aos acaricidas cipermetrina e λ -cialotrina. 53,57% dessa população foi resistente ao tratamento com cipermetrina e 17,86% foram resistentes a λ -cialotrina. Essa população demonstrou uma elevação de 2,39 vezes na atividade de GST em relação a população suscetível de referência (GM-3) (ZIAPOUR *et al.*, 2017).

Em outros artrópodes também foi demonstrada a associação da enzima GST com resistência. O tratamento com alguns produtos químicos como β -cipermetrina, isoprocarb, sulfoxaflor e malation foram realizados no hemiptera *Rhopalosiphum padi* e os níveis de mRNA de GST da classe ômega foram mensurados. O nível de transcrição da GST foi maior quando ocorreu a exposição a β -cipermetrina, isoprocarb e malation com uma dose de LC50 após 12h. Mas com sulfoxaflor o nível de expressão foi maior quando a dose de exposição foi de LC25 do que LC50 (BALAKRISHNAN *et al.*, 2018).

Um estudo com *Sarcoptes scabiei* analisou o nível de transcrição de seis genes de GST (μ 1, μ 2, μ 3, δ 1, δ 2, δ 3) em cepas resistentes a permetrina. Observou-se que a transcrição dos genes GST μ 1, GST δ 2 e GST δ 3 foram reguladas positivamente em cepas resistentes a permetrina, se comparando com cepas suscetíveis. Enzimas recombinantes das seis GST foram expressas e a análise de “*molecular docking*” sugeriu que todas as enzimas, exceto GST μ 3, poderiam se ligar e metabolizar permetrina (MOUNSEY *et al.*, 2010).

1.4.2 Inibidores de GST como potenciais parasiticidas

A importância das propriedades funcionais da GST na biotransformação de compostos tóxicos leva essas enzimas a serem consideradas um potencial alvo terapêutico para novas drogas acaricidas. Com o aumento do conhecimento sobre a estrutura e função das GST, inibidores foram projetados para inativar o efeito de detoxicação desta enzima e promover uma maior eficácia dos acaricidas (ALLOCATI *et al.*, 2018; MATHEW; KALYANASUNDARAM; BALARAMAN, 2006).

A supressão da atividade de uma enzima pode ser causada pela ligação de um inibidor a molécula enzimática, resultando no impedimento da reação catalítica. Os inibidores funcionam bloqueando ou distorcendo o sítio ativo enzimático e também podem funcionar esgotando o cofator GSH (GOMES; ROCHA-SANTOS, 2019; LOPINA, 2017; ROBERTS; GIBB, 2013).

Uma variedade de inibidores de GST já foram investigados por modular a resistência a medicamentos em células tumorais humanas. Um inibidor comum de GST é o ácido etacrílico (EA) que se liga diretamente ao sítio de ligação da enzima ao substrato, e também esgota o cofator através da ligação covalente ao GSH formando o complexo GSH-EA (Figura 12). No entanto, essa molécula apresenta fortes propriedades diuréticas e não é adequada para uso clínico. Novos derivados de EA foram projetados e os novos testes mostram eficientes atividades antiproliferativas contra células cancerígenas humanas (MIGNANI *et al.*, 2016).

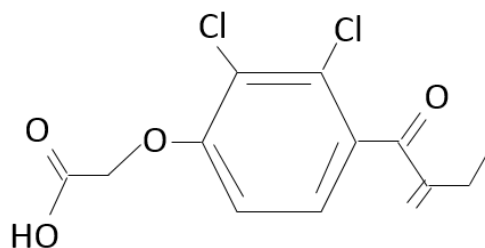


Figura 11: Estrutura química do Ácido Etacrílico. Adaptado: MIGNANI *et al.* (2016).

Outro inibidor utilizado é a etacraplatina, que foi desenvolvida para contornar a resistência a cisplatina mediada pela GST. Esse composto pode inibir a atividade da GST irreversivelmente na célula e aumentar o acúmulo de cisplatina. Um novo estudo mostrou que etacraplatina encapsulada aumentou a eficácia em células resistentes a platina (LI *et al.*, 2017).

No carrapato *R. annulatus* foi realizado um estudo com o objetivo de avaliar a atividade da GST sob efeito *in vitro* do ácido tânico, hematina e diferentes extratos vegetais (ricos em ácido tânico). Para isso, um *screening* de inibição foi realizado e o valor de IC50 determinado. O ácido tânico foi o inibidor mais eficaz da rRaGST com IC50 de 4,57 μM . A hematina mostrou um efeito considerável de inibição, com IC50 de 7,5 μM . Os dois compostos – ácido tânico e hematina – inibiram a atividade da enzima de forma competitiva em relação ao CDNB (GUNEIDY *et al.*, 2014).

Foi descrito a presença da enzima GST em diferentes espécies de *Plasmodium* (SRIVASTAVA *et al.*, 1999). A inibição da atividade da GST com hemina – produto da oxidação do heme – potencializou o acúmulo de metabólitos antimaláricos, como a cloroquina. Nesse estudo, foi observado uma inibição completa das atividades de GST nas concentrações de 2,5 μM e 5 μM .

Um estudo *in silico* da GST de *Brugia malayi* foi realizado a fim de obter possíveis interações antifilárias através de uma simulação de acoplamento com dietilcarbamazina, albendazol, hidroxianisol butilado e chalconas (antifilárias disponíveis). Albendazol e a chalcona apresentaram a menor energia de ligação e o sítio de interação próximo ao sítio de ligação ao substrato. Assim, o mapeamento do sítio de ligação destes compostos a GST pode auxiliar na triagem e *design* de novos medicamentos antifilariose (YADAV *et al.*, 2010).

2 Objetivo

Analisar *in vitro* o efeito de compostos sintéticos sobre a atividade da enzima GST de cinco diferentes espécies de carrapato: *Rhipicephalus microplus* (RmGST), *Haemaphysalis longicornis* (HIGST), *Amblyomma variegatum* (AvGST), *Rhipicephalus decoloratus* (RdGST) e *Rhipicephalus appendiculatus* (RaGST).

Os objetivos específicos:

- Expressar as GST de forma recombinante em sistema heterólogo usando *Escherichia coli*;
- Purificar as enzimas GST recombinantes;
- Determinar a atividade enzimática das proteínas com CDNB e DCNB;
- Testar o efeito de um painel de 60 moléculas sintéticas sobre rRmGST;
- Testar o efeito das moléculas selecionadas sobre rAvGST, rHIGST, rRaGST e rRdGST.

3 Resultados

Novel tick glutathione S-transferase (GST) inhibitors as promising acaricidal compounds

Manuscrito em redação

Katiussa Paula Cover Ozelame, Lucas Andre Dedavid e Silva, Charles Ndawula, Guzmán Alvarez e Itabajara da Silva Vaz Junior.

Projeção do experimento: K.P.C.O, L. A. D. S, I.S.V.J

Execução do experimento: K.P.C.O, L. A. D. S, C.N.

Contribuição com reagentes/materiais/ferramentas de análise: I.S.V.J e G.A

Escrita do artigo: K.P.C.O e I.S.V.J

Revisão do artigo: K.P.C.O, I.S.V.K e G.A

Title:

Novel tick glutathione S-transferase (GST) inhibitors as promising acaricidal compounds

Ozelame, K.P.C^a; Silva, L. A. D.^a; Ndawula, C.^a; Alvarez, G.F.^c; da Silva Vaz Jr., I.^{a,b*}

^aCentro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^bFaculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil;

^cLaboratorio de Moléculas Bioactivas - CENUR Litoral Norte, Universidad de la República, Paysandú 60000, Uruguay;

* Corresponding author. Tel.: +55 51 3308 6078.

E-mail address: itabajara.vaz@ufrgs.br (I. da Silva Vaz Jr) and guzmanalvarezlqo@gmail.com (G. Alvarez)

Abstract

Ticks are important ectoparasites of worldwide distribution. The most commonly used method for tick control involves the use of synthetic acaricides. The main problem is that the use of acaricides has led to selection of resistant populations. Resistance may be the result of increased acaricide biodegradation due detoxifying enzyme activities. Glutathione S-transferases (GST) are enzymes that play an important role in the detoxification of several types of compounds used in commercial products. This work aims to find new bioactive molecules through *in vitro* assays with a panel of 60 molecules with putative inhibitory activity on the GST enzyme of five tick species: *Rhipicephalus appendiculatus* (RaGST), *Rhipicephalus decoloratus* (RdGST), *Amblyomma variegatum* (AvGST), *Rhipicephalus microplus* (RmGST) and *Haemaphysalis longicornis* (HIGST). Purified recombinant GSTs were tested for activity with substrates CDNB (1,2-dichloro-4-nitrobenzene) e DCNB (3,4-dichloronitrobenzene) in presence of glutathione co-substrate. rRmGST was used for the initial screening assay against molecules. Compounds that inhibited activity in more than 50%, were chosen for further assays *in vitro* with rAvGST, rHIGST, rRdGST and rRaGST. Recombinant GSTs have a predicted molecular weight of 25 kDa and showed activity against CDNB, but not against DCNB. Compound 795 inhibited activity of 58,1% of rRmGST, 27.8% of rAvGST, 23.9% of rRdGST, 2.3% of rHIGST and 31.9% of rRaGST. The compound 1258 inhibited activity of 59.4% de rRmGST, 6.2% of rAvGST, 24.3% of rHIGST, 1.9% of rRdGST and 100% of rRaGST. This study showed a group of molecules with potential acaricidal activity, but it is still necessary to evaluate the effects of these compounds *in vitro* and *in vivo* tests with ticks.

Key-words: ticks; GST; inhibitors; acaricidal activity.

1. Introduction

Ticks are hematophagous ectoparasites of great veterinary importance that could harm a variety of host species mainly the cattle. Their blood-feeding behavior can result in loss of weight and consequently, decrease in milk and meat production. Moreover, they could transmit infectious agents to the host that include viruses, bacteria and protozoa (Jongejan and Uilenberg, 2004; Léger et al., 2013).

Rhipicephalus microplus is the main vector of *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* and *Babesia bovis*. This tick is responsible for the greatest impact in South America, Africa and Oceania (Amorim et al., 2014; Bilhassi et al., 2014; Grisi et al., 2014; Adakal et al., 2013). *Haemaphysalis longicornis* originally from northeast Asia is responsible for the transmission of *Theileria* spp. that cause theileriosis (Fujisaki et al., 1985; Luo and Lu, 1997) *Amblyomma variegatum* is widely distributed in sub-Saharan Africa and transmits *Ehrlichia ruminantium* that cause cowdriosis (Beati et al., 2012). In southern and southeastern African countries, two ticks are found: *Rhipicephalus appendiculatus* that is the vector of *Theileria* spp. (Zachary; McGavin, 2017) and *Rhipicephalus decoloratus* that transmits *Anaplasma* spp. and *Babesia* spp. (AL-Hosary et al., 2018; Abbas et al., 2014).

Currently, the main method used for tick control is through the application of synthetic acaricides, but their use results in additional selective pressure (Zachary; McGavin, 2017). Acaricide resistance may be a consequence of three mechanisms: reduced penetration of the acaricide into the cuticle, reduced sensitivity at the site of action in the nervous system and enzymatic metabolism of the acaricide. Enzymatic detoxification occurs increases levels of enzymatic activity, resulting in more efficient detoxification of such acaricide (Al-Hosary et al., 2018). Tick resistance to various classes of acaricides has been reported in countries of

South America, Asia and Africa (Abbas et al., 2014; Enayati et al., 2010; Klafke et al., 2017; Rosario-Cruz et al., 2009).

Glutathione S-transferase (EC 2.5.1.18) is a superfamily of proteins involved in the detoxification process that catalyze the conjugation of reduced glutathione (GSH) with a broad variety of endogenous and exogenous electrophilic compounds, protecting the cell from oxidative damage (Allocati et al., 2018). Thus, glutathione S-transferase (GST) may favor parasite survival by neutralization of toxins. Overexpression of GST was associated with drug resistance (Rodriguez-Vivas et al., 2006; Vudriko et al., 2016). In ticks, several authors described the involvement of GST in the metabolism of endo and xenobiotic compounds through the increase of enzyme activity or transcription level of the GST gene (Freitas, 2008; Hernandez et al., 2018; Ziapour et al., 2017). These biological functions make GSTs attractive targets for new small molecules chemotherapies for a new acaricidal drug.

Enzyme inhibitors are molecules that modify the catalytic properties of enzymes, decreasing the catalytic activity or even stopping the catalysis during biochemical reaction (Balakrishnan et al., 2018; Roberts; Gibb, 2013). This work aims to find new bioactive molecules with putative acaricidal function, analyzing a panel of molecules with inhibitory activity on the GST enzyme of five economically important tick species: *Rhipicephalus microplus*, *Haemaphysalis longicornis*, *Amblyomma variegatum*, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Rhipicephalus decoloratus*. For this, in this work 60 synthetic molecules belong to an in-house chemo-library were tested for the GST inhibition potential using *in vitro* assays.

2. Materials and methods

2.1 Recombinant GST expression

Rhipicephalus microplus GST (RmGST), *Haemaphysalis longicornis* GST (HIGST), *Rhipicephalus decoloratus* GST (RdGST), *Amblyomma varigatum* GST (AvGST), *Rhipicephalus appendiculatus* GST (RaGST) full-length coding sequences were cloned in previous studies of our research group (Da Silva Vaz et al., 2004; Ndawula et al., 2019; Rosa de Lima et al., 2002).

Escherichia coli BL21 (DE3) and *E. coli* AD494 (DE3) were transformed with pET43a_AvGST, pET43a_HIGST, pET43a_RdGST plasmids and pET43a_RmGST, pET43a_RaGST plasmids, respectively. Transformation was performed using the heat shock method. The transformed cells were cultured during 12 hours, at 37°C in plates containing Luria Bertani agar media and ampicillin (50 µg.µL⁻¹). One colony was isolated and pre-inoculated during 16 hours in five mL LB media containing ampicillin (50 µg.µL⁻¹) and grow up under agitation at 37 °C. After, cells were inoculated in 500 mL of LB until to reach an optical density of 0.6 in the wave-length 600 nm. Afterwards, Proteins rAvGST, rHIGST, rRdGST were induced for six hours, while rRmGST and rRaGST were induced for 18 hours with addition of 1 mM isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside (IPTG) (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). The culture broth was centrifuged at 16,000 g for 10 min at 4 °C. The precipitated containing the cells was washed with PBS 7.2 and stored at – 20 °C.

2.2 Recombinant GST purification

The precipitated containing the cells was resuspended with PBS and lysed using an ultrasonic homogenizer with five cycles of 30 pulses for 30 s. The soluble proteins were separated from cell debris by centrifugation at 16,000 g for 10 min at 4 °C. Proteins were purified by affinity chromatography of glutathione using GSTrap 4B 1 mL (Ge Healthcare,

Chicago, USA). Initially, the column was equilibrated with binding buffer PBS pH 7.4. The sample was applied and washed with PBS pH 7.4, and to elute proteins 50 mM Tris-HCl 10 mM reduced glutathione pH 8 elution buffer was used. Samples of the supernatant and precipitate from the lysates were analysed by 14% SDS-PAGE (Laemmli, 1970). The quantification of the amount of purified protein in solution was performed using the spectrophotometer by UV absorption at 280 nm. Fractions containing protein were dialyzed with 100 mM Tris-HCl pH 7.4 for 12 h at 4 °C.

2.3 GST enzymatic activity

The purified recombinant GSTs enzymatic activity was determined using as substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) and 3,4-dichloronitrobenzene (DCNB) (Sigma-Aldrich) at 25 °C with VersaMax™ Microplate Reader, readings were performed during 30 min at intervals 15 s with wavelength 340 nm, based in the method described by Habig et al. (1974). Substrates CDNB 1 mM and DCNB 1 mM were diluted in methanol and added in the reaction containing buffer Tris-HCl 100 mM pH 7.4 and 3 mM reduced glutathione. Tests were performed in 96-well microplates with 1.6 µg of recombinant protein, in 100 µL of total volume. Negative control was performed using buffer, GSH and CDNB without enzyme. The factor used to obtain the concentration of the product formed was calculated from the extinction coefficient 10.9 mM cm⁻¹, correcting for the light path of the 96-well microplate.

2.4 *In vitro* Screening of molecules

The screening of synthetic molecules was performed using the same conditions of GST activity enzymatic tests described in 2.3. The compounds were selected from an in-house

library from the Universidad de la República (UdelaR). Some of these molecules were previously used to analyze the effect against the enzyme triosephosphate isomerase (TIM) of *R. microplus* (Saramago et al., 2018), TIM of *Fasciola hepatica* (Ferraro et al., 2020) and TIM of *Trypanosoma cruzi* (Álvarez et al., 2010).

Molecules belong to a chemical collection with a diversity of structures, classified in different families including Chalcones, Diarylideneketones, Thiazoles, Thiourea, Steroids, Thiadiazines, Miscellaneous and Hydrazine

The compounds were diluted in DMSO 100% (v/v) and used at DMSO 10% (v/v) Tris HCl 100 mM pH 7.5 solution. The inhibition assay was carried out in the presence of 100 μ M or absence of molecules, in triplicate with two repetitions. This concentration was defined as an arbitrary point to start studies. The molecules that inhibited rRmGST in more than 50% were considered active and further used against other recombinant enzymes rHIGST, rRaGST, rRdGST, and rAvGST.

3. Results

3.1 Expression of recombinant GSTs

Competent cells were transformed with their respective plasmids. The transformed colonies were expressed at 25 °C under a concentration of 1 mM Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Culture cells of BL21(DE3) were induced for 18 h, while cells AD494 (DE3) were induced for 6 h. Expression confirmation was made through analysis by SDS-PAGE 14% (data not shown).

3.2 Purification of recombinant GSTs

Proteins were purified with glutathione affinity chromatography. The fraction containing each protein was dialyzed and analyzed by 14% SDS-PAGE. The observed bands were compatible with predicted molecular mass, confirming the presence of the five rGSTs with 25 kDa (Fig. 1)

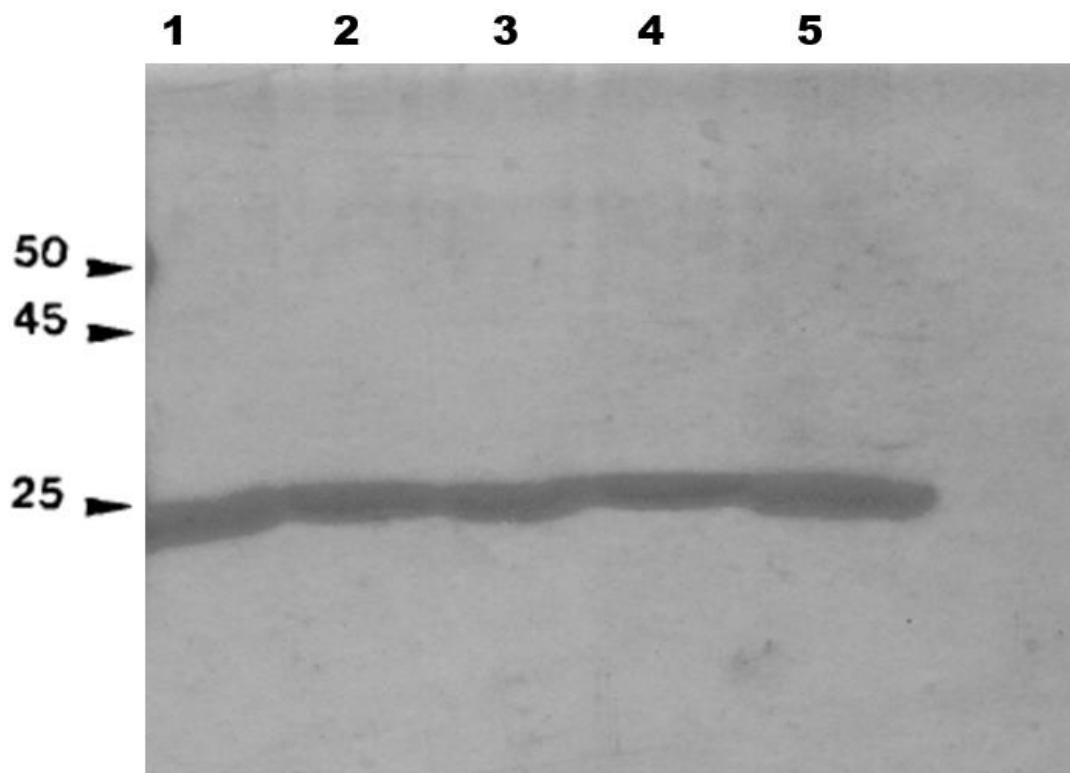


Figure 1: Purification analysis of GSTs by SDS-PAGE gel electrophoresis. Soluble proteins fractions were applied affinity chromatography GSTrap™ 4B. Estimated molecular weight 25 kDa. 1) GST of *Amblyomma variegatum* purified enzyme. 2) GST of *Haemaphysalis longicornis* purified enzyme. 3) GST of *Rhipicephalus decoloratus* purified enzyme. 4) GST of *Rhipicephalus microplus* purified enzyme. 5) GST of *Rhipicephalus appendiculatus* purified enzyme.

3.3 Enzymatic activity

Recombinant enzymes showed activity against CDNB (Fig. 2) but not against DCNB (data not show). The enzymatic activity of rAvGST, rHIGST, rRdGST, rRmGST and rRaGST was of 15.8, 12.9, 35.7, 43.2 and 50.1 nmol of product/ μ g protein, respectively.

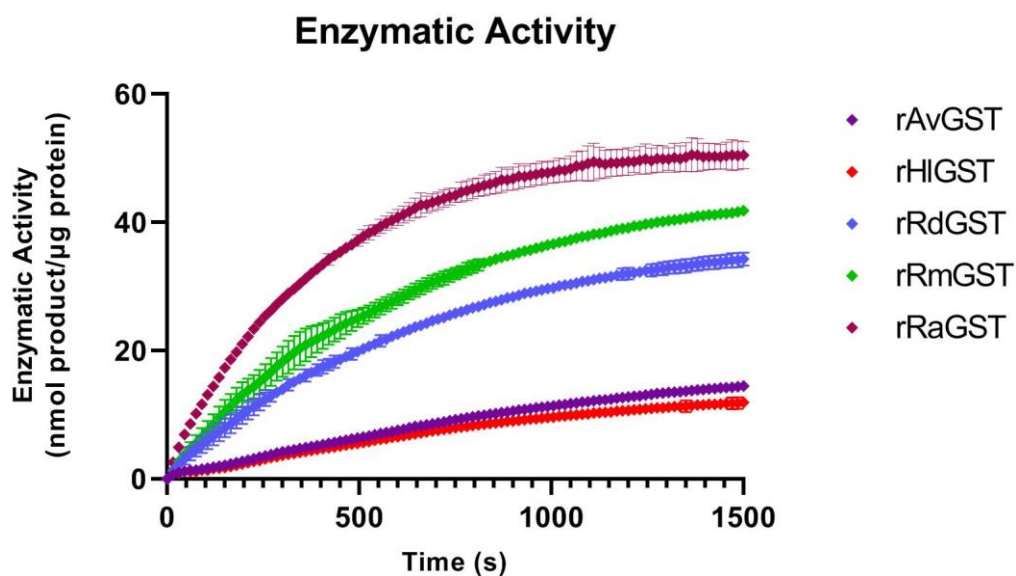


Figure 2: Enzymatic activity of recombinant GSTs of *Amblyomma variegatum* (rAvGST), GST of *Haemaphysalis longicornis* (rHIGST), GST of *Rhipicephalus decoloratus* (rRdGST), GST of *Rhipicephalus microplus* (rRmGST) and GST of *Rhipicephalus appendiculatus* (rRaGST) using CDNB as substrate and GSH as co-substrate. Absorbance was monitored at 340 nm in the presence of 1 mM CDNB, 3mM GSH and 1.6 μ g protein. The graphic represents three independent experiments. Error represent the standard deviation.

3.4 *In vitro* screening of synthetic molecules

Screening assays showed that of the 60 tested, 38 molecules did not showed any inhibitory activity against rRmGST. Twenty-two compounds were able to partially inhibit the rRmGST enzymatic activity (Fig. 3), but only two molecules were considered active, inhibiting 50% of rRmGST enzymatic action using CDNB as substrate, representing 3.3% of tested molecules. The two compounds, named 795 and 1258 inhibited 58.1% and 59.4% of the rRmGST enzymatic activity, respectively.

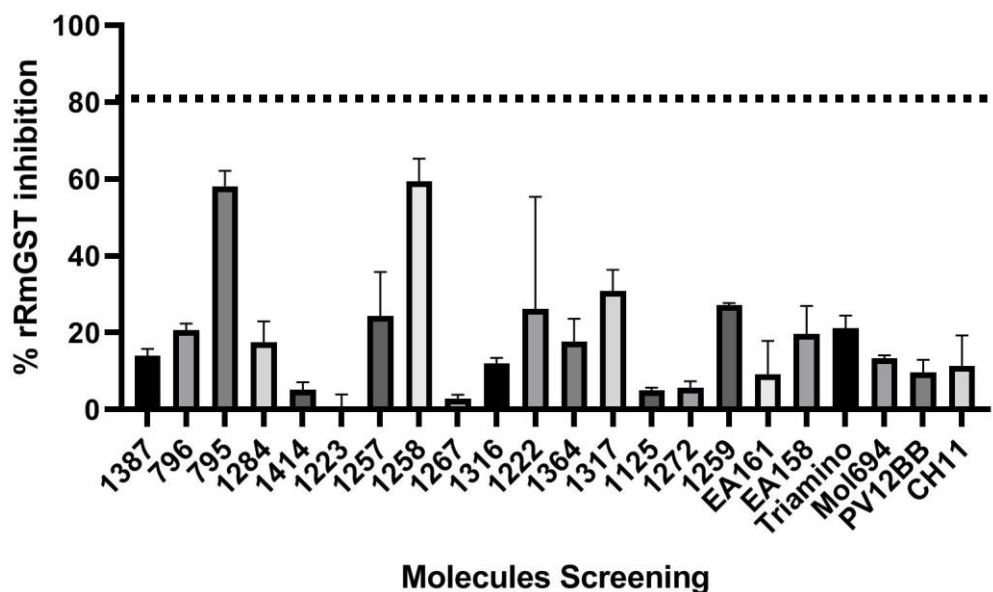


Figure 3: Screening of 60 compounds belonging to an in-house library against GST of *Rhipicephalus microplus* recombinant enzyme: Two compounds inhibit recombinant enzyme in more than 50%, whereas 20 do not reach this inhibition percentage. Molecules 795 and 1258 were chosen for to continue assay with other enzyme.

Molecules 795 and 1258 considered active were used for the assays with rHIGST, rRaGST, rRdGST, rAvGST. The compound 795 inhibited 27.8% of rAvGST, 2.3% of rHIGST, 23.9% of rRdGST, and 31.9% of rRaGST activity (Fig. 4).

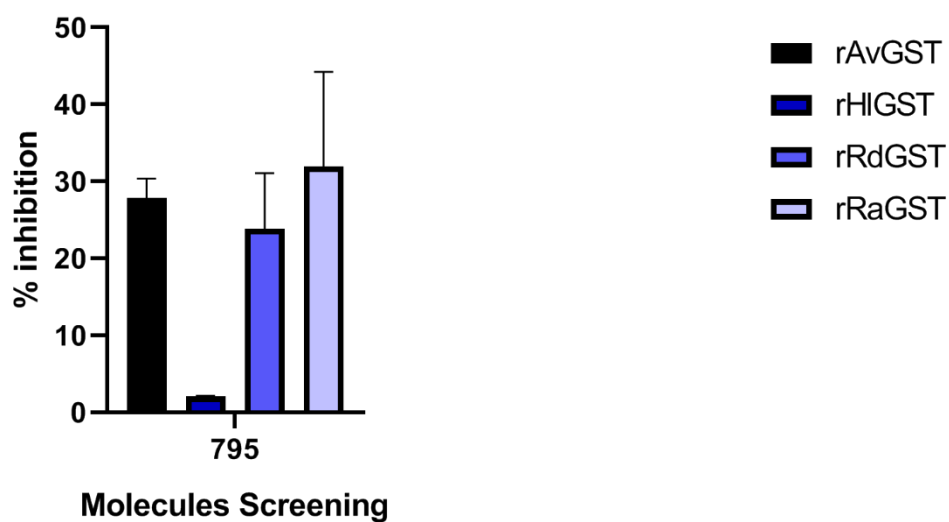


Figure 4: Molecule 795 that inhibit the recombinant GST of *Rhipicephalus microplus* (rRmGST) in more than 50% was selected to test inhibition capacity against recombinant GSTs of *Amblyomma variegatum* (rAvGST), of *Haemaphysalis longicornis* (rHIGST), of *Rhipicephalus decoloratus* (rRdGST) and of *Rhipicephalus appendiculatus* (rRaGST).

The compound 1258 inhibited 6.2% of rAvGST, 24.3% of rHIGST, 1.9% of rRdGST and 100% of rRaGST activity (Fig. 5).

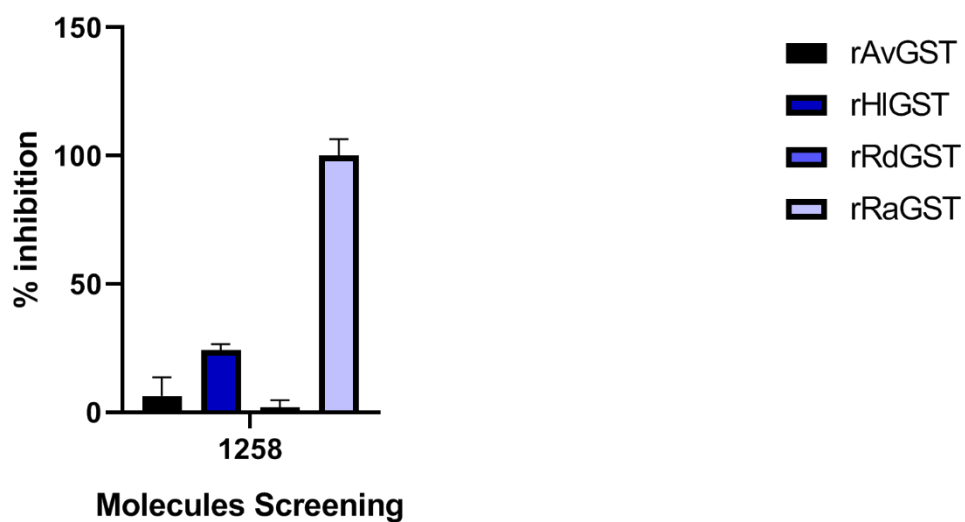


Figure 5: Molecule 1258 that inhibit recombinant GST of *Rhipicephalus microplus* (rRmGST) in more than 50% was selected to test inhibition capacity against recombinant GSTs of *Amblyomma variegatum* (rAvGST), of *Haemaphysalis longicornis* (rHIGST), of *Rhipicephalus decoloratus* (rRdGST) and of *Rhipicephalus appendiculatus* (rRaGST).

4. Discussion

Effective vaccines to reduce tick infestation have not yet been developed, therefore chemical approaches to the development of antiparasitic drugs remain the most effective way to tick control (Vudriko et al., 2018). An useful approach to identify putative molecules with parasitic activity is through screening of chemical libraries composed for small molecules (Ferraro et al., 2020; Saramago et al., 2018; Sykes; Avery, 2015). Small molecules are potential candidates for induce structural changes and interfere with adequate enzyme function. Therefore, the library studied here was chosen because it is composed of small molecule candidates for enzyme inhibitors. In addition, compounds belonging to this library have already been shown to be capable of inhibiting the *R. microplus* GST enzyme (Mattia, 2015; Gurevich, 2015; Aguilera, 2019)

In ticks, GSTs are related to the important role in the chemical metabolism of acaricides, due to GSTs have been studied as a potential target in the search for new principle actives (Azeez et al., 2012).

In this work, we carry out screening assays of 60 synthetics molecules that include different groups of compounds, Chalcones, Diarylidene ketones, Thiazoles, Thiourea, Steroids, Thiadiazines, Miscellaneous and Hydrazine against GSTs of five economic importance tick species: *R. microplus*, *H. longicornis*, *A. variegatum*, *R. appendiculatus* and *R. decoloratus*. We showed that two small molecules associated to two-chemical classes curcuminoids and steroids, inhibited partially or completely rRaGST rRdGST, rRmGST, rAvGST, rHiGST. The enzyme rRmGST was used as a model. The compounds that inhibit this enzyme with more than 50% were chosen for the screening with other enzymes. The results showed that the compound 795 inhibited 58.1% of rRmGST, 27.8% of rAvGST, 2.3% of rHiGST, 23.9% of rRdGST, and 31.9% of rRaGST activity and 1258 inhibited

59.4% of rRmGST, 6.2% of rAvGST, 24.3% of rHIGST, 1.9% of rRdGST and 100% of rRaGST activity. Compound 795 of the curcuminoids chemical class showed to inhibit more the enzymes rAvGST and rHIGST, while compound 1258 of the steroids chemical class showed to inhibit more efficiently rRdGST and rRaGST.

The similarities between GST amino acid sequence African tick species (RdGST, RaGST and AvGST) vary between 91% and 96% (Ndawula et. al., 2019). The determination conserved residues can determine protein interactions with its substrates or inhibitors, even though between two or more proteins with high similarity of amino acid (Karasev et. al., 2017; Zheng and Known, 2013). One study with two enzymes in the cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) family showed the similar structural between two proteins, PDE5 and PDE6. Study revealed that specific differences resulting in the possibility of generating selective PDE5 inhibitors with fewer adverse side effects resulting from PDE6 inhibition (Cahill et. al, 2012). Another study with human protein kinases, responsible for transferring an adenosine triphosphate phosphate group (ATP) to another protein, has a similar ATP binding site in different kinases, one of the most important challenges in the discovery and development kinase inhibitor is the optimization of selectivity. Most small molecule kinase inhibitors target the ATP binding site. The study showed the likelihood of finding selective inhibitors targeting the ATP binding site (Huang et. al., 2009). The active compound 795 was from the Diarylideneketones family also considered Curcuminoids analogs. Curcumin, the major components derived from turmeric (*Curcuma longa*) root, are natural polyphenol compounds (Abbasi et al, 2012; Priyadarsini, 2014) and have received great deal attention due to their biological activity with potential against cancer and anti-inflammatory activities (Fang; Lu; Holmgren, 2005; Halder et al., 2015). Earlier studies

revealed that phenolic products of curcuminoids family are potent inhibitor of enzyme GST suggesting this phytochemical could be used for development for acaricide.

Compounds of chemical family curcumin inhibited 57.5% of GST of *Brugia malayi* (Azeez et al., 2012). Nanoencapsulation of curcuminoids were used by Dos Santos et al. (2019) and in assays *in vitro* showed inhibited 30% at 5 μM activity of rat brains GST. Effect of 34 synthetics curcumin analogs were used for inhibition assays against human recombinant GSTA1-1, GSTM1-1, GSTP1-1 and human and rat liver GSTs (Appiah-Opong et al., 2009). Compounds B14 and C10 with IC_{50} values of 0.2 - 0.6 μM against GSTA1-1 and human liver GSTs. C1, C3 and C10 with IC_{50} values of 0.2 – 0.7 against GSTM1-1. A0, C0, C1, C2, C10 inhibited GSTP1-1 with IC_{50} values of 0.4 – 4.6 μM .

Steroids are biologically active compounds, mainly though not invariably water-insoluble. The steroids play a diverse role in the physiology as hormones, as emulsifying agents during the digestion, and as constituents of membranes (Ogihara; Taylor; Kataoka, 2019; Schiffer et al., 2019; Silva; Otero; Esteves, 2012). Previously, other works have shown that steroids could be binding and reacting within the nonsubstrate steroid-binding site in rat liver GST isoenzyme 1-1. 17 β -Iodoacetoxyestradiol-3-sulfate (17 β -IES), a reactive steroid analog, showed to induce a time-dependent loss of activity of about 40% of the original activity of the enzyme (Vargo; Colman, 2001).

The in-house chemo-library used in this work, had already been tested against enzyme triosephosphate isomerase (TIM) of *R. microplus* (Saramago et al., 2018), of *F. hepatica* (Ferraro et al., 2020) and of *T. cruzi* (Álvarez et al., 2010). In this work, we demonstrated that compounds of this chemo-library can inhibit other enzymes, as rRmGST, rRdGST, rRaGST, rHIGST and rAvGST.

These results suggest that the compounds 795 and 1258 could be potential candidates for the development of new acaricides, but it is still necessary to complement the characterization of these compounds. For this, it is essential to determine this compounds IC₅₀ value, to explore the mode of binding, to investigate the effects on *R. microplus* adults by immersion tests and the characterization of physiological parameters.

5. Conclusion

In this work, we carry out the screening of 60 compounds and the results showed that the compound 795 inhibited 58,1% of rRmGST, 27.8% of rAvGST, 23.9% of rRdGST, 2.3% of rHIGST and 31.9% of rRaGST activity, while the compound 1258 inhibited 59.4% of rRmGST, 6.2% of rAvGST, 24.3% of rHIGST, 1.9% of rRdGST and 100% of rRaGST activity. However, more studies are necessary to determine IC₅₀ values, and to elucidate the binding of these two-small molecules with residues from different regions of rAvGST, rHIGST, rRdGST, rRmGST and rRaGST. Moreover, physiological parameters characterization throughout the study of the effects on *R. microplus* adults in immersion tests are also necessary.

Acknowledgements

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): # Procad 88881.068421/2012-01; PGCi 23038.005296/2014-37; 88881.153222/2017-01; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq): Grant # 465678/2014-9; 302360/2018-2 and 441092/2016-0; CNPq-INCT. Katiussa Paula Cover Ozelame is a student under the CAPES master number of process 88882.346618/2018-01

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: K.P.C.O.; L.A.D.S; C.N and I.S.V.J

Performed the experiments: K.P.C.O; L.A.D.S and C.N.

Contributed reagents/materials/analysis tools: G.A and I.S.V.J

Drafting the article: K.P.C.O

Critical revision of the article: K.P.C.O, I.S.V.J and G.A

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.

6. References

- Abbas, R.Z., Zaman, M.A., Colwell, D.D., Gilleard, J., Iqbal, Z., 2014. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet. Parasitol.* 203, 6-20. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>.
- Abbasi, M.A., Ilyas, M., Aziz-Ur-Rehman, Sonia, A., Shahwar, D., Raza, M.A., Khan, K.M., Ashraf, M., Afzal, I., Ambreen, N., 2012. Curcumin and its derivatives: Moderate inhibitors of acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase and trypsin. *Sci. Iran.* 19, 1580–1583. <https://doi.org/10.1016/j.scient.2012.10.014>.
- Adakal, H., Biguezoton, A., Xoungwana, S., Courtin, F., de Clercq, E.M., Madder, M., 2013. Alarming spread of the Asian Cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. *Exp. Appl. Acarol.* 61, 383-386. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9706-6>.
- Aguilera, E., et al., 2019. A Nature-Inspired design yields a new class of steroids against Trypanosomatids. *Molecules* 24, 3800. <https://doi.org/10.3390/molecules24203800>
- AL-Hosary, A., Ahmed, L., Ahmed, J. Nijhof, A., Clausen, P.H., 2018. Epidemiological study on tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Egyptian Oases with special reference to the molecular characterization of *Theileria spp.* *Ticks Tick Borne Dis.* 9, 1489-1493. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2018.07.008>.
- Allocati, N., Masulli, m., Di Ilio, C., Federici, L., 2018. Glutathione transferases: Substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis.* 7 (1):8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>.
- Álvarez, G., Aguirre-López, B., Varela, J., Cabrera, M., Merlino, A., López, G.V., Lavaggi, M.L., Porcal, W., Di Maio, R., González, M., Cerecetto, H., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., De Gómez-Puyou, M.T., Gómez-Puwou, A., 2010. Massive screening yields novel and selective *Trypanosoma cruzi* triosephosphate isomerase dimer-interface-irreversible inhibitors with anti-trypanosomal activity. *Eur. J. Med. Chem.* 45, 5767-5772. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2010.09.034>.
- Amorim, L.S., Wenceslau, A.A., Carvalho, F.S., Carneiro, P.L.S., Albuquerque, G.R., 2014. Bovine babesiosis and anaplasmosis complex diagnosis and evaluation of the risk factors. <https://doi.org/10.1590/s1984-29612014064>.
- Appiah-Opong, R., Commandeur, J.N.M., Istyastono, E., Bogaards, J.J., Vermeulen, N.P.E., 2009. Inhibition of human glutathione S-transferases by curcumin and analogues. *Xenobiotica* 39, 302–311. <https://doi.org/10.1080/00498250802702316>.
- Azzez, S., Babu, R.O., Aykkal, R., Narayanan, R., 2012. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione S-transferase of filarial nematodes. *J. Mol. Model.* 18, 151-163. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1035-2>.
- Balakrishnan, B., Su, S., Wang, K., Tian, R., Chen, M., 2018. Identification, expression, and regulation of an omega class glutathione S-transferase in *Rhopalosiphum padi* (L) (Hemiptera: Aphididae) under insecticide stress. *Front. Physiol.* 9: 427. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00427>.
- Beati, L., Lucas-williams, H., Adakal, H., Kanduma, E.G., Tembo-mwase, E., Krecek, R., Mertins, J.W., Alfred, J.T., Kelly, S., Kelly, P., 2012. Phylogeography and Demographic History of *Amblyomma variegatum* (Fabricius) (Acari: Ixodidae), the tropical Bont Tick. *PLoS One* 7, 514-525. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0859>.
- Bilhassi, T.B., Oliveira, H.N., Ibeli, A.M.G., Giglioti, R., Reginato, L.C.A., Oliveira-Sequeira, T.C.G., Bressani, F.A., Malagó, W., Resende, F.D., Oliveira, M.C.S., 2014. Quantitative study of *Babesia bovis* infection in beef cattle from São Paulo state, Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 5, 234-238. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.002>.

- Cahill, B. K et. al., 2012. Identification of amino acid residues responsible for the selectivity of Tadalafil binding to two closely related phosphodiesterases, PDE5 and PDE6. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 41406-41416. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112389189>.
- Da Silva Vaz, I., Imamura, S., Ohashi, K., Onuma, M., 2004. Cloning, expression and partial characterization of a *Haemaphysalis longicornis* and a *Rhipicephalus appendiculatus* glutathione S-transferase. *Insect Mol. Biol.* 13, 329-335. <https://doi.org/10.1111/j.0962-1075.2004.00493.x>.
- Dos Santos, P.D.F., Francisco, C.R.L., Coqueiro, A., Leimann, F.V., Pinela, J., Calhelha, R.C., Porto Ineu, R., Ferreira, I.C.F.R., Bona, E., Gonçalves, O.H., 2019. The nanoencapsulation of curcuminoids extracted from: *Curcuma longa* L. and an evaluation of their cytotoxic, enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities. *Food Funct.* 10, 573–582. <https://doi.org/10.1039/c8fo02431f>.
- Enayati, A.A., Asgarian, F., Amouei, A., Sharif, M. Mortazavi, H., Boujhmehrani, H., Hemingway, J., 2010. Pyrethroid insecticide resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). *Pestic. Biochem. Physiol.* 97, 243-248. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2010.03.003>.
- Fang, J., Lu, J., Holmgren, A., 2005. Thioredoxin reductase is irreversibly modified by curcumin: A novel molecular mechanism for its anticancer activity. *J. Biol. Chem.* 280, 25284–25290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414645200>.
- Ferraro, F., Corvo, I., Bergalli, L., Ilarraz, A., Cabrara, M., Gil, J., Susuki, B.M., Caffrey, C. R., Timson, D.J., Robert, X., Guillon, C., Freire, T., Álvarez, G., 2020. Novel and selective inactivators of Triosephosphate isomerase with anti-trematode activity. *Sci. Rep*, 10, 2587. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59460-y>.
- Freitas, D. R. J., Vaz. Jr. I. da S.; Masuda. A., 2008. Expressão e atividade enzimática de glutathione S-transferase em tecidos de fêmeas de *Boophilus microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 17, 99-104.
- Fujisaki, K., Ito, Y., Kamio, T. Kitaoka, S., 1985. The presence of *Theileria sargenti* in *Haemaphysalis longicornis* overwintering in pasture in Japan. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 79, 519-524. <https://doi.org/10.1080/00034983.1985.11811957>.
- Grisi, L., Leite, R.C., Martins, J.R. de S., Barros, A.T.M. de, Andreotti, R., Caçado, P.H.D., León, A.A.P de, Pereira, J.B., Villela, H.S., 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Veterinária* 23, 150-156. <https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.
- Gurevich, E.V., Gurevich VV., 2014. Therapeutic potentia of small molecules and engineered proteins. *Handb Exp Pharmacol.* 219: 1-12. https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_1.
- Habig, W.H., Pabst, M.J., jakoby, W.B., 1974. Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Biol. Chem.* 5.
- Halder, R.C., Almasi, A., Sagong, B., Leung, J., Jewett, A., Fiala, M., 2015. Curcuminoids and ω -3 fatty acids with anti-oxidants potentiate cytotoxicity of natural killer cells against pancreatic ductal adenocarcinoma cells and inhibit interferon γ Production. *Front. Physiol.* 6, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2015.00129>.
- Hernandez, E.P., Kusakisako, K., Talactac, M.R., Galay, R.L., Hatta, T., Fujisaki, K., Tsuji, N., Tanaka, T., 2018. Glutathione S-transferase play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. *Parasites and Vectors* 11, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3044-9>.
- Hung, D. et. al., 2009. Kinase selectivity potential for inhibitors targeting the ATP binding site: a network analysis. *Bioinformatics* 36, 198-204. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp650>.

- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology*, 129, S3-S14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>.
- Karasev, A. D. et. al., 2017. Determination of amino acid residues responsible for specific interaction of protein kinases with small molecule inhibitors. *Bioinformatics* 52, 555-564. <https://doi.org/10.1134/S002689331802005X>.
- Klafke, g., Webster, A., Dall Agnol, B., Pradel, E., Silvia, J., de La Canal, L.H., Becker, M., Osório, M.F., Mansson, M., Barreto, R., Scheffer, R., Souza, U.A., Corassini, V.B., dos Santos, J., Reck, J., Martins, J.R., 2017. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 73-80. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>.
- Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- Léger, E., Vourc'h, G., Vial, L., Chevillon, C., McCoy, K.D., 2013. Changing distributions of ticks: Causes and consequences. *Exp. Appl. Acarol*, 219-244. <https://doi.org/10.1007/s10493-012-9615-0>.
- Luo, J. Lu, W., 1997. Cattle theileriosis in China. *Trop. Anim. Health. Prod.* 29, 7-10. <https://doi.org/10.1007/bf02632906>.
- Mattia, Marília Meneghel Colla. Caracterização de um painel de inibidores sobre a atividade da enzima glutatona S-transferase de *Rhipicephalus microplus*. Monografia. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2015.
- Ndawula, C., Sabadin, G.A., Parizi, L.F., da Silva Vaz, I., 2019. Constituting a glutathione S-transferase-cocktail vaccine against tick infestation. *Vaccine* 37, 1918-1927. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2019.02.039>.
- Ogihara, M.H., Taylor, D.M., Kataoka, H., 2019. Steroid hormones in Acari, their functions and synthesis. *Appl. Entomol. Zool.* 54, 323–338. <https://doi.org/10.1007/s13355-019-00631-3>.
- Priyadarsini, K.I., 2014. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. *Molecules* 19, 20091–20112. <https://doi.org/10.3390/molecules191220091>.
- Roberts, S.M., Gibb, A.J., 2013. Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. *Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development*. 1-55. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7>.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V.M., Rosario-Cruz, R., 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* tick on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* 136, 335-342. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.069>.
- Rosa De Lima, M.F., Sanchez Ferreira, C.A., Joaquim de Freitas, D.R., Valenzuela, J.G., Masuda, A., 2002. Cloning and partial characterization of a *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) glutathione S-transferase. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32, 747-754. [https://doi.org/10.1016/S0965-1748\(01\)00157-6](https://doi.org/10.1016/S0965-1748(01)00157-6).
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Robert, M.J., Delia, D.G.I., Ruben, H.O., Jose., de la D., 2009. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Front. Biosci.* 14, 2657-2665. <https://doi.org/10.2741/3403>.
- Saramago, L., Gomes, H., Aguilera, E., Cerecetto, H., González, M., Cabrera, M., Alzugaray, M.F., Vaz Junior, I. da S., da Fonseca, R.N., Aguirre-López, B., Cabrera, N., Pérez-Montfort, R., Merlino, A., Moraes, J., Álvarez, G., 2018. Novel and selective *Rhipicephalus microplus* triosephosphate isomerase inhibitors with acaricidal activity. *Vet. Sci.* 5. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>.

- Schiffer, L., Barnard, L., Baranowski, E.S., Gilligan, L.C., Taylor, A.E., Arlt, W., Shackleton, C.H.L., Storbeck, K.H., 2019. Human steroid biosynthesis, metabolism and excretion are differentially reflected by serum and urine steroid metabolomes: A comprehensive review. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 194, 105439. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105439>.
- Silva, C.P., Otero, M., Esteves, V., 2012. Processes for the elimination of estrogenic steroid hormones from water: A review. *Environ. Pollut.* 165, 38–58. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.02.002>.
- Sykes, M.L., Avery, V.M., 2015. Development and application of sensitive, phenotypic, high-throughput image-based assay to identify compound activity against *Trypanosoma cruzi* amastigotes. *Int. J. Parasitol. Drugs. Drug. Resist.* 5, 215-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2015.10.001>.
- Vargo, M.A., Colman, R.F., 2001. Affinity labeling of rat glutathione S-transferase isozyme 1-1 by 17 β -iodoacetoxy-estradiol-3-sulfate. *J. Biol. Chem.* 276, 2031–2036. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008212200>.
- Vudriko, P., Okwee-Acai, J., Byaruhanga, J., Tayebwa, D.S., Okech, S.G., Tweyongyere, R., Wampande, E.M., Okurut, A.R.A., Mugabi, K., Muhindo, J.B., Nakavuma, J.L., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., Kanameda, M., Fujisaki, K., Suzuki, H., 2016. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasites and Vectors*, 9. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1278-3>
- Vudriko, P., Okwee-Acai, J., Tayebwa, D.S., Byaruhanga, J., Kakooza, S., Wampande, E., Omara, R., Muhindo, J.B., Tweyongyere, R., Owiny, D.O., Hatta, T., Tsuji, N., Umemiya-Shirafuji, R., Xuan, X., Kanameda, M., Fujisaki, K., Suzuki, H., 2016. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasites and Vectors*, 9:4. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1278-3>.
- Zachary, J.F., McGavin, M.D., 2017. *Pathologic Basis of Veterinary Disease*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-35775-3.00020-5>.
- Ziapour, S.P., Kheiri, S., Fazeli-Dinan, M., Sahraei-Rostami, F., Mohammadpour, R.A., Aarabi, M., Nikookar, S.H., Sarafrazi, M., Asgarin, F., Enayati, A., Hemingway, J., 2017. Pyrethroid resistance in Iranian field population of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* *Pestic. Biochem. Physiol.* 136, 70-79. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.08.001>.
- Zheng, S. Known, I., 2013. Controlling enzyme inhibition using an expanded set of genetically encoded amino acids. *Biotechnology and Bioengineering* 110, 2361-2370. <https://10.1002/bit.24911>.

4 Discussão

Um importante processo que auxilia na descoberta de novas drogas ocorre através de sistemas de triagem *in vitro* de bibliotecas de substâncias químicas sintéticas. A identificação de novas drogas depende principalmente da capacidade de diferenciar entre o composto que tem o efeito fisiológico esperado e aquele que não tem. Esse método de descoberta tem sido muito útil nas diversas áreas da saúde como oncologia e controle de patógenos. No caso do controle do carrapato, o tratamento com acaricidas continua sendo o único método eficaz, pois vacinas eficientes ainda não foram desenvolvidas (ALVAREZ, 2018; BLASS, 2015).

As glutathione S-transferases (GST) são enzimas essencialmente envolvidas na detoxificação de inúmeras substâncias, incluindo agentes químicos que desempenham um papel importante no desenvolvimento da resistência. Devido a essas funções, as GST têm sido o foco de pesquisa no desenvolvimento de novas drogas acaricidas como alvo potencial (AZEEZ *et al.*, 2012).

No presente trabalho foram avaliadas 60 moléculas pertencentes a uma biblioteca química *in-house* da Universidad de La Republica, no Uruguai. Os compostos pertencentes a essa biblioteca já foram utilizados em outros estudos para selecionar possível drogas contra *R. microplus*, *T. cruzi* e *F. hepatica*.

Utilizando a enzima triosefosfato isomerase de *F. hepatica* (FhTIM). Vinte um compostos foram identificados por inibirem essa enzima, sendo que o composto 187 obteve um IC50 de 5 μ M e em apenas 4h esse composto matou a forma juvenil de *F. hepatica* com um IC50 de 3 μ M, melhor que o fármaco de referência triclabendazol (FERRARO *et al.*, 2020).

Um trabalho utilizando a enzima triosefosfato isomerase de *R. microplus* foi alvo de um mapeamento com 227 compostos dessa biblioteca. Quatro compostos (50, 98, 14, 161)

inibiram essa enzima com valores de IC50 entre 25 e 50 μM . Esses compostos também foram capazes de inibir células BME26 em mais de 50% utilizando uma concentração de 50 μM (SARAMAGO *et al.*, 2018). Outro trabalho com a enzima GST de *R. microplus*, utilizando 118 moléculas dessa biblioteca, mostrou que o composto EA149 inibiu 38,7% com IC50 de 125,6 μM pertencente ao quimiotipo benzofuroxanos e Mol111 com 22,6% e IC50 de 120,2 μM pertencente à classe química Furanos e Tiofenos (MATTIA, 2015). Esse estudo teve como objetivo avaliar 118 moléculas com potencial de inibir a atividade da enzima GST de *R. microplus*, sendo que as 118 moléculas avaliadas são diferentes das estudadas nesse trabalho.

Os 60 compostos utilizados nesse estudo pertencem à classe química das Chalconas, Diarilideneacetonas, Tiazóis, Tioureia, Esteroides, Tiadiazinas, Miscelaneas e Hidrazinas e foram inicialmente testadas contra a enzima rRmGST. No *screening in vitro* 20 moléculas inibiram parcialmente a atividade da rRmGST, sendo que duas inibiram em mais de 50%. O composto 795 inibiu 58,1%, enquanto o composto 1258 inibiu 59,4%. Essas moléculas foram escolhidas para dar continuidade aos testes *in vitro* com o restante das proteínas. O composto 795 inibiu 27,8% a atividade de rAvGST, 2,3% de rHIGST, 23,9% de rRdGST e 31,9% de rRaGST, enquanto o composto 1258 inibiu 6,2% de rAvGST, 24,3% de rHIGST, 1,9% de rRdGST e 100% de rRaGST.

O composto 795 pertence à classe química dos diarilideneacetonas também considerados análogos de curcumina. Os curcuminóides são compostos bioativos presentes nos rizomas da cúrcuma (*Curcuma longa*), membro da família Zingiberaceae. Devido a sua coloração amarela e aroma característico, a cúrcuma é usada extensivamente como condimento de coloração e aromatização em países com a Índia e China (AMALRAJ *et al.*, 2017). A cúrcuma é uma das ervas medicinais mais populares com propriedades

antioxidantes (KALPRAVIDH *et al.*, 2010), anti-protozoários (CHANGTAM *et al.*, 2010) e anti-maláricas (ADITYA *et al.*, 2012).

Em *Brugia malayi* a enzima GST foi utilizada como alvo para a exploração de uma nova droga. Foram utilizados 58 fitoquímicos de 10 plantas para analisar sua atividade inibitória. O efeito *in vitro* dos 58 compostos foram testados, dentre eles um derivado de curcumina. Essa análise demonstrou que o composto a base de curcumina teve uma eficácia de inibição de 57,5% (AZEEZ *et al.*, 2012).

Com o objetivo de investigar a capacidade de modulação *in vitro* da enzima GST do cérebro de rato foram testados compostos derivados da curcumina nano encapsulados. Essas nanopartículas inibiram 30% a atividade da GST com uma concentração de 5 μM (DOS SANTOS *et al.*, 2019).

Para investigar potenciais inibidores de curcumina, 34 análogos sintéticos da curcumina foram testados contra as proteínas recombinantes GSTA1-1, GSTM1-1, GSTP1-1 e GST citosólicas de fígado humano e de rato. Esses compostos foram projetados e classificados em três séries (série A, série B, série C). O resultado da inibição *in vitro* mostrou que os compostos B14 e C10 foram potentes inibidores contra GSTA1-1 e GST citosólico do fígado humano. Com GST de humano, B14 teve um IC₅₀ de 0,2 μM e C10 um IC₅₀ de 0,3 μM , enquanto GSTA1-1 teve um IC₅₀ de 0,6 μM com C10 e 0,5 μM com B14. C1, C3 e C10 foram os compostos que mais inibiram a enzima GSTM1-1 com valores de IC₅₀ de 0,2 a 0,7 μM . Os compostos C0, C1, C2, C10 e A0 foram os que mais inibiram GSTP1-1 com valores de IC₅₀ de 0,4 a 4,6 μM (APPIAH-OPONG *et al.*, 2009).

Esses estudos anteriores revelam que compostos análogos aos compostos da família dos curcuminóides são potentes inibidores enzimáticos, tendo a GST como alvo

O composto 1258 é pertencente à classe química dos esteroides. Os esteroides são um grande grupo de compostos lipossolúveis que naturalmente são derivados de um hidrocarboneto, ciclopentanoperidrofenantreno ($C_{17}H_{28}$), também chamado gonano. Desempenham um papel fundamental na fisiologia como constituintes de membranas, mas podem também serem sintetizados quimicamente e utilizados com finalidade médica terapêutica (SOMERVILLE, 2001).

As GST além de participarem das etapas de biotransformação, já foram descritas tendo atividade de isomerase de ligação dupla com esteroides, como por exemplo a GSTA3-3 humana, que realiza a transformação de A5-androsteno-1-17-diona em A4-androsteno-3-17-diona, uma etapa crucial da biossíntese de esteroides (LINDSTRÖM *et al.*, 2018).

Mas os esteroides também já foram citados como inibidores de GST. Glutathione S-transferases de fígado de rato foram identificadas e denominadas GSTA, GSTAA, GSTB, GSTC, GSTD e GSTE e testados contra diferentes esteroides para analisar a atividade de inibição. O estradiol-3,17-dissulfato e o estradiol-3-sulfato foram os que tiveram maior atividade inibitória, seguidos pelo sulfato de pregnenolona, estradiol-17-sulfato, sulfato de desidroisoandrosterona e sulfato de cortisol. As GSTA e GSTC foram as mais afetadas, principalmente pelo estradiol-3,17-dissulfato e pelo estradiol-3-sulfato 2 (OHL; LITWACK, 1977).

Duas GST testiculares de ratos foram purificadas, a atividade enzimática contra CDNB foi mensurada e depois esteroides foram testados como inibidores da atividade de GST. Foi mostrado que 3-sulfato-17 β -estradiol, um estrogênio sintético, inibiu parcialmente a enzima (ARAVINDA *et al.*, 1995). Outro trabalho mostrou que, utilizando a enzima GST1-1 do fígado de rato, o 17b-iodoacetoxiestradio-3-sulfato (17b-IES) poderia se ligar e

induzir a perda de atividade, sendo que o resultado do estudo mostrou uma perda de 40% da atividade da enzima (VARGO; COLMAN, 2001).

Essas moléculas possuem potencial para serem coadministradas juntamente com o acaricida, o que permitiria a interferência *in vivo* com a atividade de certas enzimas metabolizadoras de drogas atrasando a conversão metabólica em um metabólito menos potente ou inativo enquanto a permanência da droga original mais ativa é estendida (GUREVICH, 2014; DING et. al., 2007).

Esse trabalho adota uma abordagem de seleção de possíveis compostos com potencial acaricida através da análise *in vitro* de moléculas sintéticas de uma biblioteca *in house*. As moléculas selecionadas que inibiram a atividade das GST aqui estudadas são pertencentes a duas classes químicas, os curcominoides e os esteroides, 795 e 1258 respectivamente.

Alguns trabalhos anteriores já demonstram o potencial de inibição dessas duas classes químicas contra as GST, mas será necessário determinar o modo de ligação das moléculas nas enzimas e assim investigar o tipo de inibição obtida. E o teste de imersão de adultos de *R. microplus*, que é o teste padrão para caracterizar moléculas acaricidas (DRUMMOND *et al.*, 1973), também deverá ser realizado.

5 Conclusão

As GST por terem um papel fundamental na eliminação de compostos acaricidas na célula e serem responsáveis pelo desenvolvimento de resistência são consideradas potenciais alvos para novas drogas. Com isso, o trabalho aqui apresentado teve como objetivo caracterizar moléculas com potenciais acaricidas através do estudo *in vitro* de 60 compostos sintéticos de uma biblioteca *in house*. As enzimas das cinco espécies de carrapato foram obtidas de forma recombinante em sua forma ativa. Posteriormente foi realizado o mapeamento das moléculas na enzima rRmGST e aquelas que inibiram 50% a atividade da proteína, foram utilizadas para prosseguir o mapeamento com o restante das enzimas recombinantes: rAvGST, rHIGST, rRdGST, rRaGST

Vinte e duas moléculas inibiram parcialmente a atividade da rRmGST, sendo que duas moléculas inibiram em mais de 50% a sua atividade. O composto 795 inibiu 58,1%, enquanto o composto 1258 inibiu 59,4% da atividade de rRmGST. Essas duas moléculas foram selecionadas para continuar o estudo e com isso foi possível determinar que o composto 795 inibiu 27,8% a atividade de rAvGST, 2,3% de rHIGST, 23,9% de rRdGST e 31,9% de rRaGST, enquanto o composto 1258 inibiu 6,2% de rAvGST, 24,3% de rHIGST, 1,9% de rRdGST e 100% de rRaGST.

Para melhor caracterizar o efeito dessas duas moléculas será necessário determinar a ligação desses compostos nas GST e analisar o efeito destas na biologia do *R. microplus*.

Referências

- ABBAS, Rao Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 6–20, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>.
- ADAKAL, H. et al. Alarming spread of the Asian cattle tick *Rhipicephalus microplus* in West Africa-another three countries are affected: Burkina Faso, Mali and Togo. **Experimental and Applied Acarology**, v. 61, n. 3, p. 383–386, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9706-6>.
- ADITYA, N. P. et al. Curcuminoids-loaded liposomes in combination with arteether protects against *Plasmodium berghei* infection in mice. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 3, p. 292–299, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.04.010>.
- ALLOCATI, Nerino et al. Distribution of glutathione transferases in Gram-positive bacteria and Archaea. **Biochimie**, v. 94, n. 3, p. 588–596, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.09.008>.
- ALLOCATI, Nerino et al. Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. **Oncogenesis**, v. 7, n. 8, p. 1–15, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>.
- ALVAREZ, Guzmán. Bioguided Design of Trypanosomicidal Compounds: A Successful Strategy in Drug Discovery. In: **Rational Drug Design**. Methods in Molecular Biology. Humana Press, New York, v. 1824, p. 139–163, 2018. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8630-9_8.
- AMALRAJ, Augustine et al. Biological activities of curcuminoids, other biomolecules from turmeric and their derivatives – A review. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 7, n. 2, p. 205–233, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jtcme.2016.05.005>.
- ANDERSON, John F.; MAGNARELLI, Louis A. Biology of Ticks. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 22, n. 2, p. 195–215, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2007.12.006>.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; KOLLER, W. W. **Carrapatos na cadeia produtiva de bovinos**. – Brasília, DF: Embrapa, p. 240, 2019.
- ANGUS, Beverley M. The history of the cattle tick *Boophilus microplus* in Australia and achievements in its control. **International Journal for Parasitology**, v. 26, n. 12, p. 1341–1355, 1996. [https://doi.org/doi:10.1016/s0020-7519\(96\)00112-9](https://doi.org/doi:10.1016/s0020-7519(96)00112-9).
- ANIPEDIA. **Vectors: Ticks**. 2018. Disponível em: <https://www.anipedia.org/resources/vectors-ticks/1204#figure22>. Acesso em: 10 abr. 2020.
- APPIAH-OPONG, R. et al. Inhibition of human glutathione S-transferases by curcumin

and analogues. **Xenobiotica**, v. 39, n. 4, p. 302–311, 2009.
<https://doi.org/10.1080/00498250802702316>.

ARAVINDA, S. et al. A testicular protein important for fertility has glutathione S-transferase activity and is localized extracellularly in the seminiferous tubules. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 26, p. 15675–15685, 1995.
<https://doi.org/10.1074/jbc.270.26.15675>.

AZEEZ, Shamina et al. Virtual screening and in vitro assay of potential drug like inhibitors from spices against glutathione-S-transferase of filarial nematodes. **Journal of Molecular Modeling**, v. 18, n. 1, p. 151–163, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00894-011-1035-2>.

BALAKRISHNAN, Balachandar et al. Identification, expression, and regulation of an omega class glutathione s-transferase in *Rhopalosiphum padi* (L.) (Hemiptera: Aphididae) under insecticide stress. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 427, p. 1–11, 2018.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00427>.

BLASS, Benjamin E. In vitro Screening Systems. In: **Basic Principles of Drug Discovery and Development**. Elsevier, p. 143–202, 2015.

BRENDA, The Comprehensive Enzyme Information System. **2.5.1.18: glutathione transferase**. 2020. Disponível em: https://www.brenda-enzymes.org/all_enzymes.php?ecno=2.5.1.18&table=Temperature_Stability. Acesso em: 10 abr. 2020.

CANGI, Nídia et al. Efficient high-throughput molecular method to detect *Ehrlichia ruminantium* in ticks. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 566, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s13071-017-2490-0>.

CAPELLI-PEIXOTO, J. et al. The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 74, p. 32–39, 2017.
<https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.04.005>.

CARTER, Cynthia et al. Male tick bite: A rare cause of adult tick paralysis. **Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation**, v. 3, n. 4, p. e243, 2016.
<https://doi.org/doi:10.1212/NXI.0000000000000243>.

CHANGTAM, Chatchawan et al. Curcuminoid analogs with potent activity against Trypanosoma and Leishmania species. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 45, n. 3, p. 941–956, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2009.11.035>.

CHIGURE, Gajanan M. et al. Role of metabolic enzymes in conferring resistance to synthetic pyrethroids, organophosphates, and phenylpyrazole compounds in *Rhipicephalus microplus*. **International Journal of Acarology**, v. 44, n. 1, p. 28–34, 2018.
<https://doi.org/10.1080/01647954.2017.1400588>.

CHOUDHURY, Manash Kumar; BOSHE, Fikre Dessalegn. Toxicity of Khaya senegalensis (Meliaceae) Seed Oil Against the Larvae of *Boophilus decoloratus*: A One-Host Tick in Cattle. **Proceedings of the Zoological Society**, v. 66, n. 2, p. 137–140, 2013. <https://doi.org/10.1007/s12595-012-0058-8>.

COLES, Tad B.; DRYDEN, Michael W. Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. **Parasites Vectors**, v. 7, n. 8, 2014. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-8>.

COLLATZ, Jana et al. Being a parasitoid of parasites: Host finding in the tick wasp *Ixodiphagus hookeri* by odours from mammals. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 134, n. 2, p. 131–137, 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.2009.00943.x>.

CUTULLÉ, C.; JONSSON, N. N.; SEDDON, J. Population structure of Australian isolates of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n. 3–4, p. 283–291, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.01.005>.

DAKTARIDUDU. **File: *Rhipicephalus-appendiculatus-female-male-dorsal.jpg* - Wikimedia Commons**. 2016. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Rhipicephalus-appendiculatus-female-male-dorsal.jpg>. Acesso em: 10 abr. 2020.

DANIELSON, U. Helena; MANNERVIK, Bengt. Kinetic independence of the subunits of cytosolic glutathione transferase from the rat. **Biochem. J**, v. 231, p. 263-267, 1985. <https://doi.org/10.1042/bj2310263>.

DANTAS-TORRES, Filipe; CHOMEL, Bruno B.; OTRANTO, Domenico. Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 10, p. 437-446, 2012. <https://doi.org/doi:10.1016/j.pt.2012.07.003>.

DE LA FUENTE, Jose et. al. Vaccination against ticks (*Boophilus spp*): The experience with the Bm86-based vaccine Gavac. **Genetics Analysis – Biomolecular Engineering**, v. 15, n.3-5, p. 143-148, 1999. [https://doi.org/10.1016/s1050-3862\(99\)00018-2](https://doi.org/10.1016/s1050-3862(99)00018-2).

DE LA FUENTE, Jose et al. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 6938–6946, 2008. <https://doi.org/10.2741/3200>.

DING, Yunchuan et al. The *Anopheles gambiae* glutathione transferase supergene family: Annotation, phylogeny and expression profiles. **BMC Genomics**, v. 4, n. 1, p. 35, 2003. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-4-35>.

DING, Dalian et. al. Cell death after co-administration of cisplatin and ethacrynic acid. 2007. **Hearing research**, v. 226, n. 2. <https://doi.org/10.1016/j.heares.2006.07.015>

DIXON, David P.; LAPTHORN, Adrian; EDWARDS, Robert. Plant glutathione transferases. **Genome Biology**, v. 3, n. 3, 2002. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-3->

reviews3004.

DOMÍNGUEZ GARCÍA, D. I.; TORRES AGATÓN, F.; ROSARIO-CRUZ, R. Evaluación económica del control de garrapatas *Rhipicephalus microplus* en México. **CIBA Revista Iberoamericana de las Ciencias Biológicas y Agropecuarias**, v. 5, n. 9, p. 43, 2016.

DOS SANTOS, Priscila Dayane Freitas et al. The nanoencapsulation of curcuminoids extracted from: *Curcuma longa* L. and an evaluation of their cytotoxic, enzymatic, antioxidant and anti-inflammatory activities. **Food and Function**, v. 10, n. 2, p. 573–582, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8fo02431f>.

DRUMMOND, R. O. et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130–133, 1973. <https://doi.org/10.1093/jee/66.1.130>.

DUSCHER, Georg Gerhard et al. Glutathione S-transferase affects permethrin detoxification in the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 3, p. 225–233, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.006>.

ESPINOZA-GOMEZ, Francisco et al. Tick paralysis caused by *Amblyomma maculatum* on the Mexican Pacific Coast. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 11, n. 7, p. 945–946, 2011. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0154>.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants - Guidelines, Module 1 - Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention**. Food and Agriculture Organization of The United Nations. Rome, 2004.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Ticks and tick-borne disease control. A practical field manual**. Rome, v.1, p. 299, 1984.

FERNÁNDEZ-RUVALCABA, Manuel et al. Evaluation of *Bacillus thuringiensis* Pathogenicity for a Strain of the Tick, *Rhipicephalus microplus*, Resistant to Chemical Pesticides. **Journal of Insect Science**, v. 10, n. 186, p. 1–6, 2010. <https://doi.org/10.1673/031.010.14146>.

FERRARO, Florencia et al. Novel and selective inactivators of Triosephosphate isomerase with anti-trematode activity. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 2587, 2020. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-59460-y>.

FEYEREISEN, René; DERMAUW, Wannes; VAN LEEUWEN, Thomas. Genotype to phenotype, the molecular and physiological dimensions of resistance in arthropods. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 121, p. 61–77, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2015.01.004>.

FRANCIS, M.; CURTICE, C. The cattle tick: Biology, Preventive Measures. In: **Texas Agricultural Experiment Station Bulletin**. CRC Press, p. 233–256, 1892.
<http://hdl.handle.net/1969.1/2867>.

FREITAS, D. R. J. et al. Relationship between glutathione S-transferase, catalase, oxygen consumption, lipid peroxidation and oxidative stress in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, n. 4, p. 688–694, 2007.
<https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2006.04.032>.

GACHOHI, John et al. Epidemiology of East Coast fever (*Theileria parva* infection) in Kenya: Past, present and the future. **Parasites and vectors**, v. 5, n. 194, 2012.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-194>.

GALAY, Remil Linggatong et al. Iron metabolism in hard ticks (Acari: Ixodidae): The antidote to their toxic diet. **Parasitology International**, v. 64, n. 2, p. 182–189, 2015.
<https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.12.005>.

GATHANY, James. **Details – Public Health Image Library (PHIL)**. CDC Centers for Disease Control and Prevention, 2018. Disponível em:
<https://phil.cdc.gov/details.aspx?pid=2165>. Acesso em: 20 mar. 2020.

GEORGE, John E. Present and Future Technologies for Tick Control. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 916, n. 1, p. 583–588, 2006.
<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05340.x>.

GOMES, Ana Rita; ROCHA-SANTOS, Teresa A. P. Bioassays - Enzyme Assays. In: **Encyclopedia of Analytical Science**. Elsevier, p. 271–277, 2019.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14331-8>.

GRAHAM, H. O.; HOURRIGAN, J. L. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. **Journal of Medical Entomology**, v. 13, n. 6, p. 629–658, 1977.
<https://doi.org/10.1093/jmedent/13.6.629>.

GRISI, Laerte et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150–156, 2014.
<https://doi.org/10.1590/S1984-29612014042>.

GUNEIDY, Rasha A. et al. Inhibition of the recombinant cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* glutathione S-transferase. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 5, n. 5, p. 528–536, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.009>.

GUREVICH, Eugenia., GUREVICH Vsevolod. Therapeutic potential of small molecules and engineered proteins. 2014. **Handb Exp Pharmacol.**, v. 219, p. 1-12.
https://doi.org/10.1007/978-3-642-41199-1_1.

HAMMER, Jade Frederick et al. Detection of *Theileria orientalis* genotypes in *Haemaphysalis longicornis* ticks from southern Australis. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 229, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0839-9>.

HERNANDEZ, Emmanuel Pacia et al. Glutathione S-transferases play a role in the detoxification of flumethrin and chlorpyrifos in *Haemaphysalis longicornis*. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3044-9>.

HORAK, Ivan G. et al. **The ixodid ticks (Acari: Ixodidae) of Southern Africa**. Springer International Publishing, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-70642-9>.

HORNOK, Sándor et al. An unexpected advantage of insectivorism: Insect moulting hormones ingested by song birds affect their ticks. **Scientific Reports**, v. 6, n. 23390, p. 1–8, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep23390>.

HUSSEIN, Hala E. et al. Silencing expression of the *Rhipicephalus microplus* vitellogenin receptor gene blocks *Babesia bovis* transmission and interferes with oocyte maturation. **Parasites and Vectors**, v. 12, n. 1, p. 7, 2019. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3270-1>.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. SUPPL., p. S3–S14, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, p. 1-10, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>.

KALPRAVIDH, Ruchaneekorn W. et al. Improvement in oxidative stress and antioxidant parameters in β -thalassemia/Hb E patients treated with curcuminoids. **Clinical Biochemistry**, v. 43, n. 4–5, p. 424–429, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2009.10.057>

KLAFKE, Guilherme et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 1, p. 73–80, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.09.019>.

KOLLER, Wilson Werner et al. **Diagnóstico da Resistência do Carrapato-do-boi a Carrapaticidas em Mato Grosso do Sul**. Campo Grande,MS: Embrapa Gado de Corte, p. 47, 2009.

KUMAR, Rinesh; KLAFKE, Guilherme M.; MILLER, Robert J. Voltage-gated sodium channel gene mutations and pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 11, n. 3, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101404>.

KUNZ, S.; KEMP, D. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev Sci Tech**, v. 13, n. 4, p. 1249–1286, 1994. <https://doi.org/10.20506/rst.13.4.816>.

LANKENAU, Sunil Thomas. Vaccine Design, methods and protocols volume 2: vaccines for veterinary diseases. **Science And Technology**, v. 1404, p. 878, 2016. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3389-1>.

LE GALL, Valeria Lis; KLAFKE, Guilherme Marcondes; TORRES, Tatiana Teixeira. Detoxification mechanisms involved in ivermectin resistance in the cattle tick,

Rhipicephalus (Boophilus) microplus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30907-7>.

LETA, Samson; DE CLERCQ, Eva M.; MADDER, Maxime. High-resolution predictive mapping for *Rhipicephalus appendiculatus* (Acari: Ixodidae) in the Horn of Africa. **Experimental and Applied Acarology**, v. 60, n. 4, p. 531–542, 2013. <https://doi.org/10.1007/s10493-013-9670-1>.

LI, Shuyi et al. Overcoming resistance to cisplatin by inhibition of glutathione S-transferases (GSTs) with ethacraplatin micelles in vitro and in vivo. **Biomaterials**, v. 144, p. 119–129, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.08.021>.

LINDSTRÖM, Helena et al. Characterization of equine GST A3-3 as a steroid isomerase. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 178, p. 117–126, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.11.011>.

LOPINA, Olga D. **Enzyme Inhibitors and Activators**. IntechOpen, 2017. <https://doi.org/10.5772/67248>.

LUO, Li Mei et al. *Haemaphysalis longicornis* ticks as reservoir and vector of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus in China. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1770–1776, 2015. <https://doi.org/10.3201/eid2110.150126>.

MADISON-ANTENUCCI, Susan et al. **Emerging Tick-Borne Diseases**. *Clinical Microbiology Review*, v. 33, n. 2, p. 1–34, 2020. <https://doi.org/10.1128/CMR.00083-18>.

MAIORANO, A. M. et al. Resistance to the tick *Rhipicephalus microplus* and *Babesia bovis* infection levels in beef heifers raised in an endemic area of Sao Paulo state, Brazil. **Animal Production Science**, v. 59, n. 5, p. 938–944, 2019. <https://doi.org/10.1071/AN17157>.

MANDARA, Stephen. **The distribution of *Amblyomma variegatum* and *A. hebraeum* in Zimbabwe and their infection with *Ehrlichia ruminantium* and *Rickettsia africae***. 2018. Dissertation, University of Pretoria, 2018. <http://hdl.handle.net/2263/70399>.

MATHEW, Nisha; KALYANASUNDARAM, Muthuswami; BALARAMAN, Kothandapani. Glutathione S-transferase (GST) inhibitors. **Expert Opin. Ther. Patents**, v. 16, n. 4, p. 431–444, 2006. <https://doi.org/10.1517/13543776.16.4.431>.

MATTIA, Marília Meneghel Colla. **Caracterização de um painel de inibidores sobre a atividade da enzima Glutathione S-transferase de *Rhipicephalus microplus***. Monografia. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, 2015.

MERINO, Octavio et al. Tick vaccines and the control of tick-borne pathogens. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, n. 30, p. 1–10, 2013. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00030>.

MIGNANI, Serge et al. A novel class of ethacrynic acid derivatives as promising drug-like potent generation of anticancer agents with established mechanism of action. **European**

Journal of Medicinal Chemistry, v. 122, p. 656–673, 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.063>.

MOUNSEY, Kate E. et al. Increased transcription of Glutathione S-transferases in acaricide exposed scabies mites. **Parasites and Vectors**, v. 3, n. 1, p. 43, 2010.
<https://doi.org/10.1186/1756-3305-3-43>.

MUYOBELA, Jackson et al. Resistance status of ticks (Acari; Ixodidae) to amitraz and cypermethrin acaricides in Isoka District, Zambia. **Trop Anim Health Prod**, v. 47, p. 1599–1605, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11250-015-0906-4>.

NAVA, Santiago et al. Tick Classification, External Tick Anatomy with a Glossary, and Biological Cycles. In: **Ticks of the Southern Cone of America**. Elsevier, p. 1–23, 2017.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811075-1.00001-7>.

NDHLOVU, Daud Nyosi; MASIKA, Patrick Julius. Risk factors associated with clinical dermatophilosis in smallholder sector cattle herds of Zimbabwe at the *Amblyomma variegatum* and *Amblyomma hebraeum* interface. **Tropical Animal Health and Production**, v. 47, n. 2, p. 353–360, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11250-014-0727-x>.

NICHOLSON, William L. et al. Ticks (Ixodida). In: **Medical and Veterinary Entomology**. Elsevier, p. 603–672, 2019. <https://doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50026-8>.

NKYA, Theresia Estomih et al. Impact of environment on mosquito response to pyrethroid insecticides: Facts, evidences and prospects. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 43, n. 4, p. 407–416, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2012.10.006>.

OAKLEY, Aaron. Glutathione transferases: A structural perspective. **Drug Metab Rev**, v. 43, n. 2, 2011. <https://doi.org/10.3109/03602532.2011.558093>.

OHL, Virginia Sapico; LITWACK, Gerald. Selective inhibition of glutathione S-transferases by 17 β -estradiol disulfate. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 180, n. 1, p. 186–190, 1977. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(77\)90024-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(77)90024-8).

OLDS, Cassandra L.; MASON, Kathleen L.; SCOLES, Glen A. *Rhipicephalus appendiculatus* ticks transmit *Theileria parva* from persistently infected cattle in the absence of detectable parasitemia: Implications for East Coast fever epidemiology. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 126, 2018. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2727-6>.

ROBERT, Leon L.; DEBBOUN, Mustapha. Arthropods of Public Health Importance. In: **Hunter's Tropical Medicine and Emerging Infectious Diseases (Tenth Edition)**. Elsevier, p. 1055–1062, 2020. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-55512-8.00146-0>.

ROBERTS, Stanley M.; GIBB, Alasdair J. Introduction to enzymes, receptors and the action of small molecule drugs. In: **Introduction to Biological and Small Molecule Drug Research and Development: Theory and Case Studies**. Elsevier, p. 1–55, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397176-0.00001-7>.

- RODRIGUES, D. S.; LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, v. 65, n. 5, p. 1570–1572, 2013.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, México et al. Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. **Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias**, v. 8, n. 1, p. 61–74, 2017. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v8i1.4305>.
- RODRÍGUEZ-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**, v. 117, p. 3–29, 2018. <https://doi.org/10.1007/s00436-017-5677-6>.
- RODRÍGUEZ-VIVAS, Róger Iván et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistant to acaricides and ivermectin in cattle farms of Mexico. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria**, v. 23, n. 2, p. 113–122, 2014. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014044>.
- SAMISH, Michael; GINSBERG, H.; GLAZER, I. Biological control of ticks. **Parasitology**, v.129, p. S389-S403, 2004. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005219>.
- SAMISH, Michael; GLAZER, Itamar. Entomopathogenic nematodes for the biocontrol of ticks. **Elsevier Current Trends**, v. 17, n. 8, 2001. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)01985-7](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)01985-7).
- SARAMAGO, Luiz et al. Novel and selective *Rhipicephalus microplus* triosephosphate isomerase inhibitors with acaricidal activity. **Veterinary Sciences**, v. 5, n. 3, 2018. <https://doi.org/10.3390/vetsci5030074>.
- SCHETTERS, T. Cattle tick vaccine researches join forces in CATVAC. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1-7, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1386-8>.
- SHAHEIN, Yasser; ABOUELELLA, Amira; HAME, Ragaa. Glutathione S-Transferase Genes from Ticks. In: **An Integrated View of the Molecular Recognition and Toxinology - From Analytical Procedures to Biomedical Applications**. InTech, p. 267–289, 2013. <https://doi.org/10.5772/52482>.
- SHANAHAN, G. J.; HART, R. J. Change in response of *Lucilia cuprina* Wied. to organophosphorus insecticides in Australia. **Nature**, v. 212, n. 5069, p. 1466–1467, 1966. <https://doi.org/10.1038/2121466b0>.
- SHEEHAN, David et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases : implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochem. J**, v. 360, p. 1–16, 2001. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3600001>.
- SOMERVILLE, R. L. Steroids. In: **Encyclopedia of Genetics**. Elsevier, p. 1889, 2001. <https://doi.org/10.1006/rwgn.2001.1244>.

SONENSHINE, Daniel E.; ROE, Michael. **Biology of ticks**. Oxford University Press. 2 ed. 2014.

SRIVASTAVA, P. et al. Glutathione-S-transferase activity in malarial parasites. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 4, p. 251–254, 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3156.1999.00387.x>.

SUNGIRAI, M. et al. Modelling the distribution of *Rhipicephalus microplus* and *R. decoloratus* in Zimbabwe. **Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports**, v. 14, p. 41–49, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.vprsr.2018.08.006>.

TABARA, Kenji et al. High incidence of Rickettsiosis correlated to prevalence of *Rickettsia japonica* among *Haemaphysalis longicornis* Tick. **Japan J. Vet. Med. Sci**, v. 73, n. 4, p. 507–510, 2011. <https://doi.org/10.1292/jvms.10-0369>.

TOWNSEND, Danyelle M.; TEW, Kenneth D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369–7375, 2003. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206940>.

VARGO, M. A.; COLMAN, R. F. Affinity labeling of rat glutathione S-transferase isozyme 1-1 by 17 β -iodoacetoxy-estradiol-3-sulfate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 3, p. 2031–2036, 2001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008212200>.

VERÍSSIMO, José Cecília. **Resistência e Controle do Carrapato-do-boi**. Nova Odessa; Instituto de Zootecnia, p. 135, 2015.

VUDRIKO, Patrick et al. Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1278-3>.

WALKER, Alan. **File: Amblyomma-variegatum-male.jpg - Wikimedia Commons**. 2011. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Amblyomma-variegatum-male.jpg>. Acesso em: 10 abr. 2020.

WANG, Hui et al. Comprehensive Analysis of the Global Protein Changes That Occur During Salivary Gland Degeneration in Female Ixodid Ticks *Haemaphysalis longicornis*. **Frontiers in Physiology**, v. 9, n. 1943, 2019. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01943>.

WASSERMANN, Marion et al. Biological control of *Ixodes ricinus* larvae and nymphs with *Metarhizium anisopliae* blastospores. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 5, p. 768–771, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.03.010>.

WILLADSEN, P. Anti-tick vaccines. **Ticks: Biology, Disease and Control**. Cambridge: Cambridge University Press, p. 424–446, 2008. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511551802.020>.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196–198, 1988. [https://doi.org/10.1016/01694758\(88\)90084-1](https://doi.org/10.1016/01694758(88)90084-1).

WORLD HEALTH ORGANIZATION SCIENTIFIC GROUP. **Resistance of malaria parasites to drugs**. Geneva, p. 1-68, 1965. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/40615>.

WU, Baojian; DONG, Dong. Human cytosolic glutathione transferases: Structure, function, and drug discovery. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 33, n. 13, p. 656-668, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2012.09.007>.

XAVIER, M. **Foto da fêmea do carrapato *R. microplus***. Imagem cedida pela autora. Porto Alegre, 2018.

YADAV, Marshleen et al. Structural modeling and simulation studies of *Brugia malayi* glutathione-S-transferase with compounds exhibiting antifilarial activity: Implications in drug targeting and designing. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v. 28, n. 5, p. 435–445, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.jmngm.2009.10.003>.

ZIAPOUR, Seyyed Payman et al. Pyrethroid resistance in Iranian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 136, p. 70–79, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2016.08.001>.

Anexo A

CURRICULUM VITAE

OZELAME, K.

1. DADOS PESSOAIS

Nome: Katiussa Paula Cover Ozelame.

Local e data de nascimento: Dois Lajeados/RS, Brasil. 28/08/1995.

Endereço profissional: Av. Bento Gonçalves, 9500. Prédio 43421.

Telefone profissional: (54) 991307078.

E-mail: kozelame1@gmail.com

2. FORMAÇÃO: Graduação em Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia. UERGS. 2013-2018.

3. ESTÁGIOS:

1. Estagiária de Engenharia. Empresa: Farina S/A Componentes Automotivos. Período: 2014-2015. Resumo das atividades: Desenvolver e acompanhar lotes pilotos; analisar produtos com defeitos e gerar soluções para os mesmos; efetuar os ensaios da areia de moldagem junto ao laboratório de qualidade; desenvolver e organizar as documentações referentes à ISO9001; auxiliar na análise de requisitos do cliente. Responsável: Cassiano da Rosa

2. Estagiária de Custos. Empresa: Farina S/A Componentes Automotivos. Período: 2015-2016. Resumo das atividades: Realizar índice de aumento do mês, orçamentos, cálculos de custos, fechamento mensal, análise de gastos da empresa, gerar indicadores de faturamento e eficiências, executar trabalhos referentes a cadastros de itens, de roteiros e estruturas de produtos e suas manutenções periódicas. Responsável: Cassiano da Rosa

3. Bolsista de Iniciação Científica. Empresa: Embrapa Uva e Vinho. Agência de financiamento: FAPERGS. Período: 2016-2017. Resumo das atividades: Desenvolver e planejar experimentos; gerar dados estatísticos baseados em resultados de experimentos, realizar análises a partir destilação, titulação e cromatografia para determinação de nutrição vegetal. Projeto de pesquisa: Influência dos fungos micorrízicos arbusculares no crescimento

inicial da videira em solo com altos teores de cobre. Responsável: George Wellington de Melo.

4. Bolsista de Iniciação Científica. Empresa: UFRGS. Período: 2018. Agência de financiamento: CNPq. Resumo das atividades: Expressar de forma recombinante e caracterizar uma GST da classe Alfa de *R. microplus* (RmGSTA), determinando sua função biológica e sua capacidade antigênica. Responsável: Itabajara da Silva Vaz Jr.

4. PRÊMIOS E DISTINÇÕES

Destaque na Sessão de Biologia Molecular, Salão de Iniciação Científica na Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Expressão e caracterização de uma glutathione S-transferase de *Rhipicephalus microplus*, 2018.

5. TRABALHOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSO (RESUMO)

OZELAME, K. P. C.; VAZ JUNIOR, I. S.; Characterization of tick glutathione S-transferase inhibitors. In: Encontro Arthromint 2019, 2019, Ilha Grande. XXIII Encontro Anual do Grupo Arthromint 2019, 2019.

OZELAME, K. P. C.; IWAMOTO, H.; VIEIRA, J. L.; MORAIS NETO, J. A.; ZALAMENA, J.; SCANAGATTA, V.; MELO, G. W. . Influência dos fungos micorrízicos arbusculares no crescimento inicial da videira em solos com altos teores de cobre. In: 15º Encontro de Iniciação Científica e 11º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2017. 15º Encontro de Iniciação Científica e 11º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2017.

MELO, G. W. ; MORAIS NETO, J. A. ; VIEIRA, J. L. ; OZELAME, K. P. C. ; IWAMOTO, H. ; NASCIMENTO JUNIOR, A. ; ZALAMENA, J. . Cultivation of black oats (*Avena strigosa* Schreb) improves the solubilization of rock phosphate and increases P availability to red Niagara (*Vitis labrusca* L.) plants grown in succession. In: VIII ISHS Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops, 2017, Bolzano. VIII ISHS Symposium on Mineral Nutrition of Fruit Crops, 2017.

VIEIRA, J. L. ; IWAMOTO, H. ; MORAIS NETO, J. A. ; OZELAME, K. P. C. ; ZALAMENA, J. ; SCANAGATTA, V. ; MELO, G. W. . Uso de aveia e ervilhaca como fornecedoras de nitrogênio para a videira. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 2017, Bento Gonçalves. ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E ENCONTRO DE PÓS-GRADUANDOS DA EMBRAPA UVA E VINHO, 2017.

MORAIS NETO, J. A. ; IWAMOTO, H. ; VIEIRA, J. L. ; OZELAME, K. P. C. ; ZALAMENA, J. ; SCANAGATTA, V. ; MELO, G. W. . Toxicidade de cobre em

cultivares de videira. In: 15º Encontro de Iniciação Científica e 11º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2017, Bento Gonçalves. 15º Encontro de Iniciação Científica e 11º Encontro de Pós-graduandos da Embrapa Uva e Vinho, 2017.