

EDVALDO BARROS

**ANÁLISE PROTEÔMICA DE GLÂNDULAS SALIVARES DO
CARRAPATO *Amblyomma sculptum***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2016

**Ficha catalográfica preparada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Câmpus Viçosa**

T

Barros, Edvaldo, 1977-
B277a Análise proteômica de glândulas salivares do carrapato
2016 *Amblyomma sculptum* / Edvaldo Barros. – Viçosa, MG, 2016.
xvii, 142f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lisias Mafra de Siqueira.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. *Amblyomma sculptum*. 2. Carrapato. 3. Carrapato -
Glândulas salivares. 4. Proteínas. 5. Proteômica.
6. Espectrometria de massa. I. Universidade Federal de Viçosa.
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular. Programa de
Pós-graduação em Bioquímica Aplicada. II. Título.

CDD 22 ed. 595.429

EDVALDO BARROS

ANÁLISE PROTEÔMICA DE GLÂNDULAS SALIVARES DO CARRAPATO
Amblyomma sculptum

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

APROVADA: 23 de junho de 2016.

Itabajara da Silva Vaz Júnior

Erika Toriyama

Carlos Emmanuel Montandon

Humberto Josué de Oliveira Ramos

Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus, que nunca me abandonou em nenhum momento da minha vida. À minha esposa, Márcia Cristina, pelo companheirismo irrevogável. Aos meus filhos, Arthur e Ana Clara, por ser a alegria da minha vida e fonte de inspiração para todas as minhas ações. Aos meus pais, Divino e Eni, por serem meu alicerce e o ponto de referência da minha existência.

“Feliz do homem que encontrou a sabedoria,
daquele que adquiriu a inteligência, porque mais vale
esse lucro que o da prata, e o fruto que se obtém é
melhor que o fino ouro.”

(Provérbio 3:13-14)

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me conceder a vida e por me dar sustentação para vivê-la.

À Universidade Federal de Viçosa pela oportunidade concedida.

Ao Programa de Pós Graduação em Bioquímica Aplicada, seus Professores e Funcionários, pelo apoio e compreensão durante todo este período.

Ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, seus Professores, Técnicos e Funcionários, pelo apoio e gentileza em atender nossas necessidades.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas – UFV pela disponibilidade da estrutura utilizada.

Ao amigo, professor e orientador Cláudio Mafra, pelo apoio nos momentos mais difíceis que encontrei nesta caminhada. Obrigado pela confiança e paciência que sempre demonstrou com a minha pessoa. Sem você nada disso teria acontecido.

Aos Senhores Eduardo Pereira Monteiro e Marco Aurélio Ferreira de Oliveira, secretários da Pós Graduação em Bioquímica Aplicada, pela amizade, apoio e paciência.

Ao amigo, professor e co-orientador Humberto Josué de Oliveira Ramos, pelos ensinamentos, apoio e incentivo no término deste trabalho.

Ao Professor Matias Plabo Juan Szabó e à doutoranda Maria Marlene Martins da Universidade Federal de Uberlândia, pela gentileza no fornecimento dos carrapatos utilizados neste estudo.

Aos membros da banca Dr. Carlos Emmanuel Montandon, Dr. Erika Toryjama, Dr. Itabajara Da Silva Vaz Jr., Dr. Camilo Elber Vital, Dr. Silvia Almeida Cardoso, Dr. Humberto Josué de Oliveira Ramos e Dr. Cláudio Lísias Mafra de Siqueira, pela disponibilidade e pronto atendimento em aceitar o convite para participar desse processo avaliativo.

Aos amigos do NuBioMol, Humberto, Pedro, Nivea, Cláudia e Camilo, pelo apoio, incentivo, sugestões, paciência, dentre outras coisas, durante este período.

Aos amigos Gustavo Bressan e Larissa Cyrino pela amizade e apoio concedidos durante este processo.

Aos amigos Aloirta, Mário e Ícaro, pelo apoio, conselhos e paciência durante este período.

Aos amigos do LAPEM, pela ótima convivência.

Aos amigos Cynthia, Rafael, Carlos, Valquíria, Flaviane, Michelle e Lizandra, pela amizade, pelo suporte no desenvolvimento da parte experimental deste trabalho, além das sugestões durante a execução do mesmo.

Aos amigos, Daniel, Solange, Daniela e Mariana, pela amizade e por tudo o que foi possível ser feito para me tirar da fossa nos momentos difíceis deste período e de toda minha vida.

Aos meus pais, Divino e Eni, pelo infinito amor, pelos conselhos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e por serem modelos de conduta de vida para minha família e eu.

Aos meus sogros Adir e Vera Lúcia; aos meus cunhados Gabriela, Alessandra e Alessandro; e ao meu concunhado Marlom, muito obrigado pela amizade e apoio concedidos.

Aos meus familiares pelo apoio direto ou indiretamente durante toda minha vida.

À minha esposa, Márcia Cristina, pelo amor, companheirismo, carinho, dedicação e paciência durante estes quase dezessete anos que estamos juntos. Eu te amo!

Aos meus filhos, Arthur e Ana Clara, por ser a luz da minha vida e fonte de inspiração para todas as minhas atitudes. Eu amo vocês!

Enfim, em toda minha vida nunca caminhei sozinho, no entanto, há pessoas já se foram, pessoas que permanecem presentes e pessoas que, por algum motivo, seguiram outros caminhos. Peço desculpas àquelas que não tiveram seus nomes citados nos agradecimentos, pois precisaria de muito espaço para tal feito. Portanto, agradeço a todos que me ajudaram e ajudam-me a seguir o meu caminho, ensinando-me a ser uma pessoa melhor!

BIOGRAFIA

Edvaldo Barros, filho de Divino Alves de Barros e de Eni Maria da Penha de Barros, nasceu em 16 de julho de 1977, em Caratinga – Minas Gerais. Casou-se com Márcia Cristina da Silva Barros em 08 de janeiro de 2000, com quem tem dois filhos, Arthur da Silva Barros, nascido em 29 de junho de 2008 e Ana Clara da Silva Barros, nascida em 18 de junho de 2014.

Em dezembro de 1995, terminou o curso Técnico em Contabilidade pela Escola Estadual Maria Isabel Vieira em Caratinga.

Em 2003 ingressou no curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Caratinga – UNEC, no qual obteve o título de graduação em julho de 2006.

Em março de 2007 ingressou no curso de Mestrado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola da Universidade Federal de Viçosa, no qual obteve o título de mestre em novembro de 2009.

Em agosto de 2008 ingressou como servidor, cargo de Biólogo, no corpo administrativo da Universidade Federal de Viçosa, onde permanece até o momento.

Em março de 2012 ingressou no curso de Doutorado em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada da Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua tese em junho de 2016.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	4
2.1. Aspectos morfológicos e taxonômicos dos carrapatos	4
2.2. Ciclo de vida do carrapato <i>Amblyomma sculptum</i>	4
2.3. Aspectos ecológicos e zoonóticos do <i>A. sculptum</i> no Brasil	5
2.4. Relação carrapato-patógeno, tendo por modelo a relação carrapato- riquétsia-hospedeiro vertebrado	7
2.5. Principais diferenças entre glândulas salivares de carrapatos ixodídeos machos e fêmeas	9
2.6. Utilização da abordagem proteômica para o estudo de carrapatos	12
3. HIPÓTESE.....	14
4. OBJETIVOS	15
4.1. Objetivo geral	15
4.2. Objetivos específicos	15
5. MATERIAL E MÉTODOS	16
5.1. Obtenção dos carrapatos e dissecação das glândulas salivares...	17
5.2. Extração e quantificação das proteínas.....	18
5.3. Separação das proteínas e digestão enzimática.....	18
5.4. Espectrometria de Massas.....	20
5.5. Identificação das proteínas.....	21
5.6. Caracterização das proteínas identificadas	23
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
6.1. Preparo e separação das proteínas.....	26
6.2. Identificação de proteínas: Aquisição de espectros por LC-MS/MS e busca de dados via MASCOT e PEAKS	27
6.3. Caracterização estrutural das proteínas identificadas	34
6.4. Caracterização funcional das proteínas identificadas.....	45

7. CONCLUSÕES.....	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
ANEXO 1	70
ANEXO 2.....	93
ANEXO 3	99
ANEXO 4.....	107
ANEXO 5	109
ANEXO 6	118

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição das proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato <i>A. sculptum</i> em relação às faixas de cobertura dos peptídeos.....	33
Tabela 2: Isoformas de vitelogeninas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i>	39
Tabela 3: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i> não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 1).	70
Tabela 4: Proteínas identificadas em glândulas salivares de fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i> não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 2).	93
Tabela 5: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos de carrapatos <i>A. sculptum</i> não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 3).	99
Tabela 6: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i> preditas como de membrana (Anexo 4).	107
Tabela 7: Proteínas identificadas em glândulas salivares detectadas apenas em machos e fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i> não alimentados, classificadas como secretadas putativas por via clássica ou não clássica. Nas colunas N-Glyc e O-Glyc trata-se da presença predita de sítios de glicosilação nas proteínas (Anexo 5).	109
Tabela 8: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos <i>A. sculptum</i> classificadas funcionalmente como “Putative Secreted Proteins” e “Putative Housekeeping Proteins” (Anexo 6).	118

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspectos morfológicos de glândulas salivares de fêmeas de <i>Amblyomma cajennense</i> parcialmente ingurgitadas.	10
Figura 2: Diagrama esquemático resumindo as abordagens empregadas neste trabalho.	17
Figura 3: Processamento do extrato proteínas totais de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> pela estratégia SGF.	26
Figura 4: Processamento do extrato proteínas totais de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> pela estratégia SGNF.	27
Figura 5: Agrupamento das proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i>	30
Figura 6: Sequências das isoformas do grupo da actina (S5FY84, D4HTS7 e Q58NQ6) identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i>	31
Figura 7: Sequências das isoformas do grupo da actina (G3MLM7, B5SUT6 e D9YST8) identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i>	32
Figura 8: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , distribuídas por faixas de percentual de cobertura.	34
Figura 9: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , distribuídas pela massa molecular teórica e pelo ponto isoelétrico predito.	36
Figura 10: Imagem virtual de um SDS-PAGE 2DE separando as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos <i>A. sculptum</i>	38
Figura 11: Imagem virtual de um SDS-PAGE 2DE separando as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos fêmeas de <i>A. sculptum</i> , com destaque para as isoformas do grupo das vitelogeninas.	38
Figura 12: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , preditas como secretadas ou com hélices transmembrana.	43
Figura 13: Sítios de N- e O-glicosilação preditos para as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , usando os aplicativos NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 4.0 e big PI Predictor.	45

Figura 14: Classificação funcional das proteínas identificadas em glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , usando as proteínas de eucariotos anotadas no KOG.	47
Figura 15: Proteínas identificadas de glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapato <i>A. sculptum</i> , classificadas funcionalmente em “putative secreted proteins” e “putative housekeeping proteins”.	48
Figura 16: Proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , classificadas “putative secreted proteins”.	49
Figura 17: Proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> , classificadas “putative housekeeping proteins” e dividida em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem.	54
Figura 18: Proteínas identificadas de glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapato <i>A. sculptum</i> , classificadas funcionalmente em “putative housekeeping proteins”, distribuídas conforme o gênero onde foram detectadas.	57

ABREVIATURAS

DBB: Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular

BOD: Demanda biológica de oxigênio

BSF: Brazilian Spotted Fever

FMB: Febre maculosa brasileira

GMF: Grupo da febre maculosa

GT: Grupo do tifo

LAPEM: Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular

PBS: Solução de fosfato tamponada

RMSF: Rocky Mountain Spotted Fever

SDS: Dodecil sulfato de sódio

PAGE: Eletroforese em gel de Poliacrilamida

UFV: Universidade Federal de Viçosa

LC: Cromatografia Líquida

MS: Espectrometria de massas

MS/MS: Técnica de espectrometria de massas “*in tandem*”, utilizando dois ou mais analisadores. Também pode ser denominada MS2.

LC-MS: Técnica hifenada de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas.

Q-TOF: Analisadores quadrupolo e TOF “*in tandem*”.

TOF: Analisador de tempo de voo.

RESUMO

BARROS, Edvaldo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, maio de 2016. **Análise proteômica de glândulas salivares do carrapato *Amblyomma sculptum***. Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Coorientadores: Humberto Josué de Oliveira Ramos e Leandro Licursi de Oliveira.

Os carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios de grande importância médica e veterinária. Estes artrópodes tem desenvolvido adaptações evolutivas que permitem aos mesmos a sobrevivência por longos períodos de tempo sem se alimentarem ou que, após se alimentarem até a ingurgitação, vivam com a presença de altos níveis de substâncias que estimulam o estresse oxidativo. Além disso, apresentam uma anatomia bem conciliada ao seu modo de vida e aquisição de alimentos. Dentre os principais órgãos do carrapato, as glândulas salivares apresentam grande repertório de proteínas, que desempenham papéis essenciais para o seu desenvolvimento e para a manutenção de sua relação com os hospedeiros vertebrados. Essas proteínas também podem facilitar a transmissão de agentes patogênicos aos hospedeiros. Nesse projeto, o sialome do carrapato *Amblyomma sculptum* foi analisado utilizando cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas. Essa abordagem combinada permitiu a identificação de 501 proteínas, das quais, aproximadamente, 15% foram classificadas como proteínas secretadas putativas. As classes do grupo de proteínas secretadas putativas que mais se destacaram foram: a) família das proteínas ricas em glicina; b) família das enzimas secretadas e c) ferritinas. As proteínas ricas em glicina podem desenvolver várias funções, dentre elas, a formação do cone de cemento e a resposta a estresse. Proteínas vinculadas com o citoesqueleto, com a maquinaria de modificação proteica e com o transporte intracelular também foram identificadas, as quais foram reunidas no grupo “putative housekeeping proteins”. A diferença na abundância das proteínas entre os gêneros macho e fêmea, encontradas nas glândulas salivares dos carrapatos *A. sculptum*, foi indicada pela identificação de proteínas em apenas um dos sexos. As proteínas ricas em glicina, do citoesqueleto e

chaperonas foram identificadas em maior número em machos do que em fêmeas, sugerindo que esse gênero esteja melhor preparado para a produção de cemento, resposta ao estresse, modificação proteica e transporte intracelular do que as fêmeas. A caracterização funcional das proteínas permitiu uma correlação dentro de um contexto biológico e facilitou um melhor entendimento sobre o sialome de carrapatos *A. sculptum*. Essa informação pode auxiliar na identificação de novos candidatos a alvos para o controle de carrapatos, no entanto, estudos adicionais devem ser realizados com o objetivo de melhorar o conhecimento das vias de controle das diferentes funções celulares.

ABSTRACT

BARROS, Edvaldo, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, May, 2016. **Proteomic analysis of salivary glands from the tick *Amblyomma sculptum***. Advisor: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira. Co-advisors: Humberto Josué de Oliveira Ramos and Leandro Licursi de Oliveira.

Ticks are obligate hematophagous arthropods of great medical and veterinary importance. These arthropods have developed evolutionary adaptations that allow them to survive for long periods of time without feeding or, after feeding until engorgement, live with the presence of high levels of substances that stimulate oxidative stress. In addition, they have an anatomy well reconciled for their way of life and food acquisition. Among the major organs of the tick, the salivary glands contain a large repertoire of proteins, which play essential roles for the tick's development and for the maintenance of their relationship with their vertebrate hosts. These proteins may also facilitate the transmission of pathogens to the host. In this project, the sialome of the *Amblyomma sculptum* tick was analyzed using liquid chromatography coupled with mass spectrometry. This combinatorial approach allowed for the identification of 501 proteins, of which approximately 15% were classified as putative secreted proteins. The classes of the group of putative secreted proteins that most stood out were: a) family of glycine-rich proteins; b) family of secreted enzymes; and c) ferritins. Glycine-rich proteins can perform several functions, including cement cone formation and stress response. Proteins linked to the cytoskeleton, the protein modification machinery and intracellular transport were also identified, which were classified in the putative housekeeping proteins group. The difference in the abundance of the proteins between the male and female gender found in the salivary glands of *A. sculptum* ticks was indicated by the identification of proteins in only one sex. Glycine-rich, cytoskeletal and chaperon proteins were identified in greater numbers in males than in females, suggesting that the male gender is better prepared for cement production, stress response, protein modification and intracellular

transport than females. The functional characterization of the proteins allowed a correlation within a biological context and facilitated a better understanding of the sialome of *A. sculptum* ticks. This information may aid in the identification of novel candidates for tick control; however, additional studies should be carried out in order to better understand the pathways that control with the different cellular functions.

1. Introdução e Justificativa

Os carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios pertencentes à ordem Acari e classe Arachnida, amplamente distribuídos nos mais diversos ecossistemas, em todos os continentes do globo, exceto no continente Antártico (Parola and Raoult, 2001). Capazes de parasitar uma ampla gama de hospedeiros vertebrados, constituem o segundo principal grupo de agentes vetores de importância médica e veterinária, ficando atrás apenas dos culicídeos (Massard & Fonseca, 2004).

Dentre as principais espécies de carrapatos de importância médico-veterinária, destaca-se o *Amblyomma sculptum*, pertencente ao complexo do *A. cajennense*, o qual é amplamente encontrado nas regiões do Norte da Argentina, Bolívia e Paraguai (Oliveira *et al.*, 2000; Camargo-Neves, *et al.*, 2004; Barros-Battesti, *et al.*, 2006; Nava *et al.*, 2014).

Popularmente conhecido como carrapato-estrela ou micuim, o *A. sculptum* apresenta ampla versatilidade parasitária, sendo capaz de infestar naturalmente um grande número de espécies de vertebrados silvestres e domésticos, inclusive o homem (Camargo-Neves, *et al.*, 2004).

No Brasil, este carrapato apresenta uma vasta distribuição em seu território, sobretudo nas regiões Sul e Sudeste (Camargo-Neves *et al.*, 2004; Nava *et al.*, 2014), com presença em diversos ecossistemas brasileiros.

As glândulas salivares são órgãos que apresentam grande importância para o desenvolvimento do carrapato. Para manterem-se vivos, quando não fixados a um hospedeiro vertebrado, os carrapatos produzem uma solução hipertônica em suas glândulas salivares, essa solução é então secretada para a parte externa do hipostoma, permitindo a captação da umidade do ar, a qual é ingerida pelo artrópode mantendo-o vivo. Além disso, quando os carrapatos iniciam sua alimentação, esse órgão produz inúmeras moléculas envolvidas na fixação sobre a pele dos hospedeiros, bem como outras com o objetivo de controlar as respostas hemostática, inflamatória e imune desses, dentre outras funções (Francischetti *et al.*, 2010).

Em carrapatos, tem-se documentado alterações em suas glândulas salivares decorrentes de mudanças no padrão da expressão gênica desses órgãos, durante o repasto sanguíneo, garantindo sucesso em seu desenvolvimento durante a fase parasitária, bem como sua capacidade de transmissão de patógenos para o hospedeiro (Kovar, 2004; Anatriello et al., 2010; Francischetti et al., 2010; Maruyama et al., 2010). Durante o repasto sanguíneo, ocorre a secreção de uma complexa mistura de biomoléculas, denominada saliva, a qual é constituída principalmente de proteínas, com funções anticoagulantes e vasodilatadores, dentre outras funções, as quais favorecem e garantem o sucesso alimentar desses ácaros. Caso o carrapato esteja infectado com algum patógeno, neste momento, pode ocorrer a transmissão para o hospedeiro (Francischetti et al., 2010).

Existem vários relatos na literatura a respeito da composição salivar e da alteração de expressão de componentes da mesma em outros artrópodes hematófagos como barbeiros (Santos et al., 2007; Assumpção et al., 2008) e mosquitos (Arcà et al., 2005; Calvo & Ribeiro, 2006; Calvo et al., 2007). No entanto, com relação a carrapatos, os estudos quanto ao sialoma e sialoproteoma ainda se encontram em fase inicial.

Na tentativa de entender melhor a interface entre o carrapato *A. sculptum* e seus hospedeiros vertebrados, este trabalho teve como principal objetivo estudar por meio de uma abordagem proteômica as glândulas salivares deste carrapato sob condição de restrição de alimentação. Esperamos com estudos sob estas condições, que os resultados obtidos permitam ampliar o nosso conhecimento quanto as proteínas com diferença de abundância nessa espécie de carrapato e, conseqüentemente, quanto às vias metabólicas e maquinaria envolvida na fisiologia entre os gêneros macho e fêmea, sujeitos à restrição alimentar.

Para a realização deste estudo, propomos a utilização de uma abordagem proteômica denominada “*Shotgun*”, a qual combina tecnologias como a eletroforese monodimensional (SDS-PAGE-1D) associada com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e a utilização de ferramentas de bioinformática, que juntas, permitirão identificar

e caracterizar as proteínas mais abundantes nas glândulas salivares do carrapato *A. sculptum*, comparando o repertório dessas proteínas entre os gêneros dessa espécie, sob restrição alimentar. Além de possibilitarem a obtenção de informações inéditas sobre a biologia deste ácaro identificando possíveis alvos moleculares que possam dirigir o controle desse ácaro e dos patógenos que o mesmo possa transmitir.

2. Revisão da Literatura

2.1. Aspectos morfológicos e taxonômicos dos carrapatos

Os carrapatos são artrópodes hematófagos obrigatórios pertencentes à ordem Acari, classe Arachnida, subclasse Ixodida (Dantas-Torres *et al.*, 2009). Várias espécies de carrapatos já foram descritas, as quais encontram-se distribuídas em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae, cujos representantes das duas primeiras são conhecidos popularmente como carrapatos duros e moles, respectivamente. A última família é representada por apenas uma espécie, *Nuttalliella namaqua*, a qual é encontrada somente no Continente Africano, apresentando características intermediárias entre as famílias Ixodidae e Argasidae (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

No Brasil, diversas espécies endêmicas de carrapatos foram descritas em todo o seu território, as quais estão distribuídas entre vários gêneros diferentes, tais como: *Argas*; *Antricola*; *Carios*; *Ornithodoros*; *Amblyomma*; *Dermacentor*; *Haemaphysalis*; *Ixodes* e *Rhipicephalus* (Dantas-Torres *et al.*, 2009).

Dentre os órgãos internos destes ácaros, as glândulas salivares estão envolvidas na manutenção do equilíbrio hidrodinâmico do carrapato, produzindo e secretando inúmeras substâncias que atuam em sua fixação na pele do hospedeiro vertebrado e na modulação de suas respostas imune e hemostática deste último, durante a hematofagia (Sonenshine & Roe, 2014).

2.2. Ciclo de vida do carrapato *Amblyomma sculptum*

Dado a sua versatilidade parasitária, o carrapato *A. sculptum* (Complexo *Amblyomma cajennense*) é a espécie que atua como principal transmissor da febre maculosa e de outras zoonoses de importância médico-veterinária. Podendo alimentar-se de uma ampla gama de vertebrados silvestres, domésticos e, inclusive, do homem, do ponto de vista epidemiológico, o *A. sculptum* desempenha papel significativo na

disseminação de diversas zoonoses de grande importância para a saúde pública (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

Necessitando de três hospedeiros para completar o seu ciclo de vida, o *A. sculptum* é classificado como carrapato heteroxeno. Esta característica, juntamente com a sua baixa especificidade parasitária, faz deste carrapato um agente marcante na transmissão de patógenos para diversos hospedeiros vertebrados, bem como em sua atuação como potenciais reservatórios de diferentes patógenos. Essa conjuntura confere ao *A. sculptum* notável relevância zoonótica para a saúde pública (Guglielmone *et al.*, 2006).

2.3. Aspectos ecológicos e zoonóticos do *A. sculptum* no Brasil

Os carrapatos são ectoparasitas de grande importância para a saúde pública, constituindo o segundo principal grupo de vetor na transmissão de agentes infecciosos ao homem e animais silvestres e domésticos, principalmente, bactérias, protozoários e vírus. Muitas espécies de carrapatos estão associadas com hospedeiros específicos e seus habitats, o que pode não representar perigo imediato para a saúde animal e humana. Entretanto, devido a colonização de extensas regiões, alterações ambientais em larga escala, migrações naturais ou forçadas de diversos hospedeiros vertebrados, como mamíferos e aves, a maioria desses artrópodes diversificou o seu modo de vida, com isso, ocorreu a diminuição da especificidade quanto a hospedeiros e o aumento da disseminação de patógenos (Massard & Fonseca, 2004).

Uma das espécies mais difundidas nas Américas, sendo encontrado em uma extensa região, que vai do sul dos EUA, passando pela América Central e Brasil (especialmente na região Sudeste), chegando até o Norte da Argentina (Barros-Battesti *et al.*, 2006; Dantas-Torres *et al.*, 2009), o carrapato *A. sculptum*, popularmente conhecido como carrapato-estrela, apresenta elevada afinidade para o parasitismo em humanos, sendo considerado o mais importante transmissor da *R. rickettsii* ao homem. *R. rickettsii* é uma alfa-proto-bactéria altamente patogênica, causadora da febre

maculosa Brasileira (FMB), doença de elevada letalidade, considerada pelo Ministério da Saúde como agravo de notificação compulsória, desde 2002 (Brasil/MS, 2009).

Embora no estágio adulto, o *A. sculptum* prefira parasitar mamíferos de médio e grande porte, como equinos, bovinos, antas, capivaras, dentre outros, esta espécie pode ser encontrada infestando animais domésticos como cães, gatos, coelhos e cabras. Existem relatos de infestação por *A. sculptum* em outros grupos de animais, como aves domésticas e silvestres, bem como em répteis e anfíbios, cuja infestação dos últimos não é considerada comum (Barros-Battesti *et al.*, 2006).

Do ponto de vista reprodutivo, uma única fêmea ingurgitada de *A. sculptum*, após a fecundação pode ovipor entre 5.000 a 10.000 ovos, os quais demoram cerca de 30 dias para eclodirem (Guglielmone *et al.*, 2006). Devido a sua elevada capacidade de oviposição, esta espécie apresenta um grande potencial de manutenção e amplificação de alguns patógenos.

Larvas do *A. sculptum*, conhecidas popularmente como micuim, após o amadurecimento de seu exoesqueleto sobem nas folhas do capim, formando grandes aglomerados ficando à espera da passagem de um hospedeiro vertebrado. No hospedeiro, estas larvas se alimentam por um período de 3 a 7 dias e voltam a cair no solo, onde sofrem ecdise para o estágio de ninfa. Com um período de pré-muda, que pode levar de 4 a 8 semanas, após 15 dias da muda, as ninfas estarão ativas na vegetação em busca de um novo hospedeiro. Neste novo hospedeiro, as ninfas se alimentam por um período entre 3 a 7 dias e, novamente, caem ao solo, permanecendo lá em processo de muda para o estágio adulto, por um período entre 4 a 8 semanas. Assim que o exoesqueleto tornar-se endurecido (cerca de duas semanas após a muda), os adultos estarão aptos para infestar outro hospedeiro vertebrado, no entanto, podem permanecer vários meses sem alimentação. Em um período de 7 a 10 dias após a fecundação, a fêmea do *A. sculptum* inicia o ingurgitamento sanguíneo, desprendendo-se e caindo ao solo, para a realização da oviposição. Com a eclosão dos ovos e a geração das larvas, o ciclo do *A. sculptum* é finalizado.

Quanto aos machos, estes permanecem sobre o hospedeiro vertebrado entre 3 a 4 semanas, alimentando-se e fecundando outras fêmeas (Guglielmone *et al.*, 2006).

Além do papel vetorial durante o repasto sanguíneo em hospedeiros vertebrados susceptíveis, podendo transmitir agentes patogênicos tanto transestadial quanto transovarianamente, o *A. sculptum* é considerado como o principal reservatório de riquetsias potencialmente patogênicas (Guglielmone *et al.*, 2006; Cunha *et al.*, 2007).

2.4. Relação carrapato-patógeno, tendo por modelo a relação carrapato-riquetsia-hospedeiro vertebrado

As riquetsias penetram na célula hospedeira por meio de receptores de membrana específicos. Dentro das células de carrapatos vetores, estas bactérias podem multiplicar-se em células do intestino, ovários, glândulas salivares, túbulos de Malpighi e hemolinfa (Walker *et al.*, 2003). A penetração de algumas riquetsias é marcada, primeiramente, pela sua adesão na célula hospedeira, sendo a parede celular das riquetsias do GFM composta por proteínas externas, peptidoglicanas e membrana citoplasmática (Williams *et al.*, 1986), dentre elas a proteína externa de membrana OmpA (*Outer Protein Membrane A*), a qual realiza interação com seu receptor específico, localizado na membrana da célula hospedeira, induzindo a ocorrência de rearranjos no citoesqueleto desta, o que promove a adesão e entrada da riquetsia (Walker *et al.*, 2003), em mecanismo ainda não completamente esclarecido. Estudos realizados com *R. prowazekii* mostraram que, nesta espécie, a infecção da célula hospedeira envolve a fosfolipase A, observando a liberação de grande quantidade de fosfatidatos e ácidos graxos livres para o meio de cultura, após a infecção com essas riquetsias (Gaywee *et al.*, 2002).

Por meio das interações entre proteínas específicas, tanto do patógeno quanto da célula hospedeira, as riquetsias induzem um processo de fagocitose pelas células hospedeiras e conseguem penetrar no interior das mesmas (Walker & Winkler, 1978). No interior da célula hospedeira, por

meio de um processo não totalmente desvendado, as bactérias escapam rapidamente da vesícula do fagossoma para o citosol, antes da formação do vacúolo digestivo (Teyssie *et al.*, 1995). Sugere-se que esse mecanismo possa ser similar ao da infecção da *R. conorii*, onde a proteína OmpB, antígeno mais abundante nas membranas das riquetsias, se associa fisicamente com a proteína Ku70, supostamente induzindo o processo de fagocitose (Martinez *et al.*, 2005). O envolvimento de fosfolipases durante o escape da bactéria da vesícula endocítica tem sido proposto por alguns autores (Winkler & Miller, 1982; Silverman *et al.*, 1992).

Como citado anteriormente, as riquetsias podem parasitar tanto as células de hospedeiros vertebrados quanto de invertebrados, sendo propagadas nesses últimos por meio de mecanismos de transmissão transovarianos ou transestadiais. Sugere-se que a diferença de gravidade dos quadros clínicos da febre maculosa em humanos, esteja associada com os diversos níveis de virulência que a *R. rickettsii* apresenta ao longo dos diferentes estádios de desenvolvimento de seu carrapato vetor (Walker *et al.*, 2003).

Com relação ao carrapato vetor, no Brasil, as principais espécies transmissoras de riquetsias patogênicas para o homem são do gênero *Amblyomma*, destacando o *A. cajennense* e o *A. aureolatum* (Labruna, 2009), enquanto nos EUA, os vetores são dos gêneros *Dermacentor*, destacando o *D. andersonii* e *D. variabilis*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* (Walker *et al.*, 2003). De forma geral, existem outras formas de transmissão das riquetsias, no entanto, a principal é por meio de artrópodes vetores, cujos principais representantes são os carrapatos.

Neste contexto, faz-se necessário um melhor entendimento dos processos bioquímicos e moleculares, conhecendo-se as vias de sinalização responsáveis pela entrada e desenvolvimento da riquetsia nas células hospedeiras e sua fuga do fagossoma, buscando-se ampliar o conhecimento sobre as interações hospedeiro-patógeno. Dentre possibilidades decorrentes destes estudos, vislumbra-se também a descoberta de alvos para drogas ou outras substâncias que tenham por finalidade o controle do desenvolvimento

riquetsial na célula hospedeira, diminuindo o risco dos hospedeiros vertebrados manifestarem riquetsioses.

2.5. Principais diferenças entre glândulas salivares de carrapatos ixodídeos machos e fêmeas

Os aspectos morfológicos entre as glândulas salivares de carrapatos ixodídeos apresentam distinção entre machos e fêmeas. Em geral, as glândulas salivares de ambos os gêneros são constituídas de três tipos de ácinos, denominados I, II e III, além do ácino tipo IV, o qual está presente apenas em machos dessa família de carrapatos (Sonenshine & Roe, 2014). Os ácinos tipos I, II e III foram observados em análise estrutural de glândulas salivares de fêmeas e machos de *A. cajennense* não alimentados (Olivieri & Serra-Freire, 1992; Serra-Freire & Olivieri, 1993). Apesar do seu tamanho diminuto e da difícil distinção, o ácino tipo IV também foi observado em glândulas salivares de machos de *A. cajennense* não alimentados (Serra-Freire & Olivieri, 1993), evidenciando essa diferença morfológica entre as glândulas salivares de machos e fêmeas dessa espécie de carrapato. Em análise das alterações morfológicas das glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* em três estágios de alimentação (não alimentado, parcialmente e totalmente ingurgitado), observou-se que dentre os três tipos de ácinos, apenas os tipos II e III sofreram alterações significativas no decorrer do repasto sanguíneo. O ácino tipo II aumentou o seu volume durante o estágio parcialmente ingurgitado, enquanto o volume do ácino tipo III foi reduzido, quase por completo, no decorrer dos estágios alimentares (Nunes *et al.*, 2008). Recentemente, o táxon *A. cajennense* foi reclassificado como um complexo, o qual abrange várias espécies, dentre elas a *A. sculptum* (Nava *et al.*, 2014).

Os tipos de ácinos que constituem as glândulas salivares de fêmeas e machos do carrapato *A. cajennense* podem ser representados conforme a figura 1. Uma análise histoquímica de glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense* parcialmente ingurgitadas revelou que o ácino tipo

II é a estrutura que está mais envolvida na produção de carboidrato (Figura 1C), proteína (Figura 1D) e lipídio (Figura 1E) (Denardi *et al.*, 2011).

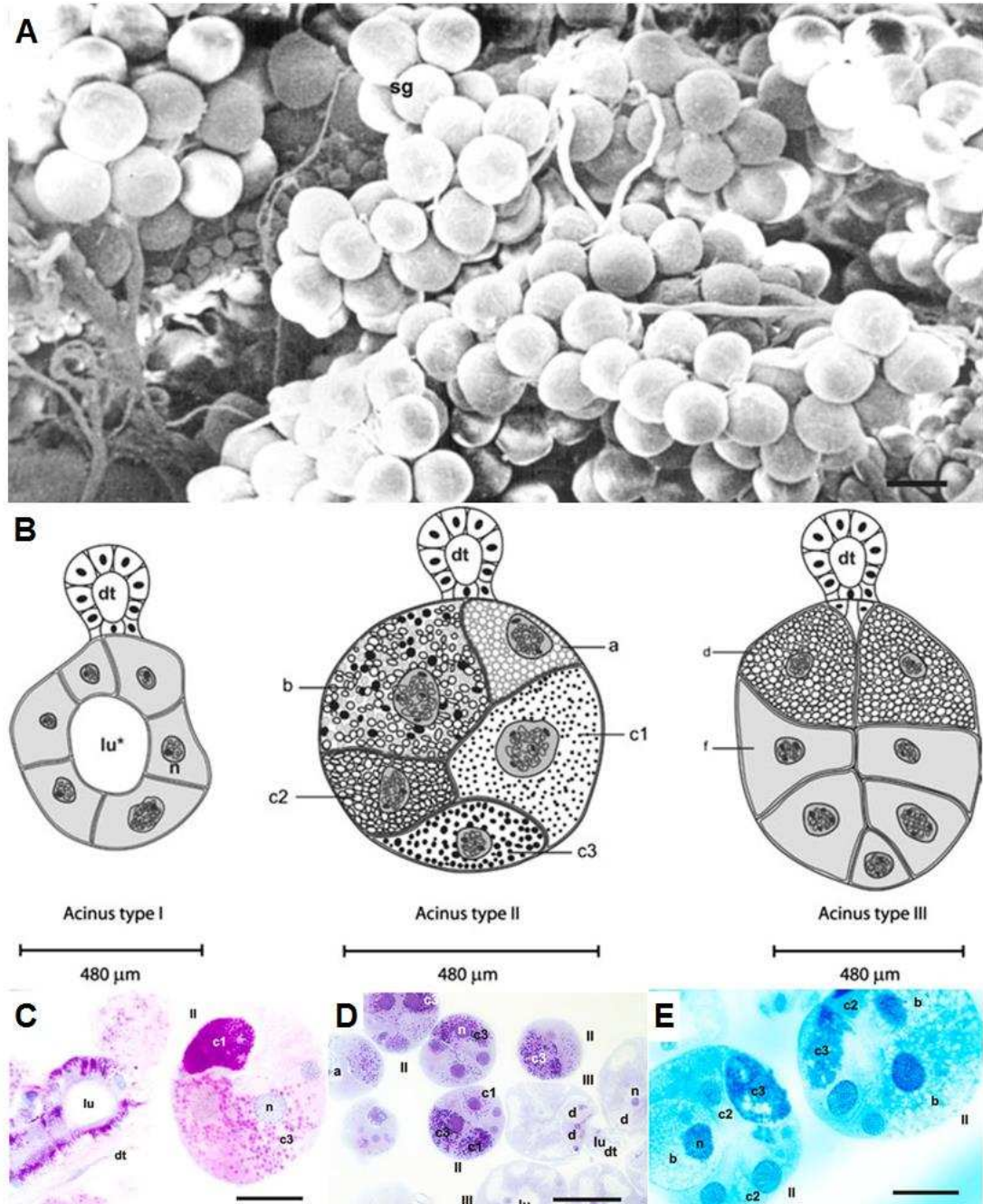


Figura 1: Aspectos morfológicos de glândulas salivares de fêmeas de *Amblyomma cajennense* parcialmente ingurgitadas. (A) Micrografia eletrônica de varredura das glândulas salivares (barra = 200µm); (B) Representação esquemática dos tipos de ácidos constituintes dessas glândulas salivares (barras = 480µm); (C) Corte histológico de glândulas

salivares demonstrando a reação de PAS (barra = 200 μ m); (D) Corte histológico de glândulas salivares demonstrando a reação com o azul de bromofenol (barra = 500 μ m); (E) Corte histológico de glândulas salivares demonstrando a reação com a azul do Nilo (barra = 200 μ m). Abreviações (sg = glândulas salivares; dt = ductos; lu = lúmen; n = núcleo; a, b, c1, c2 e c3 = tipos celulares do ácino II; d, f = tipos celulares do ácino III) (Adaptado de Denardi et al., 2011).

Em geral, os ácinos do tipo I são caracterizados como agranulares, com a presença abundante de mitocôndrias e vacúolos, podendo ser encontrados em todos os estádios de vida de carrapatos ixodídeos. Essas estruturas estão relacionadas, principalmente, com a produção de substâncias vinculadas com a fixação do carrapato na pele do hospedeiro, com a produção de energia e com a osmorregulação (Needham *et al.*, 1990; Sonenshine & Roe, 2014). Em machos ixodídeos, a taxa de secreção do ácino tipo I é reduzida em relação às fêmeas, sugerindo que essa estrutura não está vinculada com a osmorregulação nos mesmos (Sauer *et al.*, 1995). Os ácinos tipo II e III são estruturas granulares, com células especializadas na síntese de substâncias vinculadas com a fixação do carrapato e com a modulação das respostas inflamatórias, imune e hemostática do hospedeiro, facilitando a hematofagia exercida por esses artrópodes (Sonenshine & Roe, 2014). Ácinos tipo IV são classificados como granulares e estão vinculados com a reprodução, sintetizando e secretando substâncias associadas com a lubrificação e transferência do espermátóforo para a fêmea durante o acasalamento (Sauer *et al.*, 1995).

Com o desenvolvimento de técnicas e métodos voltados para a análise das “ômicas”, várias moléculas têm sido identificadas e caracterizadas nas glândulas salivares de carrapatos, as quais desempenham diversos papéis, dentre eles, os principais são: formação do cone de cimento, o qual mantém contato direto com o sangue do hospedeiro e recebe, constantemente, pressões das respostas do sistema imune deste (Bullard *et al.*, 2016). Além disso, uma série de moléculas com atividade anti-hemostática, anti-coagulante, vasodilatadoras, analgésicos,

moduladoras da agregação plaquetária e do sistema imune do hospedeiro, dentre outras (Franciscetti *et al.*, 2010; Maruyama *et al.*, 2010; Chmelar *et al.*, 2015; Karim & Ribeiro, 2015).

2.6. Utilização da abordagem proteômica para o estudo de carrapatos

Os carrapatos são ectoparasitas hematófagos, que produzem em suas glândulas salivares inúmeras moléculas, as quais favorecem sua fixação e alimentação no hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo (Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007; Francischetti *et al.*, 2008). Adicionado a este fato, a possibilidade de vários patógenos estimularem a expressão de moléculas específicas que visam facilitar seu desenvolvimento neste hospedeiro, bem como sua transmissão para o hospedeiro vertebrado (Villar *et al.*, 2010). Neste sentido, estudos recentes têm sugerido que a identificação dessas moléculas pode vir a proporcionar um melhor entendimento na interface patógeno-carrapato-hospedeiro vertebrado, propiciando o desenvolvimento de estratégias de controle tanto do artrópode, quanto do agente infeccioso a ele associado (Renesto *et al.*, 2006; Rachinsky *et al.*, 2008; Ribeiro *et al.*, 2011).

A identificação das proteínas e o nível de expressão destas podem ser feitas por meio de abordagens proteômicas (Fei-Yu *et al.*, 2009), bem como podem ser preditas por meio de abordagens transcriptômicas (Alarcon-Chaidez *et al.*, 2007; Anatriello *et al.*, 2010). Diversas metodologias dentro de uma abordagem proteômica tem sido citadas para o estudo da abundância protéica em carrapatos, dentre as quais, a separação das proteínas por eletroforese bidimensional ou por técnicas cromatográficas, seguida pela identificação das mesmas por espectrometria de massas, utilizando analisadores *in tandem* com alta capacidade de resolução, como o MALDI TOF-TOF ou o ESI QqTOF. Estas ferramentas permitem uma visão mais nítida a respeito das proteínas expressas por um determinado patógeno, ou sobre a ação deste (Lin *et al.*, 2011), permitindo a identificação de fatores de virulência em suas diferentes cepas (Jacobs *et al.*, 2005; Chao

et al., 2007), e até mesmo, a caracterização de modificações pós-traducionais de uma dada proteína (Chao *et al.*, 2004).

Além da abundância diferencial, a caracterização das proteínas identificadas em uma determinada espécie de carrapato, aumenta o número de informações depositadas em bancos de dados para esses ácaros (Oleaga *et al.*, 2007).

Buscando ampliar o conhecimento sobre a caracterização molecular das glândulas salivares do carrapato *A. sculptum* e avaliar as possíveis diferenças do sialoma entre machos e fêmeas não alimentados, propusemos este estudo utilizando abordagem proteômica para avaliação das proteínas mais abundantes, das vias metabólicas e da maquinaria bioquímica presentes nas glândulas salivares deste carrapato.

3. HIPÓTESE

A utilização de tecnologias como a eletroforese monodimensional (SDS-PAGE-1D) associada com a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e a utilização de ferramentas de bioinformática permitirão identificar e caracterizar as proteínas mais abundantes nas glândulas salivares do carrapato *A. sculptum*, possibilitando a comparação entre o repertório dessas proteínas presentes nas glândulas salivares de fêmeas e machos dessa espécie, sob restrição alimentar. Essas informações poderão contribuir para o melhor entendimento sobre a biologia deste importante vetor, bem como de possíveis eventos moleculares que possam indicar candidatos a alvos de controle dessa espécie.

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar proteínas expressas em glândulas salivares de *A. sculptum* machos e fêmeas não alimentados, por meio do uso de abordagens proteômicas, visando avaliar a diferença na abundância proteica presente nesse órgão, em ambos os gêneros.

4.2. Objetivos específicos

4.2.1. Extrair as proteínas mais abundantes em glândulas salivares de *A. sculptum* machos e fêmeas não alimentados e submetê-las à diferentes estratégias de separação das mesmas, visando a identificação por espectrometria de massas;

4.2.2. Sequenciar os peptídeos tripticos mais abundantes das proteínas de glândulas salivares de *A. sculptum*, utilizando duas plataformas diferentes de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS);

4.2.3. Identificar as proteínas mais abundantes em glândulas de *A. sculptum* por confronto entre a lista de peptídeos tripticos sequenciados e bancos de dados anotados no UNIPROT, utilizando dois algoritmos distintos;

4.2.4. Caracterizar estruturalmente as proteínas identificadas de glândulas salivares de machos e fêmeas de *A. sculptum*, utilizando aplicativos de predição para as características de massa molecular, ponto isoelétrico, presença de peptídeo sinal, possibilidade de secreção por via clássica e não-clássica e modificações pós-traducionais a nível de glicosilação;

4.2.5. Caracterizar funcionalmente as proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum*, confrontando a sequência das mesmas contra um conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG;

4.2.6. Avaliar a ocorrência de diferença de abundância entre as proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum*.

5. Material e Métodos

Resumidamente, as estratégias abordadas estão esquematizadas na Figura 2.

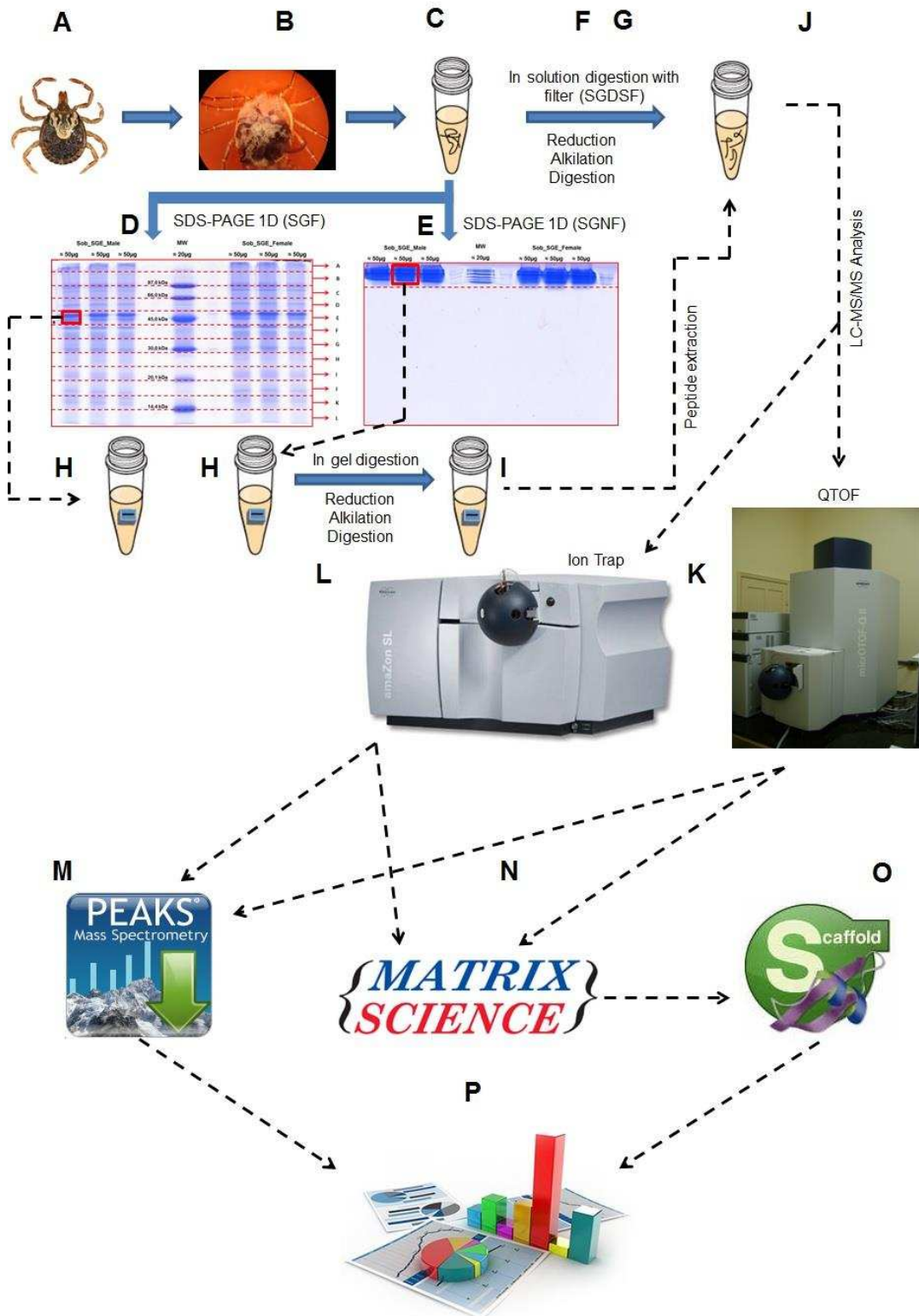


Figura 2: Diagrama esquemático resumindo as abordagens empregadas neste trabalho. (A) obtenção dos carrapatos; (B) dissecação das glândulas salivares; (C) extração das proteínas totais das glândulas salivares; processamento das proteínas por SDS-PAGE-1D totalmente fracionado (D) e não fracionado (E); processamento das proteínas livre de gel (F); digestão das proteínas em solução com filtro (G); excisão das proteínas dos géis (H); digestão das proteínas em gel (I); recuperação dos peptídeos trípticos (J); análise dos peptídeos trípticos por LC-MS/MS QTOF (K) e Ion Trap (L); identificação da proteínas por banco de dados por meio do PEAKS (M) e MASCOT (N); validação dos resultados do MASCOT pelo SCAFFOLD (O); avaliação dos resultados e caracterização estrutural das proteínas (P).

5.1. Obtenção dos carrapatos e dissecação das glândulas salivares

Foram usados 360 carrapatos adultos da espécie *A. sculptum*, da mesma idade, os quais foram obtidos de colônias mantidas no Laboratório de Ixodologia, no Departamento de Medicina Veterinária da UFU e, posteriormente, separados em dois grupos, machos e fêmeas, na proporção de 1:1. Até o momento da dissecação das glândulas salivares, os carrapatos foram mantidos em estufa B.O.D. no Laboratório de Epidemiologia Molecular do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da UFV, sob condições de temperatura e fotoperíodo controlados, como previamente descrito por Bechara et al. (1995).

A dissecação das glândulas salivares de *A. sculptum* ocorreu conforme descrito por Anatriello et al. (2010), com algumas modificações. Resumidamente, os carrapatos foram dissecados em microscópio estereoscópico SMZ-140 com fonte de luz direta (Motic, China), sempre umidificados por solução de PBS-1X gelada, pH 7,4. As glândulas salivares coletadas foram acondicionadas em solução de lise (Ureia 7M, Tioureia 2M, CHAPS 4% e DTT 40mM), na proporção aproximada de 60 pares de glândulas para 100µL de solução, sendo as amostras armazenadas à -80°C até o uso.

5.2. Extração e quantificação das proteínas

A extração de proteínas totais das glândulas salivares foi processada como o descrito por Oleaga-Pérez et al. (1994). Brevemente, as glândulas salivares armazenadas foram descongeladas e sonicadas por meio de cinco pulsos com duração de seis segundos cada, a uma frequência de 70 Hz em um ultrassom modelo 4710 (Cole-Parmer, EUA). Cada ciclo foi intercalado por banho de gelo com duração de um minuto. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 18.000xg por 30 minutos à 4°C. O sobrenadante foi recuperado e identificado como extrato de glândulas salivares de machos e extrato de glândulas salivares de fêmeas. A concentração de proteínas totais de cada amostra foi determinada pelo método de Bradford (1976). As amostras foram armazenadas à -80°C até o uso.

5.3. Separação das proteínas e digestão enzimática

As proteínas totais de glândulas salivares de fêmeas e machos de carrapatos *A. sculptum* foram processadas por três abordagens diferentes na separação: (a) Imobilização e separação completa das proteínas em gel de SDS-PAGE 1D (Glândulas salivares fracionadas – SGF); (b) Imobilização sem separação das proteínas em gel de SDS-PAGE 1D (Glândulas salivares não fracionadas – SGNF); e (c) Proteínas dispersas em tampão de extração, não separadas (Glândulas salivares direcionadas para digestão em solução com filtro – SGDSF).

Utilizaram-se abordagens usando SDS-PAGE, retratando método tradicional de eletroforese monodimensional descrito por Laemmli (1970), sendo o gel de empilhamento na concentração de 4% e o de separação de 12%. Todas as abordagens tiveram suas amostras aplicadas em triplicatas para macho e fêmea, sendo aplicado nos géis 50µg de proteínas totais para cada canaleta. Em SGF as proteínas foram separadas totalmente em toda a extensão do gel de separação, enquanto, em SGNF as proteínas entraram cerca de seis milímetros no gel de separação. A detecção das proteínas em gel foi realizada utilizando o corante azul de Coomassie Brilhante (G250),

segundo o protocolo previamente descrito (GE Healthcare, 2004). Após a detecção das proteínas, na estratégia SGF, cada canaleta foi cortada em 12 pedaços de, aproximadamente, 6mm de espessura, enquanto em SGNF houve a formação de um único pedaço com, cerca de 6mm de espessura. Na estratégia SGDSF, 100µg de proteínas totais foram submetidas à digestão enzimática diretamente na solução, em triplicata para cada tratamento (macho x fêmea), utilizando um filtro para centrífuga Amicon® Ultra 0,5mL, com uma malha de 10k (Millipore, Alemanha), conforme descrito previamente por Wisniewski et al. (2009).

A digestão enzimática foi efetuada com tripsina de pâncreas suíno, indicada para utilização em proteômica, tratada com TPCK, referência T-6567(Sigma Aldrich, EUA). As digestões das proteínas oriundas das estratégias GSF e SGNF foram realizadas conforme o descrito por Shevchenko et al. (2006), com a concentração de tripsina de 25ng/µL e as proporções entre tripsina e proteínas totais de 1:20 e 1:40, respectivamente. Para a abordagem GSDSF a digestão procedeu conforme o descrito por Wisniewski et al. (2009), com algumas modificações. Resumidamente, as proteínas totais solubilizadas em solução de lise foram acondicionadas no filtro Amicon 10k, em seguida, foram reduzidas DTT 200mM e alquiladas com Iodoacetamida 200mM. As amostras foram centrifugadas a 10.000xg por 20 minutos, sendo os filtrados descartados. As amostras foram lavadas com solução de AMBIC 50mM e tratadas com solução de ureia 0,5M. Novamente, os filtrados foram descartados e as amostras lavadas com AMBIC 50mM. As amostras foram submetidas à digestão com solução de tripsina na concentração de 50ng/µL, procedendo em duas etapas. Na primeira, a digestão ocorreu na proporção de 1:40 (enzima/proteínas totais) por 16 horas a 37°C; na segunda etapa, o procedimento de digestão foi realizado na proporção de 1:10, considerando-se as mesmas condições de tempo e temperatura. Após a digestão, os peptídeos trípticos foram secos em centrífuga à vácuo, modelo AG-22331 (Eppendorf, Alemanha) e armazenados a -80C até o uso.

5.4. Espectrometria de Massas

Os peptídeos tripticos provenientes das digestões enzimáticas foram ressuspensos em 80µL de solução aquosa de ácido fórmico 0,1%, centrifugados a 20.000xg por 20 minutos, sendo 75µL dessa solução transferidos para frascos do amostrador. A aquisição de espectros de massas ocorreu de duas formas: Primeiramente, 20µL de cada amostra foram aplicados em um sistema LC-MS/MS, composto por um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo micrOTOF QII® - QTOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A análise cromatográfica das amostras ocorreram em uma coluna trap e uma coluna capilar Protecol C18 GHQ303 3,0µm – 300µm x 150mm, operando com uma taxa de fluxo de 4,5µL/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de uma agulha de ionização microESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizados para o programa de gradiente foram: água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), a programação iniciou por um passo de dessalinização com a manutenção de 5% de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 14 min. Em seguida, um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% da solução acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 30min, 50% durante 5min, rampa de subida linear partindo de 50% até 90% durante 3min, 90% durante 2min, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% durante 3min, seguido pela manutenção a 10% durante 3min. O escaneamento dos íons ocorreu no modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 100 e 2000m/z e MS2 entre 70 e 2000 m/z. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 60 min. O espectrômetro de massas QTOF foi operado no modo auto-MSn, o qual adquiriu espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples. Após o término das análises no micrOTOF QII, 10µL do volume restante de cada amostra foram aplicados em outro sistema LC-MS/MS, composto de um UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas modelo Amazon Ion Trap® (Bruker Daltonics, Alemanha). As amostras foram submetidas a uma análise

cromatográfica em uma coluna trap e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 μ m – 100 μ m x 100mm, operando com uma taxa de fluxo de 0.400 μ L/min. Os peptídeos foram eluídos automaticamente e injetados em espectrômetro de massas, atuando no modo *online*, com o auxílio de uma agulha de ionização nanoESI. Nesta etapa, as soluções de fase móvel utilizados para o programa de gradiente foram: (A) água e ácido fórmico 0,1% (v/v) e (B) acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), com a programação cromatográfica iniciando de um passo de dessalinização com a manutenção de 5% de (B) durante 5 min, em seguida, um gradiente consistindo de uma rampa de subida linear partindo de 5% até 50% de (B) durante 30min, 50% de (B) durante 5min, e uma rampa de subida linear partindo de 50% até 90% de (B) durante 5min, 90% de (B) durante 5min, rampa de descida linear partindo de 90% até 10% de (B) durante 5min, seguido pela manutenção a 10% de (B) durante 5min. Os íons foram escaneados em modo positivo para os espectros de MS1 na faixa de massas entre 300 e 1500m/z e MS2 entre 70 e 3000 m/z. A aquisição de dados teve a duração de, aproximadamente, 50 min. O espectrômetro IonTrap foi operado no modo auto-MSn, o qual adquiriu espectros de MS2 para os íons mais intensos em cada espectro de varredura completo, excluindo os íons de carga simples.

A aquisição dos dados no QTOF e IonTrap foi gerenciada pelo aplicativo Hystar, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros processados com o auxílio dos aplicativos Data Analysis, versão 4.0 (Bruker Daltonics, Alemanha) e CompassXport, versão 3.0 (Bruker Daltonics, Alemanha), utilizando-se as configurações padrões para proteômica. As listas de picos foram geradas nos formatos *mascot generic format* (*.mgf) e *extensible mark-up language* (*.mzXML) pelos aplicativos Data Analysis e CompassXport, respectivamente.

5.5. Identificação das proteínas

A identificação das proteínas foi realizada utilizando duas estratégias. Em ambas as estratégias, as listas de massas geradas foram confrontadas contra os bancos de dados de proteínas dos grupos

Chelicerata (download em 19/02/2015, com 155.960 entradas) e Metazoa (download em 09/10/2015, com 5.784.950 entradas) ambos depositados no Uniprot.

Na primeira estratégia, as listas de massas geradas pelos espectrômetros de massas foram convertidas no formato mzXML, as quais foram confrontadas contra os referidos bancos de dados por meio do aplicativo PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá) (Ma *et al.*, 2003). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável; para o Ion Trap adotou-se uma tolerância de erro de 0,2Da tanto para o íon parental, quanto para os fragmentos; para o QTOF o erro foi de 30ppm para o íon parental e de 0,02Da para os fragmentos. As proteínas foram consideradas identificadas quando apresentassem, pelo menos, um peptídeo único com FDR (*False Discovery Rate*) menor que um. Na segunda estratégia, as listas de massas foram convertidas no formato mgf, sendo o aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, Londres, Reino Unido) utilizado para confrontá-las contra os bancos de dados. Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram os mesmos da primeira estratégia. O resultado obtido pelo MASCOT foi validado pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INC., Portland, EUA). Para a validação dos peptídeos identificados pelo MASCOT foi aplicado o algoritmo Peptide Prophet desenvolvido por Keller *et al.* (2002) e para as proteínas o algoritmo Protein Prophet desenvolvido por Nesvizhskii *et al.* (2003). Os critérios de aceitação para a validação das proteínas foram: probabilidade de identificação do peptídeo e da proteína maior que 90% e, pelo menos, um peptídeo único para cada proteína identificada. As proteínas que compartilharam os mesmos peptídeos foram agrupadas, satisfazendo os princípios da parsimônia.

As planilhas de identificação exportadas pelos aplicativos em cada análise foram manualmente verificadas e uma só planilha construída com os resultados obtidos. Nessa planilha, as proteínas foram separadas

pelo número e sequência de seus peptídeos identificados. Os critérios utilizados para a construção dessa planilha foram: (I) cada proteína deveria apresentar pelo menos, uma sequência de peptídeo não compartilhada com nenhuma outra; (II) a sequência de peptídeo deveria ser encontrada em, pelo menos, uma das repetições analisadas para cada gênero.

5.6. Caracterização das proteínas identificadas

As massas moleculares teóricas das proteínas identificadas foram obtidas do UniProt (<http://www.uniprot.org>), sendo os pontos isoelétricos teóricos preditos pela ferramenta Compute pI/MW do ExPASy Bioinformatics Resource Portal (<http://www.expasy.org>). O aplicativo JVirGel, versão 2.0 (<http://www.jvirgel.de/start3.jsp>) também foi utilizado para prever as massas moleculares e ponto isoelétrico, gerando a imagem virtual de um gel bidimensional. Para a confecção dos géis virtuais foram adotadas a faixa de pH de 3,0 a 11,0 e a faixa de massa molecular de 15kDa a 250kDa, com predição de peptídeo sinal e hélices transmembrana à partir do banco de dados de sequências de eucariotos. A coloração azul corresponde às proteínas preditas como secretadas e vermelho para as preditas como de membrana. A coloração amarela corresponde às demais proteínas das fêmeas e verde para as de macho.

A avaliação da inter-relação entre os dados obtidos foi realizada pela utilização do aplicativo InteractiviVenn (Heberle et al., 2015).

A presença de peptídeos sinais foi predita utilizando o aplicativo SignalP 3.0 (Bendtsen et al., 2004a), sendo considerados positivos os peptídeos preditos pela análise de redes neurais que tiveram “yes” para, pelo menos, as pontuações de sítio de clivagem (C), do peptídeo sinal (S) e da média geométrica entre as pontuações “C” e “S”, denominada (Y). Além disso, na análise pelo modelo de Marcov, somente foram aceitos os peptídeos sinais preditos que tiveram a sua pontuação maior ou igual a 90%.

A presença de hélices transmembrana foi predita pelos aplicativos TMHMM Server v.2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM>) e JVirGel. Quando utilizado o aplicativo TMHMM, foram aceitas as proteínas que

apresentaram pelo menos uma hélice predita com o número de resíduos de aminoácidos esperados para a hélice maior ou igual a 18 e a posição dessa hélice em local diferente do peptídeo sinal. A predição da localização das proteínas identificadas foi realizada pelo aplicativo TargetP 1.1 Server (Emanuelsson et al., 2007). A predição de proteínas secretadas foi realizada à partir do confronto entre os resultados obtidos pelas predições de peptídeo sinal, hélices transmembranas e localização celular, além da utilização do aplicativo JVirGel. Em caso de dúvida, foi realizada uma busca referente à localização celular e à composição celular caracterizada pelo *Gene Ontology*, disponibilizada no UniProt. Além disso, buscas em artigos originais de depósitos de sequências foram realizadas. Proteínas secretadas por via não clássica também foram preditas pelo aplicativo SecretomeP 2.0 (Bendtsen et al., 2004b). Somente foram aceitas as proteínas secretadas preditas que apresentaram pontuação maior ou igual a 0.6, conforme recomendado para sequência de mamíferos. Apesar deste aplicativo poder prever proteínas secretadas com e sem peptídeo sinal, em caso da presença desse peptídeo, somente foram aceitas as proteínas cujos peptídeos também tenham sido preditos pelo aplicativo SignalP 3.0.

As glicosilações com alvo nos resíduos de asparagina foram preditas pelo aplicativo big-PI Predictor (Eisenhaber et al., 2000), as quais foram aceitas quando apresentavam sítios de glicosilação preditos com pontuação total maior que 1.0. Para a predição dessas glicosilações também foi utilizado o aplicativo NetNGlyc 1.0 Server (Gupta & Brunak 2002), no qual as proteínas aceitas apresentaram a predição de um peptídeo sinal, pontuação maior ou igual a 0.5 e que a prolina não participasse como resíduo de constituição do sítio de glicosilação predito. As glicosilações com alvo na serina e treonina foram preditas utilizando o aplicativo NetOGlyc 4.0 Server (Stentoft et al., 2013), cujo ponto de corte para o aceite das glicosilações preditas foi 0.5.

A classificação funcional foi realizada por de duas estratégias: (I) comparação entre as sequências das proteínas identificadas com aquelas preditas pelos transcritos de *A. cajennense*, *A. triste* e *A. parvum* (Garcia et

al., 2014), agrupados segundo critérios previamente descritos por Karim *et al.*, (2011); (II) comparação entre as proteínas identificadas e a coleção de ortólogas de eucariotos anotadas no banco de dados KOG (Tatusov *et al.*, 2003). Nessa classificação, um ID do KOG foi atribuída a cada proteína que alinhou significativamente ($E\text{-value} < 1E\text{-4}$) com aquelas depositadas nesse banco de dados, usando o *Reverse Position Specific* BLAST (RPS-BLAST) (Marchler-Bauer *et al.*, 2002; Schäffer *et al.*, 1999).

6. Resultados e Discussão

6.1. Preparo e separação das proteínas

Os extratos proteicos das glândulas salivares de fêmeas e machos de *A. sculptum* foram quantificados, com média da concentração proteica dos *pools* de 8,94 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ e 7,37 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, respectivamente.

Na estratégia SGF, as proteínas totais de glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapato *A. sculptum* foram separadas em 12 frações por canaleta. Observamos nessa imagem que o padrão de distribuição de bandas entre as triplicatas de fêmea e macho foi similar. As bandas mais fortes foram melhor detectadas na faixa de massa entre 40 e 50 kDa (Figura 3).

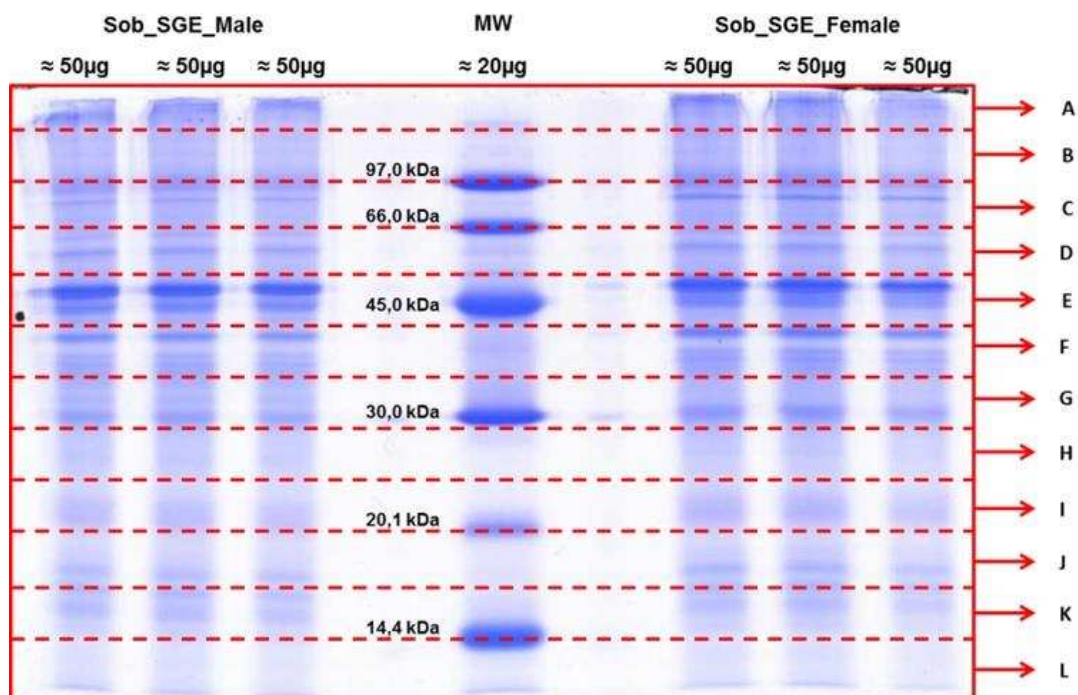


Figura 3: Processamento do extrato proteínas totais de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* pela estratégia SGF. Separação completa do extrato proteico por SDS-PAGE 1D 12% e corado com azul de Coomassie Brilhante G-250.

Por outro lado, na estratégia SGNF observamos apenas uma fração uma fração por canaleta, tanto em machos, quanto em fêmeas (Figura 4).

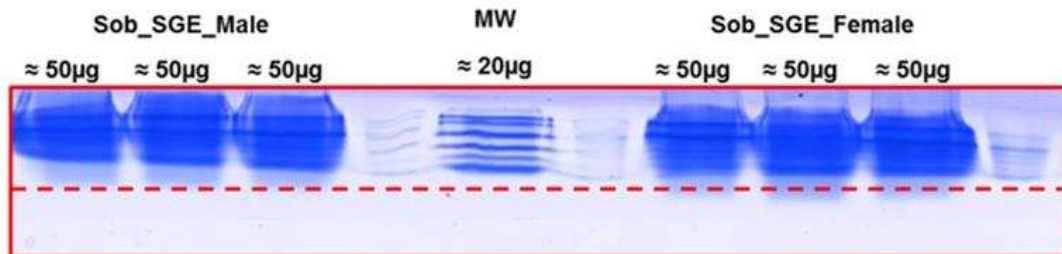


Figura 4: Processamento do extrato proteínas totais de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* pela estratégia SGNF. O extrato proteico foi submetido à eletroforese por SDS-PAGE 1D 12%, sem que houvesse separação das proteínas. O gel foi corado com azul de Coomassie Brilhante G-250.

Na estratégia SGDSF, o extrato de glândulas salivares seguiu direto para a digestão.

6.2. Identificação de proteínas: Aquisição de espectros por LC-MS/MS e busca de dados via MASCOT e PEAKS

Cada espectrômetro de massas apresenta uma configuração singular, sendo uns mais sensíveis, enquanto outros mais acurados. O QTOF é uma plataforma que apresenta uma acurácia mediana, enquanto o Ion Trap demonstra alta sensibilidade (Heller *et al.*, 2003). Assim como nos espectrômetros, os algoritmos também apresentam diferentes formas de conduzir a comparação entre os dados experimentais contra aqueles depositados nos bancos de dados (Ma *et al.*, 2003). Dessa forma, utilizamos duas plataformas de aquisição e identificação de dados, na tentativa de aumentar a disponibilidade de informação das amostras aplicadas.

Após a conclusão das análises, as abordagens utilizadas nos permitiu a identificação de 501 proteínas extraídas de glândulas salivares de

carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados (Tabela 3 – anexo 1). Para uma melhor visualização dos resultados, as proteínas detectadas apenas em fêmeas foram separadas na Tabela 4 (anexo 2), enquanto aquelas detectadas apenas em machos foram listadas na Tabela 5 (anexo 3). Além destas, foram identificadas onze proteínas originárias do hospedeiro vertebrado (Dados não mostrados). Das proteínas identificadas do carrapato, cerca de 32% foram detectadas apenas em machos, 24% apenas em fêmeas e 44% em ambos os gêneros (Figura 5A).

Das estratégias utilizadas para a separação e preparo das proteínas, foram identificadas mais proteínas pela abordagem SGF. Por essa estratégia conseguimos identificar 410 proteínas, das quais 283 foram exclusivas da mesma, o que corresponde a 56% do total da identificação (Figura 5B). Os percentuais de identificação exclusivos das estratégias SGNF e SGDSF foram de 13% e 5%, respectivamente. Provavelmente, o melhor rendimento da estratégia SGF se deu pela redução da complexidade da amostra durante a separação (Yates *et al.*, 2009).

Com relação as plataformas utilizadas para a aquisição de dados, mais de 75% das proteínas foram identificadas pelo uso exclusivo do Ion Trap, enquanto 6% foi pelo QTOF (Figura 5C). Além disso, 93 proteínas foram identificadas por ambas plataformas. Embora os dois equipamentos apresentem a mesma fonte de ionização, os analisadores “*in tandem*” de ambos demonstram comportamentos bem distintos, o que garante a diferença de sensibilidade entre os mesmos (Yates *et al.*, 2009).

O algoritmo de busca que apresentou um melhor rendimento na identificação das proteínas salivares foi o PEAKS, com 55% das proteínas identificadas exclusivamente por ele (Figura 5D). No entanto, o número de proteínas exclusivamente identificadas pelo MASCOT também foi expressivo.

Em relação aos bancos de dados, cerca de 50% das proteínas foram identificadas tanto no Chelicerata, quanto no Metazoa, sugerindo um comportamento similar tanto para as proteínas identificadas no banco mais restrito, quanto no mais amplo (Figura 5E).

Com relação às abordagens adotadas, Villar et al. (2014) analisaram o proteoma total (carrapato inteiro) de três espécies do gênero *Amblyomma*, utilizando o método “*protein one-step in gel digestion*”. Estes autores aplicaram 200µg de proteínas totais por canaleta de gel SDS-PAGE 1D, as quais não se separaram, com a corrida eletroforética paralisada quando o marcador de corrida adentrou, aproximadamente, 3mm do gel de resolução, sendo os peptídeos trípticos analisados por um sistema LC-MS/MS, cujo espectrômetro de massas era constituído de um analisador linear Ion Trap, identificando 800 proteínas para as três espécies do referido gênero. Tirloni et al. (2014), realizaram análise proteômica da saliva de fêmeas parcialmente e totalmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* por SDS-PAGE 1D totalmente fracionado e digestão tríptica em solução, analisando os peptídeos trípticos por um sistema LC-MS/MS cujo espectrômetro continha analisadores *in Tandem* Q-TOF. Na configuração utilizada os autores identificaram 187 proteínas da saliva de fêmeas de *R. microplus*, das quais, 126 foram processadas por digestão em solução, seguida por LC-MS/MS. Choksawangkam et al. (2012) testaram três métodos de preparo de amostra para a estratégia proteômica “*bottom-up*” na identificação de proteínas de membrana solubilizadas em SDS 2%, com três métodos de digestão das proteínas: (a) digestão de proteínas separadas por gel, (b) digestão de proteínas em solução e (c) digestão de proteínas em solução, com a utilização de um filtro, concluindo que o melhor rendimento foi do método de digestão em gel, seguido pela digestão em solução com filtro.

Na identificação de proteínas, a utilização de mais de uma estratégia é muito importante, devido à contribuição que essa ação promove para aumentar o número de informações durante o processo. Nesse trabalho, a escolha de dois bancos foi um exemplo que contribuiu para a identificação das proteínas do grupo da Actina. Após a eliminação da redundância, seis isoformas com, pelo menos, um peptídeo único cada foram identificadas (Figuras 6 e 7). Dessas isoformas, apenas a de número 381 foi identificada em ambos os bancos. Das demais, uma foi identificada

apenas no banco Chelicerata, enquanto quatro foram identificadas apenas pelo banco Metazoa.

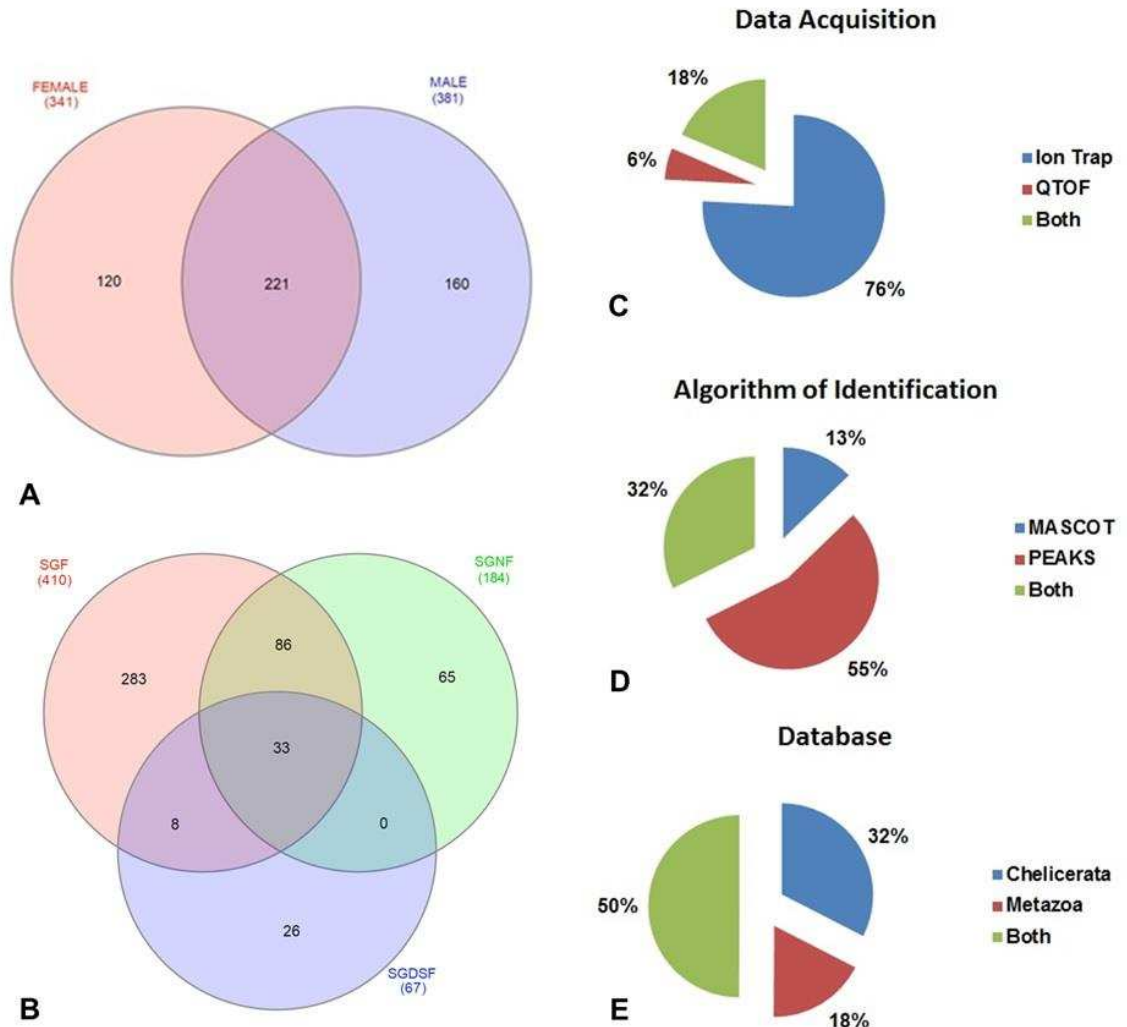


Figura 5: Agrupamento das proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*. (A) Proteínas agrupadas por gênero; (B) Proteínas agrupadas pela estratégia de separação; (C) Proteínas distribuídas conforme a aquisição de dados; (D) Proteínas distribuídas conforme o algoritmo de identificação; e (E) Proteínas distribuídas conforme o banco de dados utilizado.

>tr|S5FY84|S5FY84_9ACAR Actin 3 OS=Neoseiulus cucumeris PE=2 SV=1 (323) – MW 42 kDa – 12 peptides – 1 exclusive unique peptide – 184/388 amino acids (47% coverage)

MCDDDVAALVVDNGSGLCK¹AGFAGDD²APRAVFPSIVGRPRHQQVMVGMGQK³DSYVGDEAQ
SKR⁴GILTLKYPIEHGIVTNWDDMEK⁵IWHHTFYNELRIAPEEHPVLLTEPPLNPKANREKM
TQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR⁶TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR⁷LD
LAGRDLTDYLMKILTER⁸GYSFTTTAEREIVRDIKEK⁹LCYVALDFEQEM¹⁰TAASSSSLEK¹⁰S
YELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMEACGIHETTYNSIMKCDVDIRKDLYANTVL
SGGTTMYPGIADRMQKEITNLAPSTMKIK¹¹IIPPERKYSVWIGGSILASLSTFQQTWISK
¹²QEYDESGPSIVHRKCF

>tr|D4HTS7|D4HTS7_9PLAT Beta actin-like 1 protein OS=Macrostomum lignano GN=act PE=2 SV=1 (355) – MW 42 kDa – 13 peptides – 1 exclusive unique peptide – 228/388 amino acids (58% coverage)

MA¹EEAALVVDNGSGMCK²AGFAGDDAPR³AVFPSIVGRPR⁴HQGMVGMGQK⁵DSYVGDEAQ
SKR⁶GILTLKYPIEHGIVTNWDDMEK⁷IWHHTFYNELR⁸VAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKM
TQIMFETFNAPAMYVAIQAVLSLYASGR⁹TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR⁹LD
LAGRDLTDYLMKILTER¹⁰GYSFTTTAEREIVRDIKEK¹¹LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK¹²S
YELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMESSGIHETTYNSIMKCDVDIRK¹³DLYANTVL
SGGTTMYPGIADRMQKEITSLAPSTMKIKI VAPPERKYSVWIGGSILASLSTFQAMWISK
QEYDESGPGIVHRKCF

>tr|Q58NQ6|Q58NQ6_PALPU Beta-actin (Fragment) OS=Palaemonetes pugio PE=2 SV=1 (363) – MW 14 kDa – 03 peptides – 1 exclusive unique peptide – 228/125 amino acids (38% coverage)

VRDIKEKLCYVALDFEQEMTTAASSSSLEK¹SYELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLG
MESCGIHETTYNSIMKCDVDIRK²DLYANTVLSGGTTMYPGIADRMQK³EITALA³STMKIK
|

Figura 6: Sequências das isoformas do grupo da actina (S5FY84, D4HTS7 e Q58NQ6) identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*.

Nota: No cabeçalho, em azul encontram-se os números que codificam essas proteínas nesse trabalho. Nas sequências, os peptídeos identificados foram numerados em cinza e suas sequências tachadas em amarelo. Nos peptídeos únicos, os resíduos alterados foram tachados de vermelho.

>tr|G3MLM7|G3MLM7_9ACAR Putative uncharacterized protein OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1 (381) – MW 42 kDa – 15 peptides – 1 exclusive unique peptide – 225/388 amino acids (58% coverage)

MCDDDVAALVVDNGSGMCK¹AGFAGDDAPR²AVFPSIVGRPR³HQGVVMVGMGQK⁴DSYVGDEAQ
SKR⁵GILTLKYPIEHGIVTNWDDMEK⁶IWHHTFYNELR⁷VAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKM
TQIMFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR⁸TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILR¹⁰LD
LAGRDLTDYLMKILTER¹¹GYSF¹²TTTAEREIVRDIKEK¹²LCYVALDFEQEMATAASSSSLEK¹³S
YELPDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMEACGIIHETTYNSIMKCDVDIRK¹⁴DLYANTVL
SGGTTMYPGIADRMQK¹⁵EITALA¹⁶STMKIK¹⁶IIPPERKYSWWIGGSILASLSTFQQMWSK
¹⁷QEYDESGPSIVHRKCF

>tr|B5SUT6|B5SUT6_9BILA Actin (Fragment) OS=Heterodera sp. SAS-2008 PE=3 SV=1 (456) – MW 23 kDa – 04 peptides – 1 exclusive unique peptide – 66/213 amino acids (31% coverage)

LTLKYPIEHGIVTNWDDMEK¹IWHHTFYNELR²V¹PEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQIMF
KTFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR³TTGIVLDSGDGVTHTVPIYEGYALPHAILR³LDLAGRD
LTDYLMKILTERGYSFVTTAEREIVRDIKEK⁴LCYVALDFEQEMATAASSSSLEKSYELPD
GQVITVGNFRFCPEALFQPSFLGMES

>tr|D9YST8|D9YST8_9DIPT Actin (Fragment) OS=Anopheles vestitipennis PE=2 SV=1 (457) – MW 24 kDa – 07 peptides – 2 exclusive unique peptides – 107/219 amino acids (49% coverage)

¹GILTLK²YPIEHGIVTNWDDMEK³IWHHTFYNELR⁴VAPEEHPVLLTEAPLNPKANREKMTQI
MFETFNTPAMYVAIQAVLSLYASGR⁵TTGIVLDSGDGVSHTVPIYEGYALPHAILRVDLAG
RDLDPDYLMKILTER⁶GYSF⁷TTTAEREIVRDIKEKLCYVALDFEQEMATAAAASTSLEK⁷YEL
PDGQVITIGNERFRCPEALFQPSFLGMEACGIIH

Figura 7: Sequências das isoformas do grupo da actina (G3MLM7, B5SUT6 e D9YST8) identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*.

Nota: No cabeçalho, em azul encontram-se os números que codificam essas proteínas nesse trabalho. Nas sequências, os peptídeos identificados foram numerados em cinza e suas sequências tachadas em amarelo. Nos peptídeos únicos, os resíduos alterados foram tachados de vermelho.

Para visualizar melhor os resultados, as proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum* foram agrupadas em quatro faixas de percentual de cobertura (0-10%, 11-20%, 21-40% e 41-100%), representadas conforme Tabela 1.

Tabela 1: Distribuição das proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum* em relação às faixas de cobertura dos peptídeos.

Coverage ratio	Male proteins (n=381) / percentage	Female proteins (n=341) / percentage
0-10%	204 / 53.5%	177 / 51.9%
11-20%	80 / 21.0%	76 / 22.3%
21-40%	75 / 19.7%	67 / 19.6%
41-100%	22 / 5.8%	21 / 6.2%

Embora as proteínas identificadas tenham mostrado uma distribuição similar entre faixas de cobertura nos gêneros macho e fêmea (Figura 8A), quando comparamos apenas as proteínas detectadas em machos ou em fêmeas, observamos uma diferença mais expressiva nas faixas de 0-10% e de 21-40% (Figura 8B). O maior percentual de proteínas identificadas está localizado na faixa de cobertura menor, no entanto, pelo menos, 225 proteínas apresentaram a sua identificação com cobertura maior que 11%, dentre essas uma proteína secretada rica em glicina (A0A023FUP5), detectada tanto em machos, quanto em fêmeas, foi identificada com cobertura de 75%.

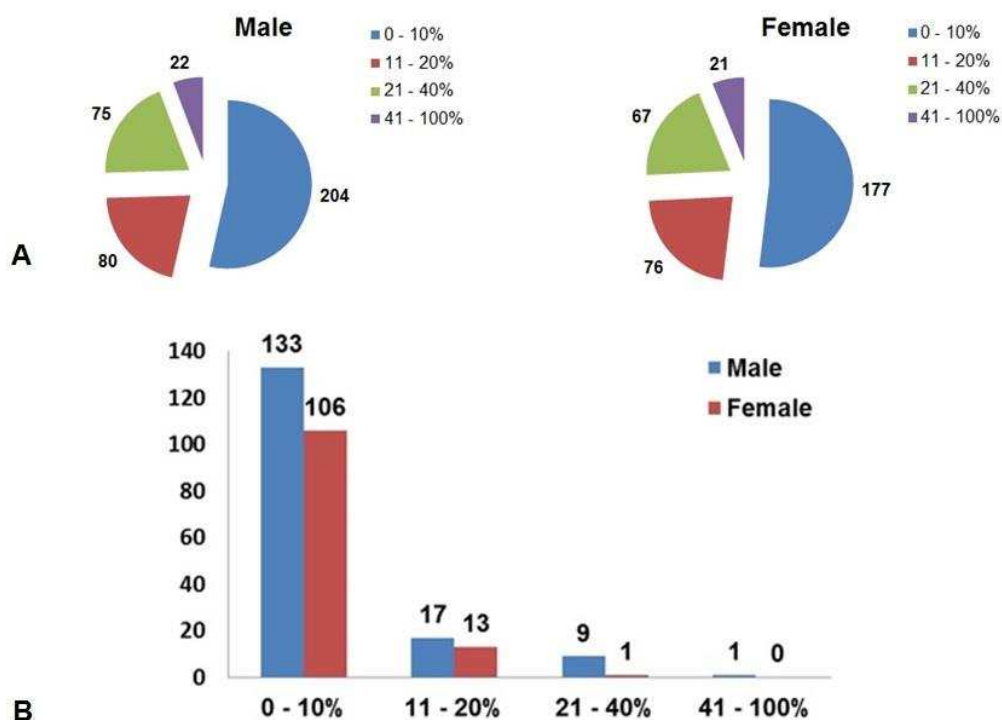


Figura 8: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, distribuídas por faixas de percentual de cobertura. (A) Distribuição de todas as proteínas identificadas pelas faixas de cobertura e por gênero; (B) Distribuição das proteínas identificadas, detectadas apenas um dos gêneros, conforme as faixas de cobertura.

6.3. Caracterização estrutural das proteínas identificadas

As proteínas identificadas nas glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* foram agrupadas em seis faixas conforme a massa molecular teórica (menor que 13kDa, 14kDa-30kDa, 31kDa-60kDa, 61kDa-90kDa, 91kDa-120kDa e maiores que 121kDa) e três faixas de acordo com o ponto isoelétrico (pI) predito (3,00-5,99; 6,00-8,99 e 9,00-11,99). Duas faixas de massas próximas concentraram 65% do total de proteínas identificadas, compreendendo o intervalo massas entre 14kDa e 60kDa (Figura 9A). Essa constatação pode ser confirmada pela visualização da distribuição de bandas com o mesmo intervalo de massas, na imagem do SDS-PAGE 1D (Figura 9B). A distribuição das proteínas pelo pI foi muito

similar nas três faixas, havendo prevalência na faixa de 6,00 a 8,99, representando 31% das proteínas identificadas (Figura 9C). As proteínas identificadas foram plotadas em um gráfico de dispersão com as variáveis *pl* e MW, no qual foi observado a formação de dois aglomerados dispostos um na região ácida e outro na região básica (Figura 9D).

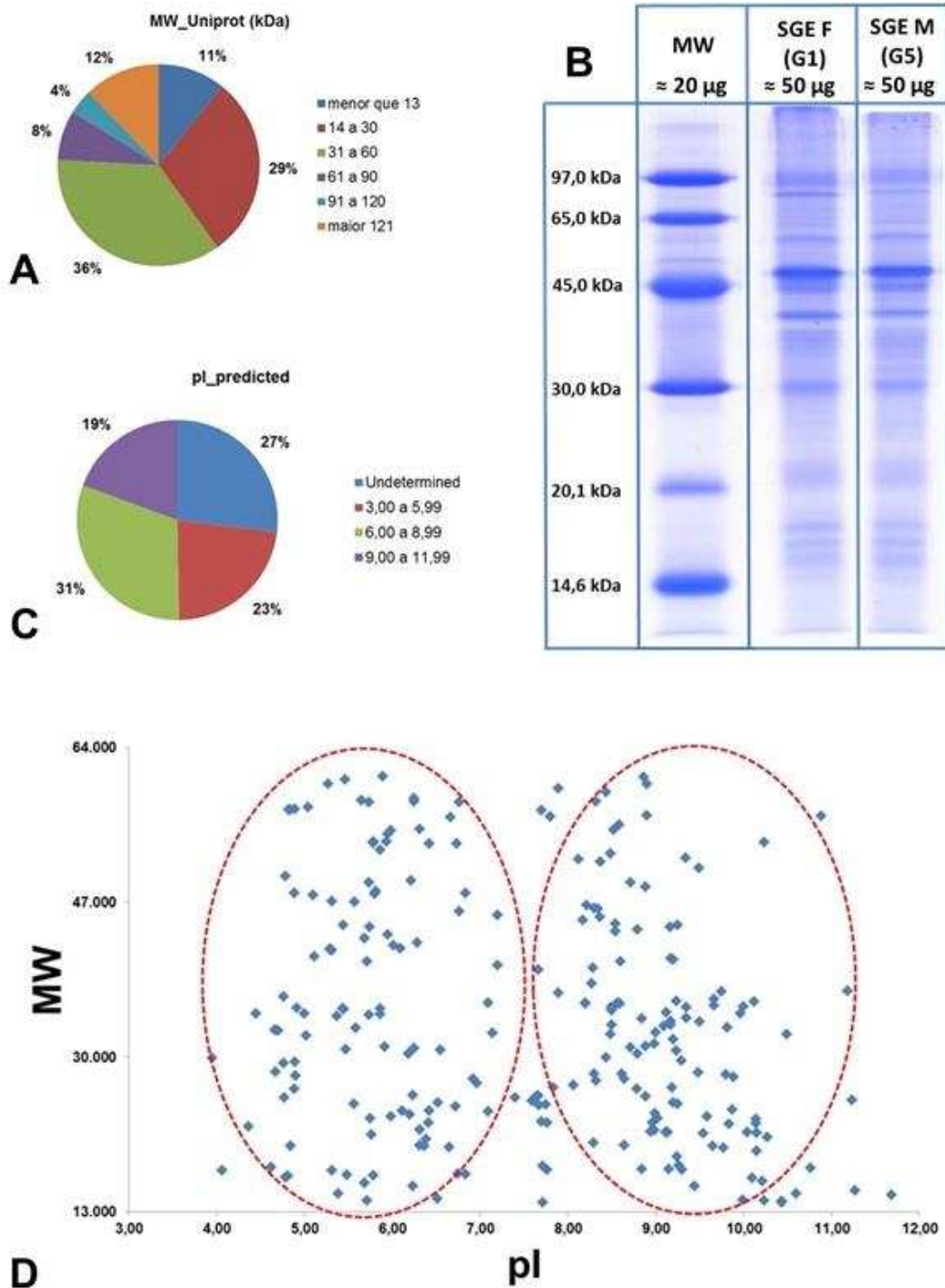


Figura 9: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, distribuídas pela massa molecular teórica e pelo ponto isoelétrico predito. (A) Distribuição das proteínas pela massa molecular teórica; (B) Extratos de proteínas totais de glândulas salivares de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum* separados por SDS-PAGE 1D 12%, corado com azul de Coomassie Brilhante G-250; (C) Distribuição das proteínas pelo ponto isoelétrico predito; (D) Dispersão das proteínas pela massa molecular teórica e pelo ponto isoelétrico predito.

Mapas bidimensionais virtuais das proteínas identificadas em glândulas salivares de fêmeas e machos de *A. sculptum* foram preditos (Figura 10). Nos mapas virtuais, os spots numerados correspondem às proteínas detectadas nas glândulas salivares apenas de fêmeas (Figura 10A) e apenas de machos (Figura 10B). Na comparação entre os géis bidimensionais virtuais de fêmeas e machos, foi observado um perfil bem distinto entre os mesmos. Há indícios da existência de isoformas dentre as proteínas identificadas. Um exemplo disso seriam as proteínas dos grupos das vitelogeninas-2 (ID: 205 – A0A023FS61, 226 – A0A023FUV2 e 238 – A0A023FYX2) e hemelipoproteínas (ID:316 – A0MVX0 e 416 – Q19V51) mostradas em detalhe no mapa do gel bidimensional virtual (Figura 11). Uma das isoformas da proteína vitelogenina-2 (ID=238 – A0A023FYX2) foi detectada apenas em fêmeas (Figura 10A). As referidas proteínas compartilham peptídeos entre si e a identificação das mesmas foi processada utilizando, pelo menos, três peptídeos sequenciados (Tabela 2).

Figura 10: Imagem virtual de um SDS-PAGE 2DE separando as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos *A. sculptum*. (A) Proteínas detectadas em fêmeas de *A. sculptum*. (B) Proteínas detectadas em machos de *A. sculptum*.

Nota: Os pontos azuis correspondem às proteínas preditas pelo aplicativo JVirGel como secretadas, os pontos vermelhos às proteínas preditas como de membrana e os pontos amarelos e verdes correspondem às demais proteínas de fêmeas e machos, respectivamente.

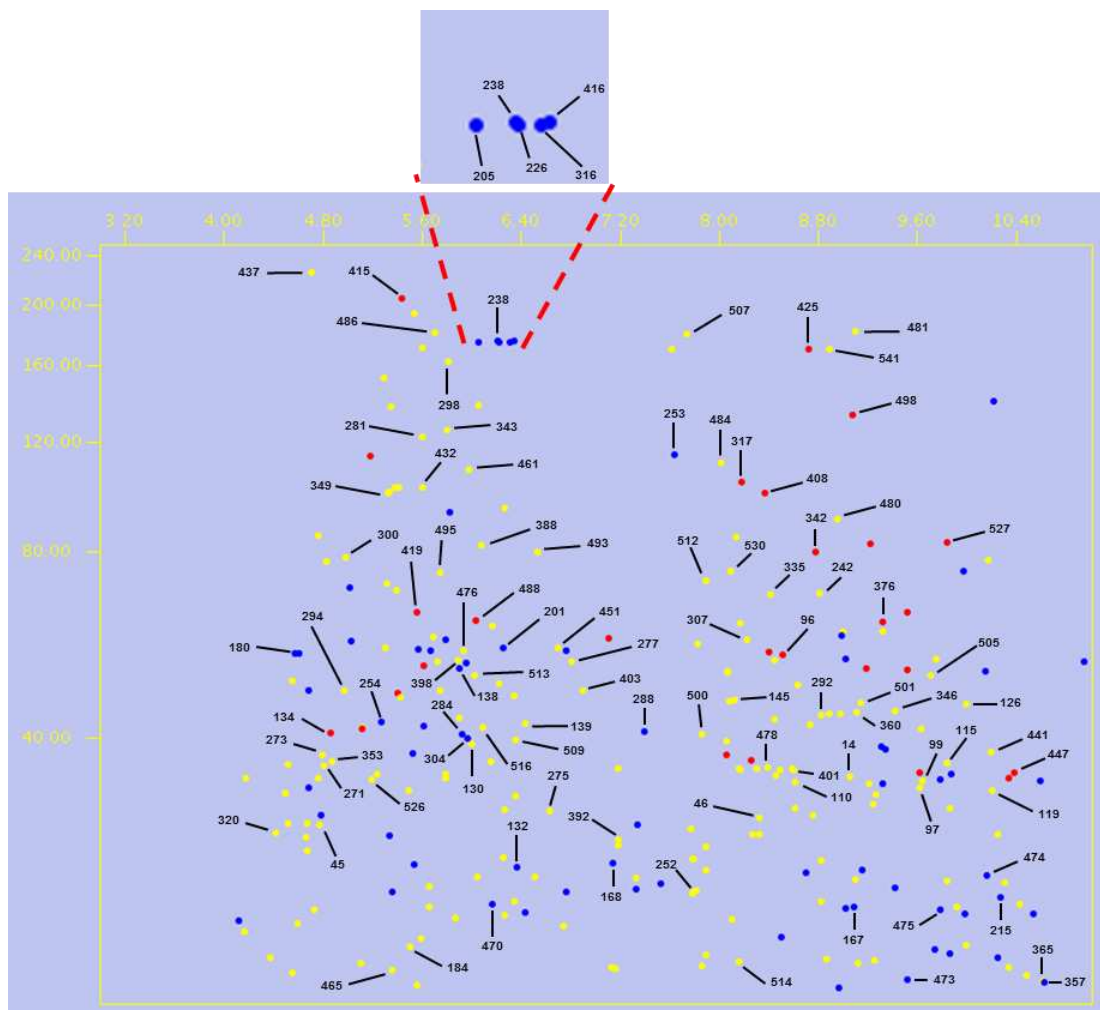


Figura 11: Imagem virtual de um SDS-PAGE 2DE separando as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos fêmeas de *A. sculptum*, com destaque para as isoformas do grupo das vitelogeninas.

Tabela 2: Isoformas de vitelogeninas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos *A. sculptum*.

Protein Number	Protein Accession	Protein Name	Peptide Unique	Coverage	Peptide sequence
205	A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment)	17	15%	EVSDAIIHAISDSCK
					FSGDQLYIQAAR
					FTDDDIADIER
					FTHTDEDEEQLAAAAAGK
					GVLSLFQLDLVK
					HIALEIITEPSDQVAFVTSAFR
					IAALLVLFSPNDLYVLR
					LCGLCGDYNLDR
					LPWWDHVPR
					NKDVSSEDADRFTK
					NMYIMLR
					TDLATFYTGDHVDK
					TVDSWDIGDTIVELLK
VDVDPATPYSHTEQDSELFK					
VQFFYDR					
YDFGSMTSSELIR					
YSFNHDLFNHK					
226	A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2	12	10%	GVLSLFQLDLVK
					LAASALVGSK
					LCGLCGDYNLDR
					VQFFYDR
					YSFNHDLFNHK
					ADELLQFDR
					GTLHVANPEQPLQSTGFGYR
					LEILSVSPDSGLIVR
					NHVITAPDDTKESIR
					SHLVLSGGYNPK
VNNLATFYQGR					
HIAQEVITDPSDQVAFVTSAFR					
238	A0A023FYX2	Putative vitellogenin-2	3	3%	GVLSLFQLDLVK
					LCGLCGDYNLDR
					IEMLPLSADSGLVLR
316	A0MVX0	Heme lipoprotein	4	3%	GVLSLFQLDLVK
					LAASALVGSK
					VQFFYDR
416	Q19V51	Hemelipoglycoprotein	4	3%	GVLSLFQLDLVK
					IDVTHGDNAEIHLD
					ILDAIK
					SHLLISSGGYNPK

Nota: Os peptídeos compartilhados entre as proteínas estão marcados em amarelo.

Na maior parte dos animais, a estrutura bioquímica de heme faz parte da constituição dos citocromos presentes nos complexos II, III e IV da cadeia respiratória mitocondrial, a qual é responsável pela principal forma de

produção de energia em sistemas biológicos, denominada fosforilação oxidativa (Ludwig *et al.*, 2001). Em carrapatos ixodídeos não foram encontradas muitas das enzimas responsáveis pela síntese do grupo heme, portanto, esses carrapatos são incapazes de sintetizar seu próprio heme, adquirindo essa molécula do hospedeiro por meio da alimentação (Perner *et al.*, 2016). Vitelogenina é uma proteína que se liga e sequestra o grupo heme, a qual é responsável pelo transporte dessa molécula para tecidos periféricos do carrapato (Hajdusek *et al.*, 2016). Além disso, a vitelogenina é a proteína precursora da vitelina, principal proteína do ovo, a qual é utilizada para o armazenamento de energia necessária à maturação e embriogênese dos ovócitos (Boldbaatar *et al.*, 2010).

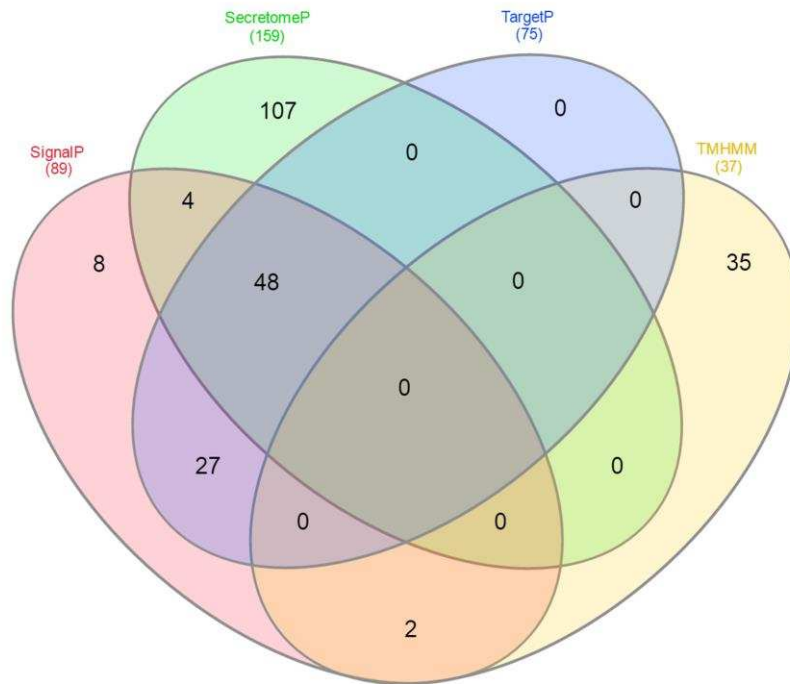
Em carrapatos ixodídeos, a vitelogenina é sintetizada, principalmente, no “fat body” (James *et al.*, 1999). Após sintetizada, a vitelogenina é liberada para a hemolinfa e distribuída para todo o corpo do carrapato. Os hormônios ecdiesteróides são responsáveis pela regulação da expressão gênica da vitelogenina e sua secreção para a hemolinfa (Thompson *et al.*, 2005). Há indícios que o repasto sanguíneo estimula o aumento da produção de hormônios ecdiesteróides em argasídeos, o que culmina com o aumento da produção de vitelogenina, induzindo a maturação e ovoposição de ovos em fêmeas desse grupo de carrapatos (Ogihara *et al.*, 2007). Em carrapatos da espécie *Ixodes ricinus* o nível de expressão gênica para vitelogenina nas glândulas salivares foi aumentado de quatro a cinco vezes em fêmeas totalmente ingurgitadas (Hajdusek *et al.*, 2016).

Tendo em vista os relatos encontrados, é sugerido que uma das funções das vitelogeninas nas glândulas salivares seja o fornecimento do grupo heme para a manutenção do funcionamento da fosforilação oxidativa, fornecendo energia para esses órgãos. Outra hipótese seria a contaminação de glândulas salivares com partes do intestino durante a dissecação dos órgãos, o que pode ser refutado pela presença dessa proteína na saliva de carrapatos da espécie *Ornithodoros molbata* (Diaz-Martin *et al.*, 2013) e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Tirloni *et al.*, 2014). Devido aos relatos de secreção salivar da vitelogenina por carrapatos, sugerimos que essa

proteína pode desempenhar outras funções no hospedeiro, as quais não estão esclarecidas até o momento.

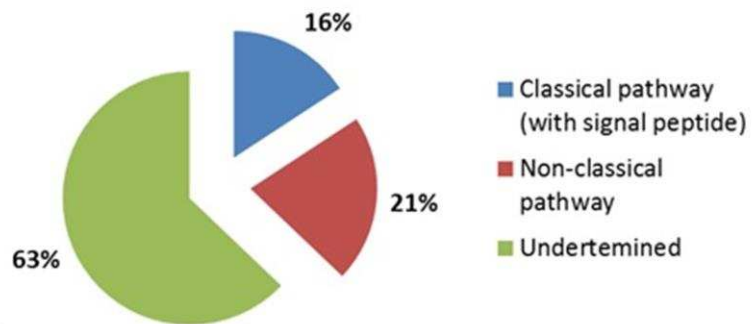
As proteínas de membrana foram preditas pelo aplicativo TMHMM. A presença de sítios contendo hélices transmembrana foi predita em 37 proteínas (Tabela 6 – anexo 4). Por essa predição, sete por cento das proteínas identificadas correspondem a proteínas de membrana putativas (Figura 12C). Dentre as proteínas preditas por esse aplicativo, seis foram mais marcantes: uma “putative mitochondrial adp/atp carrier” (A0A023FIQ0), vinculada com o metabolismo energético; uma “sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha” (A0A023FMF6), vinculada com o transporte de sódio/potássio na célula; quatro “putative conserved membrane protein” (A0A023FL42, A0A023FLX0, A0A023FNR2 e A0A023FUN5), as quais foram classificadas como “unknown conserved protein”, com função biológica ainda não esclarecida. Todas essas proteínas foram agrupadas como “Putative Housekeeping Proteins” (Tabela 08 – anexo 6). Para a predição das proteínas secretadas foram utilizados os aplicativos SignalP, TargetP e SecretomeP. O número de proteínas putativas como secretadas por via clássica foi 79 (Tabela 7 – anexo 5), das quais quatro foram preditas pelo aplicativo SecretomeP, 27 pelo TargetP e 48 por ambos (Figura 12A). Cento e sete proteínas foram preditas pelo aplicativo SecretomeP como secretadas por via não clássica (Tabela 7 – anexo 5). As proteínas preditas como secretadas corresponderam a 37% das proteínas identificadas (Figura 12B).

As proteínas preditas como secretadas por via não clássica são exportadas das células por via independente da passagem pelo retículo endoplasmático e aparato de Golgi (Stein *et al.*, 2014; Manfredi *et al.*, 2016). Dessa forma, essas proteínas não apresenta modificações pós-traducionais como a glicosilação, mesmo apresentando sítios para tais modificações.



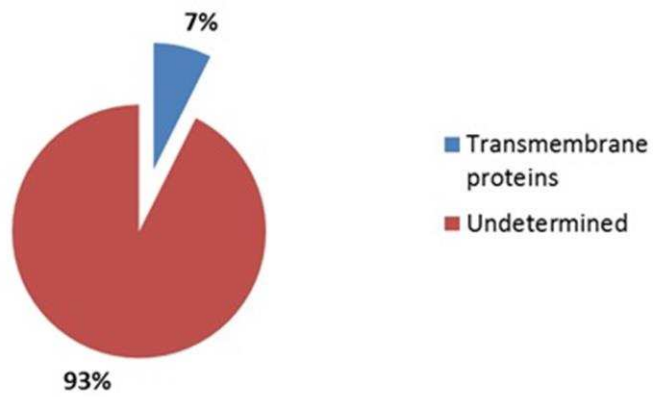
A

Secretome predicted



B

Transmembrane helices predicted

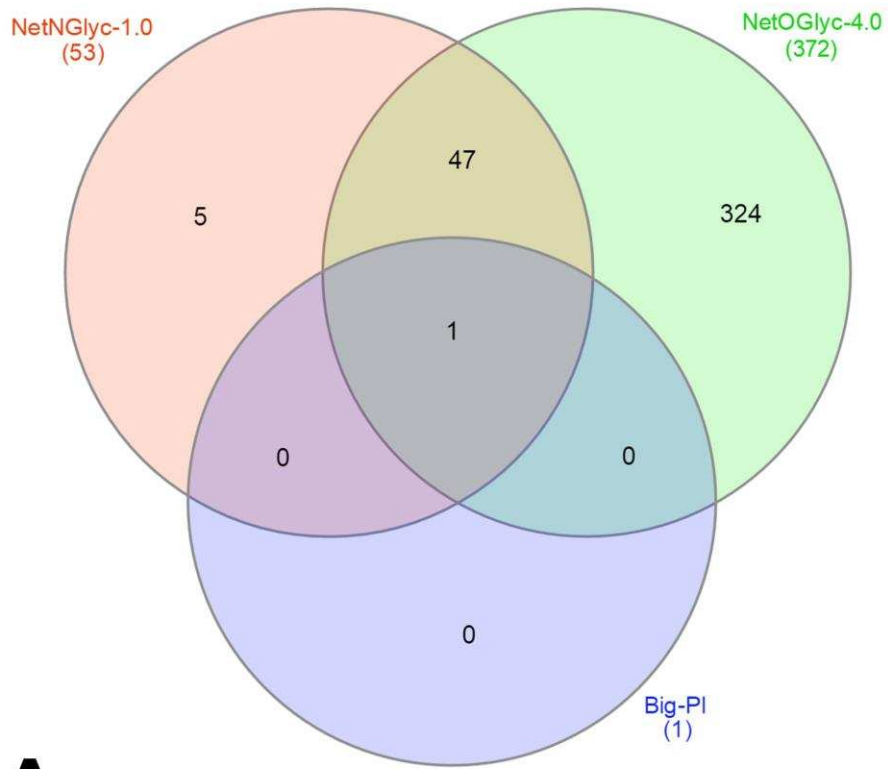


C

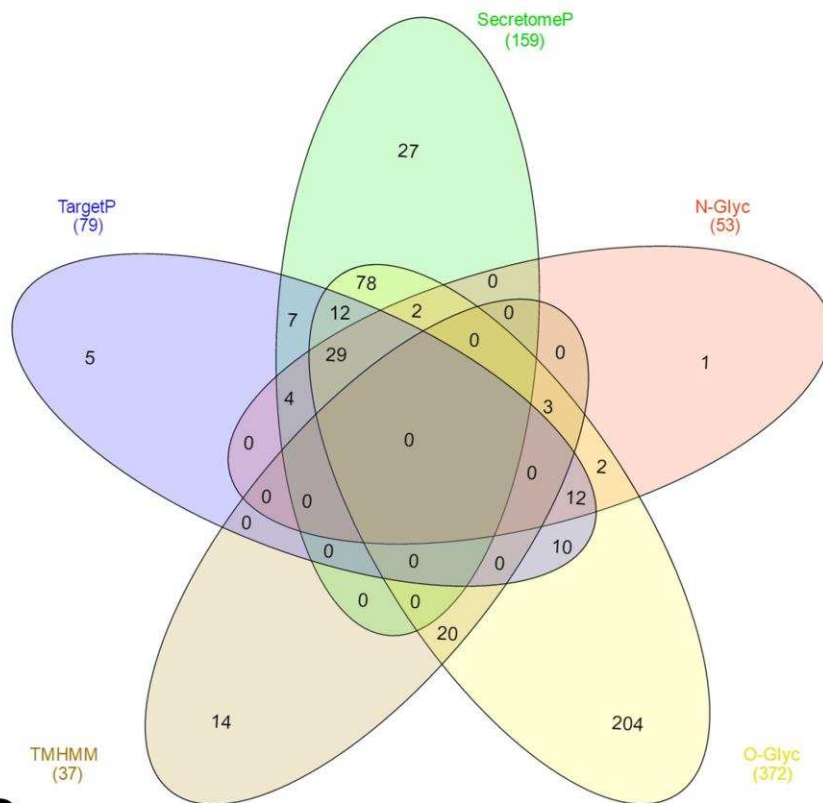
Figura 12: Proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, preditas como secretadas ou com hélices transmembrana. (A) Distribuição das proteínas preditas pelos aplicativos utilizados para fazer a predição; (B) Percentual das putativas proteínas secretadas em relação ao total de proteínas identificadas; (C) Percentual das putativas proteínas de membrana em relação ao total de proteínas identificadas.

O método de predição SecretomeP baseia-se na sequência de resíduos da proteína, a qual é submetida a uma análise de características combinadas, interpretada por rede neural, tais como: número de átomos calculados, número de resíduos carregados negativamente, número de resíduos carregados positivamente, ponto isoelétrico, dentre outros (Bendtsen et al., 2004b).

A presença de 53 sítios de N-glicosilação em resíduos de asparagina foram preditos pelos aplicativos NetNGlyc e big-PI Predictor, com 372 sítios de glicosilação em serina e treonina, denominados O-glicosilações, preditos pelo aplicativo NetOGlyc (Figura 13A). Muitas proteínas secretadas putativas por via não clássica, preditas pelo SecretomeP, apresentaram a predição de sítios para O-glicosilação. No entanto, essa observação deve ser cuidadosa, pois, apesar delas puderem realmente apresentar os sítios de glicosilação em sua estrutura, na realidade da fisiologia celular, não sofrerão essa modificação. O fato das proteínas putativas secretadas por via não clássica não receberem glicosilação se deve ao fato delas não migrarem na célula pela rota clássica de secreção, passando por organelas responsáveis pela execução dessa modificação (Bendtsen et al., 2004b). Podemos observar que em 93% das proteínas putativas secretadas pela via clássica foram preditos sítios para glicosilação (Figura 13B). Dentre elas, as proteínas ricas em glicina e as proteínas da família das mucinas apresentaram sítios de O-glicosilação preditos. Essa observação também foi realizada em um trabalho de sialotranscriptômica de *Amblyomma maculatum* realizado por Karim et al. (2011).



A



B

Figura 13: Sítios de N- e O-glicosilação preditos para as proteínas identificadas de glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, usando os aplicativos NetNGlyc 1.0, NetOGlyc 4.0 e big PI Predictor. (A) Distribuição das proteínas com sítios de glicosilação preditos conforme os aplicativos usados; (B) Correlação entre as putativas proteínas secretadas e de membrana e a presença dos sítios de N- e O-glicosilação.

6.4. Caracterização funcional das proteínas identificadas

As proteínas identificadas nas glândulas salivares de fêmeas e machos de *A. sculptum* foram classificadas funcionalmente com utilização da coleção de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG (Figura 14) e também como proteínas secretadas putativas ou “*housekeeping*” putativas, com base nas sequências depositadas por Garcia, *et al.* (2014) (Tabela 8 – anexo 6).

Em termos gerais, podemos observar que na classificação funcional por KOG, predominaram as classes correspondentes às modificações pós-traducionais (O), seguidas pelas classes de conservação e produção de energia (C), citoesqueleto (Z) e maquinaria de tradução (J), que somadas, correspondem a 41% de todas as proteínas identificadas como constitutivas do organismo estudado.

General KOG Class (n=501)

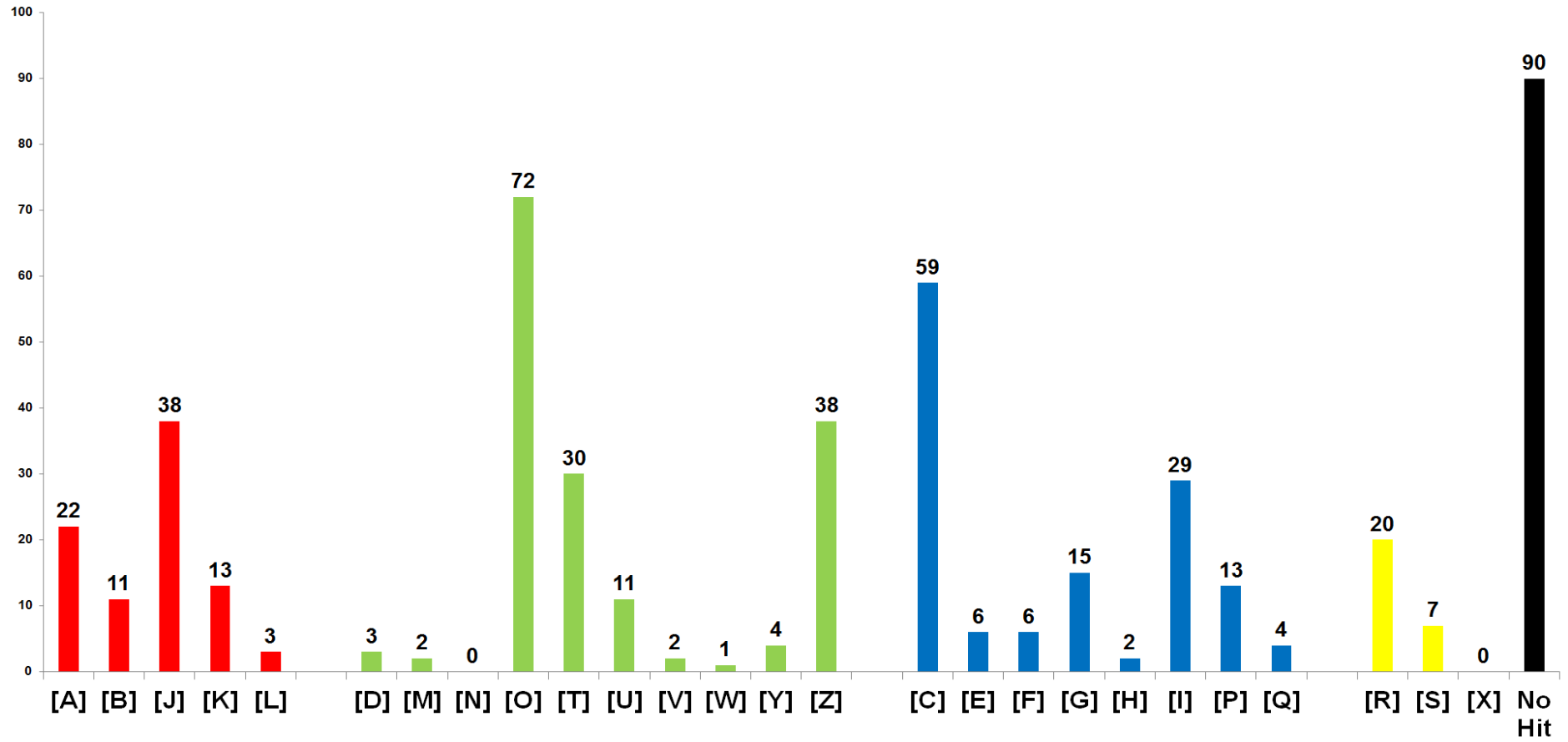


Figura 14: Classificação funcional das proteínas identificadas em glândulas salivares de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, usando as proteínas de eucariotos anotadas no KOG. (Legend: [A] RNA processing and modification; [B] Chromatin structure and dynamics; [J] Translation, ribosomal structure and biogenesis; [K] Transcription; [L] Replication, recombination and repair; [D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning; [M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis; [N] Cell motility; [O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperones; [T] Signal transduction mechanisms; [U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport; [V] Defense mechanisms; [W] Extracellular structures; [Y] Nuclear structure; [Z] Cytoskeleton; [C] Energy production and conversion; [E] Amino acid transport and metabolism; [F] Nucleotide transport and metabolism; [G] Carbohydrate transport and metabolism; [H] Coenzyme transport and metabolism; [I] Lipid transport and metabolism; [P] Inorganic ion transport and metabolism; [Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism; [R] General function prediction only; [S] Function unknown e [X] Unnamed protein).

Das 501 proteínas identificadas nas glândulas salivares de fêmeas e machos de *A. sculptum*, 15% foram classificadas como “*putative secreted proteins*” e 52% como “*putative housekeeping proteins*”, por meio da comparação entre as sequências das proteínas identificadas com as preditas por ESTs, depositadas no Uniprot (Garcia *et al.*, 2014). Para o restante das proteínas, cerca de 33%, não foi possível classificar por meio dessa abordagem, as quais ficaram denominadas como “non-classified proteins” (Figura 15).

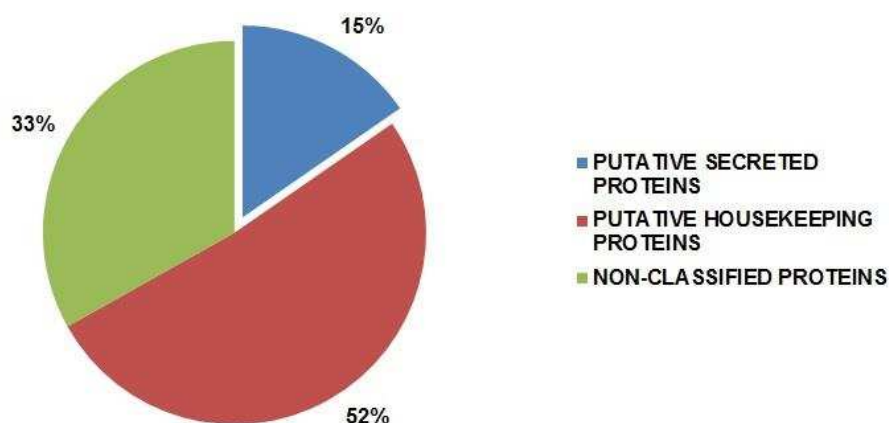


Figura 15: Proteínas identificadas de glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapato *A. sculptum*, classificadas funcionalmente em “putative secreted proteins” e “putative housekeeping proteins”. Nota: As proteínas que não foi possível classificar pela estratégia adotada na abordagem de comparação entre as sequências das proteínas identificadas, com as sequências preditas por ESTs depositadas no UNIPROT (Garcia et al., 2014) foram agrupadas em “non-classified proteins”.

As proteínas classificadas na categoria “*putative secreted proteins*” foram separadas em dez sub-classes (Figura 16A). Em seguida, foram distribuídas conforme o gênero em que foram detectadas: macho, fêmea ou ambos (Figura 16B).

As proteínas preditas como pertencentes à família rica em glicina foram encontradas em maior número na categoria “*putative secreted proteins*” (Figura 16A). Além disso, o número de proteínas detectadas em machos foi maior do que em fêmeas. Com as metodologias utilizadas nestes estudo, não pudemos inferir que as proteínas ricas em glicina detectadas apenas em machos são exclusivas desse gênero, no entanto, podemos afirmar que, na condição de jejum alimentar, as proteínas ricas em glicina encontram-se diferencialmente expressas nesse gênero. Tan *et al.* (2015) observaram em sialomas de *Rhipicephalus pulchellus*, que proteínas ricas em glicina são mais expressadas em machos do que em fêmeas, tanto na análise transcriptômica, quanto na proteômica.

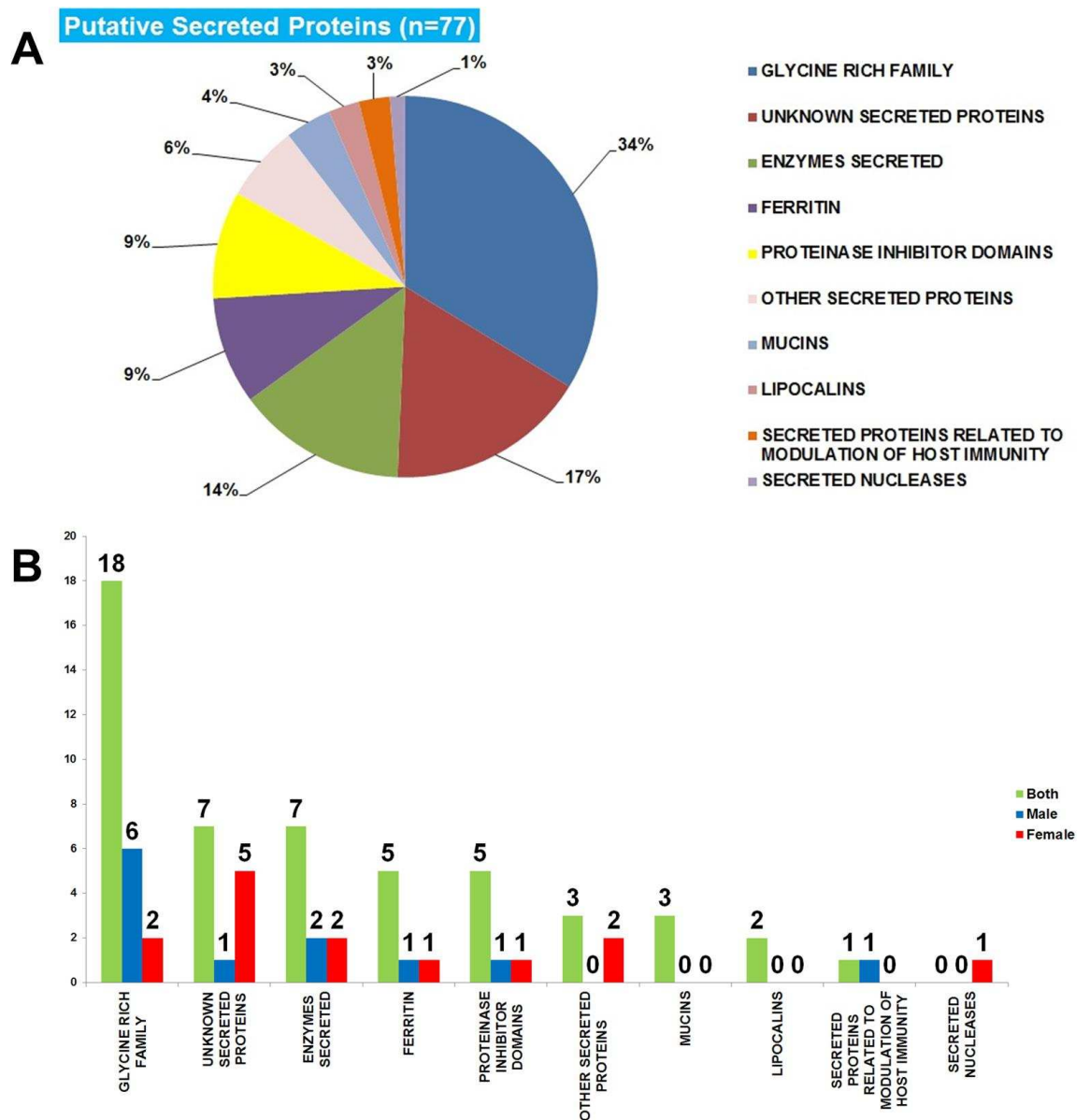


Figura 16: Proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas de *A. sculptum*, classificadas “putative secreted proteins”. (A) Separação das proteínas em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem; (B) Distribuição das proteínas conforme o gênero onde foram detectadas.

Os carrapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Aponomma* e *Hyalomma* são classificados como “longirostratas” do grupo dos “metastriate”, apresentando hipostoma mais longo e uma penetração mais profunda na pele do hospedeiro. Enquanto os gêneros *Dermacentor*, *Haemaphysalis* e

Rhipicephalus são classificados como “Brevirostratas”, também do grupo dos “metastriate”, nos quais o hipostoma é mais curto e sua penetração é superficial na pele do hospedeiro do que os “prostriates” (Kemp *et al.*, 1982; Francischetti *et al.*, 2010). Maruyama *et al.* (2010) analisaram transcritos de três espécies diferentes de carrapatos, encontrando maior quantidade de proteínas ricas em glicina expressas nas glândulas salivares dos carrapatos “metastriates”, como o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, os quais necessitam compensar o tamanho do hipostoma com um aumento do cone de cemento. Tirloni *et al.* (2014) encontraram proteínas ricas em glicina presentes em maior número na saliva de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* parcialmente ingurgitadas, em comparação com as totalmente ingurgitadas, corroborando a hipótese de que essas proteínas são mais expressadas nos estágios iniciais da alimentação. Tirloni *et al.* (2015), trabalhando com proteínas da saliva de fêmeas de carrapatos *Haemaphysalis longicornis*, nos estágios de ninfa e adulto, observaram que proteínas ricas em glicina são mais expressas em ninfas que em adulto, reforçando a hipótese construída por eles anteriormente. Garcia *et al.* (2014) analisaram transcritos de glândulas salivares de três espécies do gênero *Amblyomma*, também observando a presença de transcritos de proteínas ricas em glicina, apresentando no entanto, um número de “reads” em *A. cajennense* menor do que para as demais espécies. Em um trabalho com machos e fêmeas do argasídeo *Ornithodoros moubata* não alimentados, Díaz-Martín *et al.* (2013) observaram que as proteínas ricas em glicina apresentaram menor abundância em relação às demais proteínas identificadas na saliva de *O. Moubata*, com uma taxa de expressão proteica menor em machos do que em fêmeas.

Com base nessas informações, nota-se que a expressão das proteínas ricas em glicina pode ser influenciada pela necessidade de uso do cone de cemento na fixação do carrapato em seu hospedeiro. Além disso, as proteínas ricas em glicina também estão envolvidas com outras funções, tais como o controle de comunidades microbianas e em respostas ao estresse, principalmente durante as mudas, o jejum prolongado ou no inverno, quando

os carrapatos ficam submetidos à baixas temperaturas (Bullard *et al.*, 2016). Especulamos que a maior ocorrência de proteínas ricas em glicina observadas em machos verificada neste trabalho, esteja vinculada com a diferença no modo de alimentação dos carrapatos desse gênero em relação às fêmeas, visto os machos realizarem repastos sanguíneos intermitentes, demandando formar maior cones de cemento durante suas diversas fixações. Essas proteínas foram classificadas como alvos vacinais para carrapatos por Bishop *et al.* (2002), os quais observaram uma forte indução da resposta humoral de bovinos contra carrapatos, com redução da massa corporal e da postura das fêmeas. Jiang *et al.* (2014) caracterizaram molecularmente uma proteína rica em serina, treonina, glicina, prolina e alanina e avaliaram o seus efeitos contra a infestação de carrapatos em ovelhas. Essa proteína quando aplicada em ovelhas conferiu um aumento da resposta imune contra a infestação de carrapatos, com forte redução da taxa de ovoposição das fêmeas.

Das proteínas identificadas neste trabalho e classificadas como proteínas putativas secretadas, a família “*unknown secreted proteins*” representou 17% (Figura 16A), apresentando sete proteínas detectadas em ambos os gêneros, uma proteína detectada apenas em carrapatos machos e cinco apenas em fêmeas (Figura 16B). Formada por um conjunto de proteínas que contém sítio de peptídeo sinal e outras características que a preparam para ser secretada, a função desta família de proteínas permanece desconhecida, com poucos relatos sobre as mesmas (Karim *et al.*, 2011). Díaz-Martín *et al.* (2013) encontraram duas proteínas secretadas com função desconhecida em glândulas salivares de machos de *O. moubata*, não tendo realizado a correlação do achado com a função da proteína, demandando a realização de mais estudos para um melhor entendimento das funções dessas proteínas.

Onze proteínas foram agrupadas na categoria de enzimas secretadas, representando 14% do total de proteínas secretadas putativas (Figura 16A). Dentre as enzimas secretadas foram identificadas metaloproteases, transglutaminases e serinoproteases. Sabe-se da ação

dessas enzimas são de grande importância para hematofagia do carrapato, inibindo a hemostase no local da picada do carrapato e permitindo o livre aporte sanguíneo para o mesmo (Francischetti *et al.*, 2010; Ali *et al.*, 2015). Tan *et al.* (2015) identificaram transcritos de metaloproteases mais abundantes na saliva de machos de *Rhipicephalus pulchellus*. Garcia *et al.* (2014) observaram um maior número de transcritos para metaloproteases em relação aos das outras enzima identificados em glândulas salivares de fêmeas de *A. cajennense*. Não foi possível comparar estes resultados com os aqui apresentados, visto a abordagem proteômica que utilizamos não permitir a observação de diferenças entre os gêneros. No entanto, apesar de um pequeno número de enzimas secretadas identificadas, também observamos as metaloproteases como as mais representativas (Tabela 08 – anexo 6).

As classes de ferritinas e proteínas contendo domínio inibidor de proteinase apresentaram a mesma quantidade de representantes, sendo classificados como “*putative secreted proteins*” (Figura 16A), com a distribuição das proteínas identificadas entre estas classes sendo semelhante, sem diferença marcante entre os gêneros (Figura 16B). As ferritinas estão intimamente relacionadas com o transporte de ferro livre entre tecidos do carrapato e a desintoxicação do mesmo em relação ao excesso desse ion (Hajdusek *et al.*, 2009). Na análise de silenciamento do gene que expressa *fer2* em carrapatos *Ixodes ricinus*, esses carrapatos apresentaram grande dificuldade para alimentar-se, indicando que esse gene é um forte candidato vacinal (Hajdusek *et al.*, 2009). Garcia *et al.* (2014) identificaram transcritos de ferritina nas glândulas salivares de *A. cajennense* parcialmente ingurgitadas. Em uma abordagem proteômica, Tirloni *et al.* (2014) identificaram ferritinas na saliva de *R. (B.) microplus* em maior abundância nas fêmeas parcialmente ingurgitadas, possibilitando aventar que as ferritinas são mais utilizadas na fase inicial da alimentação.

Por análises transcriptômicas em batelada Cmelar *et al.* (2015) identificaram a classe de proteínas contendo domínio inibidor de proteinase como a maior família multigênica identificada. Dentre os representantes

dessa família que identificamos neste trabalho, destacamos os inibidores serino-proteases (serpina e proteínas com domínio Kunitz ou TIL – “*Trypsin inhibitor-like*”) e as cistatinas (Tabela 8 – anexo 6). As moléculas descritas como sendo da família de proteínas com inibidor de proteinases possuem, em sua maioria, função anti-hemostática e imunossupressora, das quais as serpinas e proteínas com domínio Kunitz ou TIL atuam como anti-coagulantes, com as cistatinas atuando como anti-inflamatório (Cmelar *et al.*, 2015). Tirlone *et al.* (2014) encontraram serpinas, Kunitz, TIL e cistatinas mais abundantes em fêmeas de *R. microplus*, parcialmente ingurgitadas. Tan *et al.* (2015) identificaram Kunitz (bilaris), serpinas e cistatinas no sialoma de *R. pulchellus*, sendo a primeira mais abundante em fêmeas, e as demais em machos. Em contraste, encontramos uma Kunitz (bilaris) putativa detectada apenas em macho e uma serpina putativa detectada apenas em fêmeas. Outros estudos devem ser realizados para tentar explicar essa diferença.

Os demais grupos de proteínas putativas secretadas representaram 17% das mesmas. Dentre elas, estão outras proteínas secretadas, mucinas, lipocalinas, proteínas relacionadas à modulação do sistema imune do hospedeiro e nucleases. Em nosso trabalho, apenas duas lipocalinas foram identificadas, com o grupo de nucleases secretadas, representado pela 5'-nucleotidase putativa, detectado apenas em fêmeas. A família das lipocalinas foi previamente encontrada em alta abundância na análise proteômica da saliva de *Ornithodoros moubata* não alimentado (Diaz-Martin *et al.*, 2013) e também na análise proteômica da saliva de fêmeas de *R. microplus* parcialmente engurgitadas (Tirloni *et al.*, 2014). A enzima nuclease pertence a família 5'-nucleotidase da classe Apyrase, apresentando ação anticoagulante em insetos hematófagos (Hughes, 2013). Diaz-Martin *et al.* (2013) também encontraram essa enzima estudando a proteômica da saliva de carrapatos argasídeos *O. moubata*. Tan *et al.* (2015) encontraram maior número dessa classe de enzimas no sialoma de fêmeas do que de machos de *R. pulchellus*.

As proteínas classificadas como “putative housekeeping proteins” representaram 52% do total de proteínas identificadas nas glândulas

salivares de machos e fêmeas de *A. sculptum* (Figura 15), sendo distribuídas em 20 subclasses (Figura 17). Tan *et al.* (2015) trabalhando com o sialoma de *R. pulchellus*, classificaram 88,1% das proteínas identificadas como “putative housekeeping proteins”. Diaz-Martin *et al.* (2013), estudando o proteoma da saliva de *O. moubata*, classificaram cerca de 75% das proteína identificadas como “putative housekeeping/intracellular proteins”.

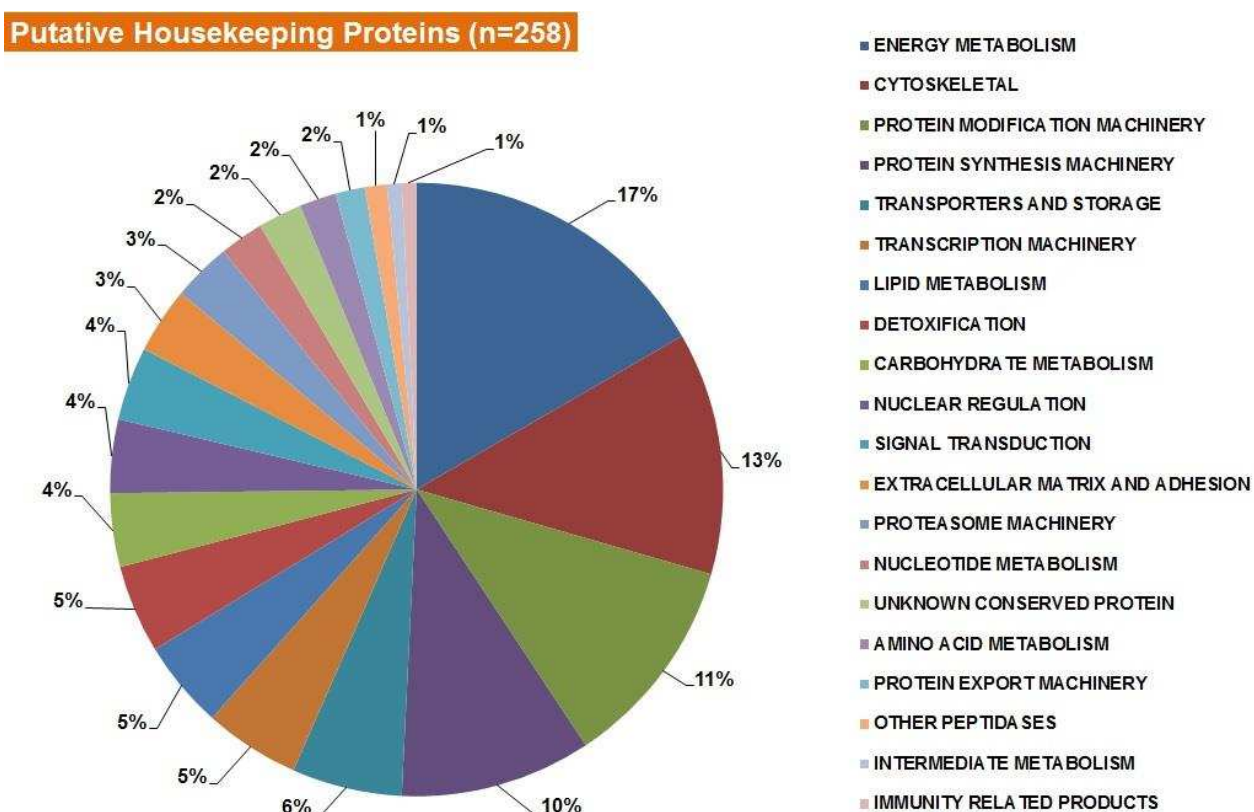


Figura 17: Proteínas identificadas nas glândulas salivares de machos e fêmeas de *A. sculptum*, classificadas “putative housekeeping proteins” e dividida em sub-classes conforme a sua função molecular ou a família a que pertencem.

Pelos resultados obtidos, nota-se que as categorias mais representativas foram metabolismo energético, citoesqueleto, maquinaria de modificação proteica e maquinaria de síntese proteica, somando juntas 51%

das proteínas classificadas como “*putative housekeeping proteins*”. Na análise proteômica da saliva de *O. moubata*, dentro da categoria “*putative housekeeping proteins*”, a subclasse transdução de sinal mostrou-se predominante sobre as demais (Díaz-Martin *et al.*, 2013). Já na análise transcriptômica de glândulas salivares de *R. pulchellus*, as proteínas preditas com função vinculada ao estoque e transporte predominaram sobre as demais do grupo “*putative housekeeping proteins*” (Tan *et al.*, 2015). Após a classificação funcional das proteínas, aquelas agrupadas na categoria “*putative housekeeping proteins*” foram distribuídas conforme o sexo dos carrapatos, no qual foram detectadas (Figura 18).

Proteínas associadas com o citoesqueleto, identificadas em glândulas salivares de *A. sculptum*, foram mais detectadas em machos do que fêmeas. Em especial, as isoformas da proteína actina (Figuras 6 e 7) identificadas com os números de acesso S5FY84 G3MLM7, as quais foram detectadas em glândulas salivares de machos e fêmeas, enquanto as proteínas identificadas pelos números de acesso D4HTS7, Q58NQ6, B5SUT6 e D9YST8 foram detectadas apenas em machos. Há indícios que proteínas do citoesqueleto podem estar envolvidas com outras funções, além da contração muscular, como por exemplo, a proteína paramiosina ter sido encontrada sensibilizando um hospedeiro vertebrado de carrapato (Leal *et al.*, 2013; Tirloni *et al.*, 2015). Outro exemplo é a proteína troponina I-like ter sido classificada como um potente inibidor de angiogênese (Fukumoto *et al.*, 2006).

Proteínas vinculadas com a maquinaria de modificação proteica também foram detectadas com maior ocorrência em machos do que em fêmeas. Uma delas, a alfa-cristalina, a qual é uma “*heat shock protein (HSP)*” de baixa massa molecular, a qual atua no desdobramento de proteínas até que elas sejam redobradas por outras HSPs, respondendo contra o estresse oxidativo, dentre outros (Nakamoto e Vígh, 2007).

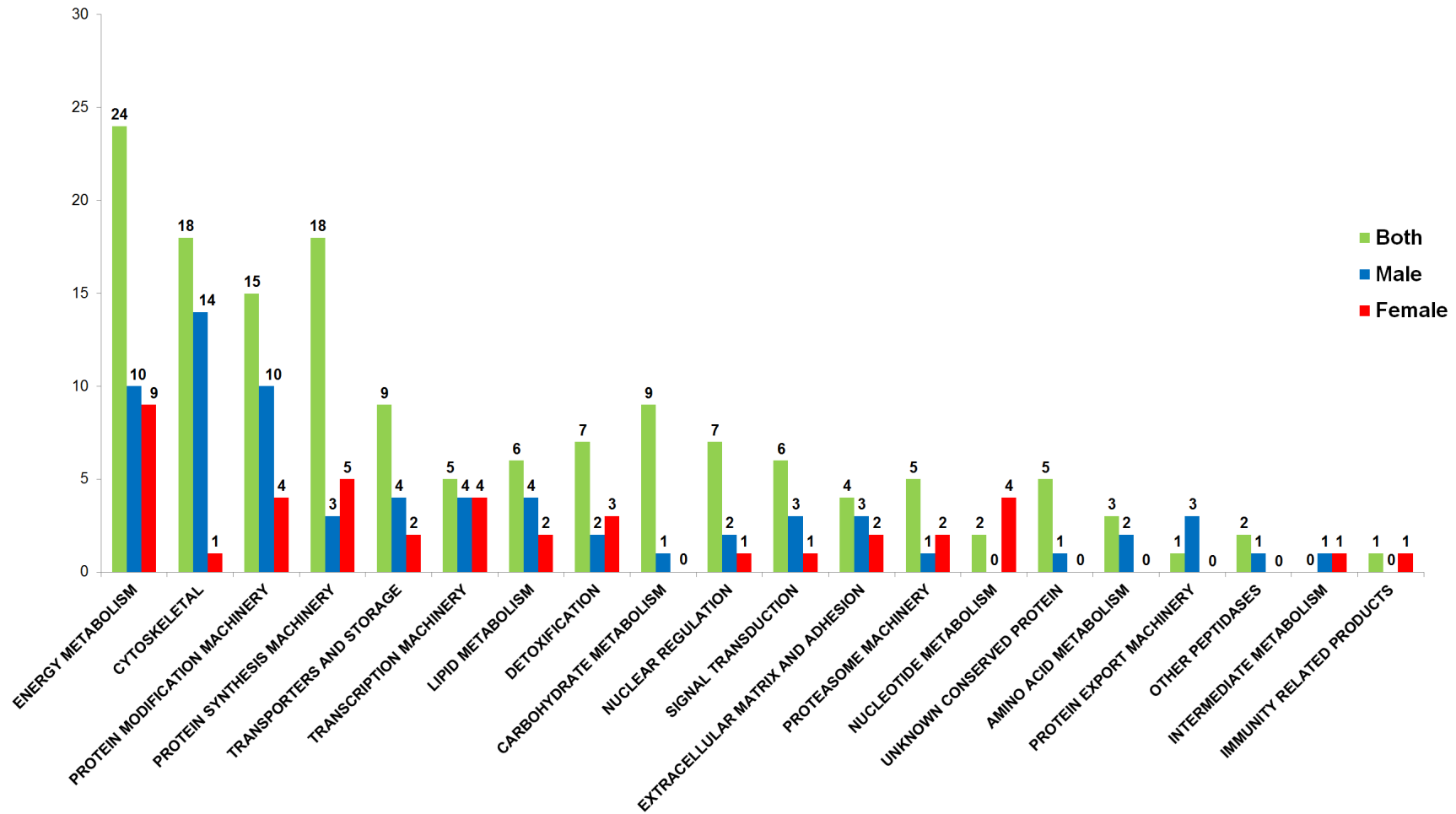


Figura 18: Proteínas identificadas de glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapato *A. sculptum*, classificadas funcionalmente em “putative housekeeping proteins”, distribuídas conforme o gênero onde foram detectadas.

Díaz-Martin *et al.* (2013) também encontraram proteínas relacionadas com o citoesqueleto e com a maquinaria de modificação proteica em sua análise proteômica da saliva de *O. moubata*. Os autores discutem a possibilidade dessas proteínas serem secretadas por meio de exossomos ou por secreção apócrina, vias não clássicas de secreção.

Na análise proteômica da saliva de fêmeas e ninfas de *Haemaphysalis longicornis* também foi relatado a presença de diversas proteínas vinculadas com a estrutura celular, tais como: actina, tubulina, paramiosina, dentre outras. Os autores discutem que a presença dessas proteínas na saliva de carrapatos é um indicativo que as mesmas desempenham outros papéis na fisiologia desse ácaro, diferentes da função estrutural (Tirloni *et al.*, 2015).

Na análise do sialoma do carrapato *R. pulchellus*, várias proteínas envolvidas com o citoesqueleto e com a maquinaria de modificação proteica foram identificadas. Em ambos os processos, a maior parte das proteínas foram mais abundantes em fêmeas, do que em machos. No entanto, os autores não discutiram sobre esse achado (Tan *et al.*, 2015).

7. Conclusões

Nesse trabalho, relatamos de maneira inédita a análise do sialome do carrapato *A. sculptum*, com a extração e identificação por espectrometria de massa (LC-MS/MS) de 501 proteínas amplamente distribuídas nos grupos “*putative secreted proteins*” e “*putative housekeeping proteins*”, em conformidade com a complexidade de sialomes de outros carrapatos ixodídeos previamente descritos. As diferentes abordagens utilizadas na separação das proteínas, aquisição de espectros de massa e análise de dados possibilitaram a identificação e caracterização de um significativo número de proteínas com base na busca contra o banco de dados biológicos UNIPROT, fato de grande importância no estudo destes ácaros. A caracterização bioquímica e funcional das proteínas identificadas permitiu relacioná-las a um contexto biológico, possibilitando um melhor entendimento sobre sua atuação nas glândulas salivares de *A. sculptum*. A presença de várias proteínas ou suas isoformas em apenas um dos sexos sugere a ocorrência de abundância diferenciada das mesmas entre os gêneros. Dentre essas macromoléculas estão as proteínas ricas em glicina, as proteínas envolvidas com a maquinaria de modificação proteica e de transporte intracelular, as quais foram mais evidentes em machos. Apesar dos resultados obtidos possibilitarem incremento do conhecimento sobre o sialome de carrapatos *A. sculptum*, podendo permitir futuramente o reconhecimento de possíveis alvos para candidatos vacinais ou moléculas farmacologicamente ativas, estudos mais aprofundados devem ser realizados com o objetivo de melhor esclarecimento sobre as vias que interferem nas diferentes funções celulares envolvidas.

8. Referências Bibliográficas

- Alarcon-Chaidez FJ, Sun J, Wikel SK. 2007. Transcriptome analysis of the salivary glands of *Dermacentor andersoni* Stiles (Acari: Ixodidae). **Insect Biochem. Molec.**, 37:48-71.
- Ali A, Khan S, Ali I, Karim S, Vaz Jr IS, Termignoni C. 2015. Probing the functional role of tick metalloproteases. **Physiological Entomology**, 40:177-188.
- Anatriello E, Ribeiro JMC, Miranda-Santos IKF, Brandão LG, Anderson JM, Valenzuela JG, Maruyama SR, Silva JS, Ferreira BR. 2010. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **BMC Genomics**, 11(450):1-17.
- Arcà B, Lombardo F, Valenzuela JG, Francischetti IMB, Marinotti O, Coluzzi M, Ribeiro JMC. 2005. An update catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Anopheles gambiae*. **J. Exp. Biol.**, 208:3971-3986.
- Assumpção TCF, Francischetti IMB, Andersen JF, Schwarz A, Santana JM, Ribeiro JMC. 2008. An insight into the sialome of the blood-sucking bug *Triatoma infestans*, a vector of Chagas' disease. **Insect Biochem. Molec.**, 38:213-232.
- Barros-Battesti DM, Arzua M, Bechara GH. **Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 p.
- Bechara GH, Szabó MPJ, Ferreira BR, Garcia MV. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 4(2):61-66.
- Bendtsen JD, Nielsen H, Heijne G, Brunak S. 2004a. Improved prediction of signal peptides – SignalP 3.0. **J. Mol. Biol.**, 1-22.
- Bendtsen JD, Jensen LJ, Blom N, Heijne G, Brunak S. 2004b. Feature-based prediction of non-classical and leaderless protein secretion. **Protein Engineering, Design & Selection**, 17(4):349-356.
- Bishop R, Lambson B, Wells C, Pandit P, Osaso J, Nkonge C, Morzaria S, Musoke A, Nene V. 2002. A cement protein of the *Rhipicephalus*

appendiculatus, located in the secretory cell granules of the type III salivary gland acine, induces strong antibody responses in cattle. **International Journal for Parasitology**, 32:833-842.

Boldbaatar D, Umemiya-Shirafuji R, Liao M, Tanaka T, Xuan X, Fujisaki K. 2010. Multiple vitellogenins from the *Haemaphysalis longicornis* tick are crucial for ovarian development. **Journal of Insect Physiology**, 56:1587-1598.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, 72:248-254.

Brasil. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7^a ed. Brasília, 2009. 816 p.

Bullard RL. **Characterization of glycine rich proteins from the salivary glands of the Lone Star tick *Amblyomma americanum***. 2016. 153f. Dissertation (Doctor of Philosophy) – Department of Biological Sciences at the University of Southern Mississippi, Hattiesburg, Mississippi - EUA 2016.

Calvo E, Ribeiro JMC. 2006. A novel secreted endonuclease from *Culex quinquefasciatus* salivary glands. **J. Exp. Biol.**, 209:2651-2659.

Calvo E, Tokumasu F, Marinotti O, Villeval JL, Ribeiro JMC, Francischetti IMB. 2007. Aegyptin, a novel mosquito salivary gland protein, specifically binds to collagen and prevents its interaction with platelet glycoprotein VI, integrin $\alpha 2\beta 1$, and Von Willebrand factor. **Biol. Chem.**, 282(37):26928-26938.

Camargo-Neves VLF, Vieira AML, Souza CE, Labruna MB, Mayo RC, Souza SSL. 2004. **Manual de vigilância acarológica**. São Paulo: Secretaria de Estado da Saúde, 63 pp.

Chao CC, Wu SL, Ching WM. 2004. Using LC-MS with de novo software to fully characterize the multiple methylations of lysine residues in a recombinant fragment of an outer membrane protein from a virulent strain of *Rickettsia prowazekii*. **Biochim. Biophys. Acta**, 1702:145-152.

- Chao CC, Chelius D, Zhang T, Mutumanje E, Ching WM. 2007. Insight into the virulence of *Rickettsia prowazekii* by proteomic analysis and comparison with an avirulent strain. **Biochim. Biophys. Acta**, 1774:373-381.
- Chmelar J, Kotál J, Karim S, Kopacek P, Francischetti IMB, Pedra JHF, Kotsyfakis M. 2015. Sialomes and Mialomes: A systems-biology view of tick tissues and tick-host interactions. **Trends in Parasitology**, 32(3):242-254.
- Choksawangkarn W, Edwards N, Wang Y, Gutierrez P, Fenselau C. 2012. A comparative study of workflows optimized for in-gel, in-solution and on-filter proteolysis in the analysis of plasma membrane proteins. **J. Proteome Res.**, 11(5):3030-3034.
- Cunha AP, Bello ACP, Leite RC, Bastianetto E, Ribeiro ACCL, Freitas CMV, Oliveira PR. 2007. Controle estratégico de *Amblyomma cajennense* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) em equinos, Minas Gerais, Brasil. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, 16(4):221-228.
- Dantas-Torres F, Onofrio VC, Barros-Battesti DM. 2009. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Syst. Appl. Acarol.**, 14:30-46.
- Denardi SE, Furquim KCS, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2011. Salivary glands of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae): a histological and na ultrastructural overview. **Exp. Appl. Acarol.**, 54:177-189.
- Díaz-Martin V, Manzano-Román R, Valero L, Oleaga A, Encinas-Grandes A, Pérez-Sánchez R. 2013. An insight into the proteome of the saliva of the argasid tick *Ornithodoros moubata* reveals important differences in saliva protein composition between the sexes. **Journal of Proteomics**, 80:216-235.
- Eisenhaber B, Bork P, Yuan Y, Loffler G, Eisenhaber F. 2000. Automated annotation of GPI anchor sites: case study *C. elegans*. **Trend in Biochemical Science**, 25:340-341.

- Emanuelsson O, Brunak S, Heijne G, Nielsen H. 2007. Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. **Nature Protocols**, 2(4):953-971.
- Fei-Yu X, Jian-Wu Z, Yong-Zhi Z, Zhuang L, Hai-Yan G, Jin-Lin Z. 2009. Proteomic analysis of proteins in the salivary glands of the fed and unfed female tick *Rhipicephalus haemaphysaloides*. **Agricultural Sciences in China**, 8(1):121-127.
- Francischetti IMB, Meng Z, Mans BJ, Gudderra N, Hall M, Veenstra TD, Pham VM, Kotsyfakis M, Ribeiro JMC. 2008. An insight into the salivary transcriptome and proteome of the soft tick and vector of epizootic bovine abortion, *Ornithodoros coriaceus*. **J. Proteomics**, 71:493-512.
- Francischetti IMB, Sá-Nunes A, Mans BJ, Santos IM, Ribeiro JMC. 2010. The role of saliva in tick feeding. **Front Biosc.**, 14:2051-2088.
- Fukumoto S, Sakaguchi T, You M, Xuan X, Fujisaki K. 2006. Tick troponin I-like molecule is a potent inhibitor for angiogenesis. **Microvascular Research**, 71:218-221.
- Garcia GR, Gardinassi LG, Ribeiro JM, Anatriello E, Ferreira BR, Moreira HNS, Mafra C, Martins MM, Szabó MPJ, Miranda-Santos IKF, Maruyama SR. 2014. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasites & Vectors**, 7(430):1-18.
- Gaywee J, Radulovic S, Higgins JA, Azad AF. 2002. Transcriptional analysis of *Rickettsia prowazekii* invasion gene homolog (*invA*) during host cell infection. **Infect. Immun.**, 70(11):6346-6354.
- GE Healthcare. Handbooks. **2-D electrophoresis: Principles and Methods**. 2004.162p.
- Guglielmone AA, Szabó MPJ, Martins JR, Estrada-Peña A. 2006. **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal**. In: Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. P. 115-138.

- Gupta R, Brunak S. 2002. Prediction of glycosylation across the human proteome and the correlation to protein function. **Pacific Symposium on Biocomputing**, 7:310-322.
- Hajdusek O, Sojka D, Kopacek P, Buresova V, Franta Z, Sauman I, Winzerling J, Grubhoffer L. 2009. Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development. **PNAS**, 106(4):1033-1038.
- Hajdusek O, Sima R, Perner J, Loosova G, Harcubova A, Kopacek P. 2016. Tick iron and heme metabolism – New target for an anti-tick intervention. **Tick and Tick-borne Diseases**, 7:565-572.
- Heberle H, Meirelles GV, Silva FR, Telles GP, Minghim R. 2015. InteractiVenn: a web-based tool for the Analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, 16(169):1-7.
- Heller M, Mattou H, Menzel C, Yao X. 2003. Trypsin catalyzed ¹⁶O-to¹⁸O exchange for comparative proteomics: Tandem mass spectrometry comparison using MALDI-TOF, ESI-QTOF, and ESI-Ion Trap mass spectrometers. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, 14:704-718.
- Hughes AL. 2013. Evolution of the salivary apyrases of blood-feeding arthropods. **Gene**, 527:123-130.
- Jacobs JM, Yang X, Luft BJ, Dunn JJ, Camp II DG, Smith RD. 2005. Proteomic analysis of Lyme disease: Global protein comparison of three strains of *Borrelia burgdorferi*. **Proteomics**, 5:1446-1453.
- James AM, Zhu XX, Oliver Jr JH. 1999. Localization of vitellogenin production in the blacklegged tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Invertebrate Reproduction and Development**, 35(1):81-87.
- Jiang X, Gao J, Wang W, Xu M, Li W, Qi M, Yang C, Ji L, Zhang D, Luo J, Yin H. 2014. Molecular characterization of an alanine-, proline-, glycine-, threonine-, and serine-rich protein of the hard tick *Haemaphysalis qinghaiensis* and its effect as a vaccine against tick infestation in sheep. **Ticks and Tick-borne Diseases**, 5:14-20.
- Karim S, Singh P, Ribeiro JMC. 2011. A deep insight into the sialotranscriptome of the Gulf Coast tick, *Amblyomma maculatum*. **PLoS ONE**, 6(12):1-19.

- Karim S, Ribeiro JMC. 2015. An Insight into the sialome of the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*, with a glimpse on its time dependent gene expression. **PLoS ONE**, 10(7):e0131292.
- Keller A, Nesvizhskii AI, Kolker E, Aebersold R. 2002. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. **Anal. Chem.**, 74:5383-5392.
- Kemp DH, Stone BF, Binnington KC. 1982. **Tick attachment and feeding: Role of the mouthparts, feeding apparatus, salivary gland secretions and the host response.** In: *Physiology of ticks*. Edited by: Obechain G. Oxford, Pergamon Press Ltd; 1982:119-168.
- Kovar L. 2004. Tick saliva in anti-tick immunity and pathogen transmission. **Folia Microbiol**, 49(3):327-336.
- Labruna MB. 2009. Ecology of Rickettsia in South America. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 1166:156-166.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-685.
- Leal BF, Seixas A, Mattos RT, Coutinho ML, Masuda A, Vaz Jr IS, Ferreira CAS. 2013. Tissue expression and the host's immunological recognition of a *Rhipicephalus microplus* paramyosin. **Veterinary Parasitology**, 197:304-311.
- Lin M, Kikuchi T, Brewer HM, Norbeck AD, Rikihisa Y. 2011. Global proteomic analysis of two tick-borne emerging zoonotic agents: *Anaplasma phagocytophilum* and *Ehrlichia chaffeensis*. **Frontiers in Microbiology**, 2(24):1-19.
- Ludwig B, Bender E, Arnold S, Hütteman M, Lee I, Kadenbach B. 2001. Cytochrome c Oxidase and regulation of oxidative phosphorylation. **ChemBiochem**, 2:392-403.
- Ma B, Zhang K, Hendrie C, Liang C, Li M, Doherty-Kirby A, Lajoie G. 2003. PEAKS: powerful software for peptide *de novo* sequencing by tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, 17:2337-2342.
- Manfredi M, Martinotti S, Gosetti F, Ranzato E, Marengo E. 2016. The secretome signature of malignant mesothelioma cell lines. **Journal of Proteomics**, doi: 10.1016/j.jprot.2016.02.021.

- Marchler-Bauer A, Panchenko AR, Shoemaker BA, Thiessen PA, Geer LY, Bryant SH. 2002. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. **Nucleic Acids Research**, 30(1):281-283.
- Martinez JJ, Seveau S, Veiga E, Matsuyama S, Cossart P. 2005. Ku70, a component of DNA-dependent protein kinase, is a mammalian receptor for *Rickettsia conorii*. **Cell**, 123:1013-1023.
- Maruyama SR, Anatriello E, Anderson JM, Ribeiro JMC, Brandão LG, Valenzuela JG, Ferreira BR, Garcia GR, Szabo MPJ, Patel S, Bishop R, Miranda-Santos IKF. 2010. The expression of genes coding for distinct types of glycine-rich proteins varies according to the biology of three metastriate ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Amblyomma cajennense*. **BMC Genomics**, 11(363):1-17.
- Massard CL, Fonseca AH. 2004. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. **A Hora Veterinária**, 135(1): 15-23.
- Nakamoto H, Vigh L. 2007. The small heat shock proteins and their clients. **Cell. Mol. Life Sci.**, 64:294-306.
- Nava S, Beati L, Labruna MB, Cáceres AG, Mangold AJ, Guglielmone AA. 2014. Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum* Koch, 1844, and *Amblyomma sculptum*, Berlese, 1888 (Ixodida: Ixodidae). **Ticks Tick Borne Dis.**, 5(3):252-276.
- Needham GR, Rosell R, Greenwald L, Coons LB. 1990. Ultrastructure of type-I salivary-gland acini in four species of ticks and the influence of hydration states on the type-I acini of *Amblyomma americanum*. **Exp. Appl. Acarol.**, 10:83-104.
- Nesvizhskii AI, Keller A, Kolker E, Aebersold R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. **Anal. Chem.**, 75:4646-4658.
- Nunes PH, Bechara GH, Camargo-Mathias MI. 2008. Morphological changes in the salivary glands of *Amblyomma cajennense* females (Acari: Ixodidae) in

- different feeding stages on rabbits at first infestation. **Exp. Appl. Acarol.**, 45:199-209.
- Ogihara K, Horigane M, Nakajima Y, Moribayashi A, Taylor D. 2007. Ecdysteroid hormone titer and its relationship to vitellogenesis in the soft tick, *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). **General and Comparative Endocrinology**, 150:371-380.
- Oleaga A, Escudero-Población A, Camafeita E, Pérez-Sánchez R. 2007. A proteomic approach to the identification of salivary proteins from the argasid ticks *Ornithodoros moubata* and *Ornithodoros erraticus*. **Insect Biochem. Molec.**, 37:1149-1159.
- Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Astigarraga A, Encinas-Grandes A. 1994. Detection of pig farms with *Ornithodoros erraticus* by pig serology. Elimination of non-specific reactions by carbohydrate epitopes of salivary antigens. **Vet. Parasitol.**, 52(1-2):97-111.
- Oliveira PR, Borges LMF, Lopes CML, Leite RC. 2000. Population dynamics of the free-living stages of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) on pastures of Pedro Leopoldo, Minas Gerais State, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 92:295-301.
- Olivieri JA, Serra-Freire NM. 1992. Structure of the salivary glands of the unfed female tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 87:167-174.
- Parola P, Raoult D. 2001. Ticks and Tickborne Bacterial Diseases in Humans: An Emerging Infectious Threat. **Clinical Infectious Diseases**, 2001(32):897–928.
- Perner J, Sobotka R, Sima R, Konvickova J, Sojka D, Oliveira PL, Hajdusek O, Kopacek P. 2016. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. **eLIFE**, 5:e12318.
- Rachinsky A, Guerrero FD, Scoles GA. 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. **Vet. Parasitol.**, 152:294-313.
- Renesto P, Samson L, Ogata H, Azza S, Fourquet P, Gorvel JP, Heinzen RA, Raoult D. 2006. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. **Res. Microbiol.**, 157:605-612.

- Ribeiro JMC, Anderson JM, Manoukis NC, Meng Z, Francischetti IMB. 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. **BMC Genomics**, 12(136):1-11.
- Santos A, Ribeiro JMC, Lehane MJ, Gontijo NF, Veloso AB, Sant'anna MRV, Araújo RN, Grisard EC, Pereira MH. 2007. The sialotranscriptome of the blood-sucking bug *Triatoma brasiliensis* (Hemiptera, Triatominae). **Insect Biochem. Molec.**, 37:702-712.
- Sauer JR, McSwain JL, Bowman AS, Essenberg RC. 1995. Tick salivary gland physiology. **Annu. Rev. Entomol.**, 40:245-267.
- Schäffer AA, Wolf YI, Ponting CP, Koonin EV, Aravind L, Altschul SF. 1999. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. **Bioinformatics**, 15(12):1000-1011.
- Serra-Freire NM, Olivieri JA. 1993. Structure of the salivary glands of the unfed male tick *Amblyomma cajennense* (Fabricius) (Acarina: Ixodidae). **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 88(2):207-213.
- Shevchenko A, Tomas H, Havlis J, Olsen JV, Mann M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. **Nature Protocols**, 1(6):2856-2860.
- Silverman DJ, Santucci LA, Meyers N, Sekeyova Z. 1992. Penetration of host cells by *Rickettsia rickettsii* appears to be mediated by a phospholipase of rickettsial origin. **Infect. Immun.**, 60(7):2733-2740.
- Sonenshine DE, Roe RM. 2014. **Biology of ticks – 2nd edition**. Oxford University Press, NY, USA. 540p.
- Steentoft C, Vakhrushev SY, Joshi HJ, Kong H, Vester-Christensen MB, Schjoldager KTBG, Lavrsen K, Dabelsteen S, Pedersen NB, Marcos-Silva L, Gupta R, Bennett EP, Mandel U, Brunak S, Wandall HH, Lavery SB, Clausen H. 2013. Precision mapping of the human O-GalNAc glycoproteome through simplecell technology. **EMBO J.**, 32:1478-1488.
- Stein KR, Giardina BJ, Chiang HL. 2014. The non-classical pathway is the major pathway to secrete proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. **Clin. Exp. Pharmacol.**, 4(3):1-11.

- Tan AWL, Francischetti IMB, Slovak M, Kini RM, Ribeiro JMC. 2015. Sexual differences in the sialomes of the zebra tick, *Rhipicephalus pulchellus*. **Journal of Proteomics**, 117:120-144.
- Tatusov RL, Fedorova ND, Jackson JD, Jacobs AR, Kiryutin B, Koonin EV, Krylov DM, Mazumder R, Mekhedov SL, Nikolskaya AN, Rao BS, Smirnov S, Sverdlov AV, Vasudevan S, Wolf YI, Yin JJ, Natale DA. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. **BMC Bioinformatics**, 4:1-14.
- Teyssere N, Boudier JA, Raoult D. 1995. *Rickettsia conorii* entry into Vero Cells. **Infect. Immun.**, 63(1):366-374.
- Thompson DM, Khalil SMS, Jeffers LA, Ananthapadmanaban U, Soneshine DE, Mitchell RD, Osgood CJ, Apperson CS, Roe RM. 2005. In vivo role of 20-hydroxyecdysone in the regulation of the vitellogenin mRNA and egg development in the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Say). **Journal of Insect Physiology**, 51:1105-1116.
- Tirloni L, Reck J, Terra RMS, Martins JR, Mulenga A, Sherman NE, Fox JW, Yates III JR, Termignoni C, Pinto AFM, Vaz Jr IS. 2014. Proteomic Analysis of cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* saliva: A comparison between partially and fully engorged females. **PLoS ONE**, 9(4):1-19.
- Tirloni L, Islam MS, Kim TK, Diedrich JK, Yates III JR, Pinto AFM, Mulenga A, You MJ, Vaz Jr IS. 2015. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. **Parasites & Vectors**, 8(338):1-23.
- Villar M, Torina A, Nuñez Y, Zivkovic Z, Marina A, Alongi A, Scimeca S, La Barbera G, Caracappa S, Vázquez J, De La Fuente J. 2010. Application of highly sensitive saturation labeling to the analysis of differential protein expression in infected ticks from limited samples. **Proteome Sci.**, 8(43):1-14.
- Villar M, Popara M, Mangold AJ, De La Fuente J. 2014. Comparative proteomics for the characterization of the most relevant *Amblyomma* tick species as vectors of zoonotic pathogens worldwide. **J. Proteomics**, 105 :204-216.

- Walker DH, Valbuena GA, Olano JP. 2003. Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 990:1-11.
- Walker TS, Winkler HH. 1978. Penetration of cultured mouse fibroblasts (L Cells) by *Rickettsia prowazeki*. **Infect. Immun.**, 22(1):200-208.
- Williams JC, Walker DH, Peacock MG, Stewart ST. 1986. Humoral immune response to Rocky Mountain Spotted Fever in experimentally infected Guinea Pigs: Immunoprecipitation of lactoperoxidase ¹²⁵I-labeled proteins and detection of soluble antigens of *Rickettsia rickettsii*. **Infect. Immun.**, 52(1):120-127.
- Winkler HH, Miller ET. 1982. Phospholipase A and the interaction of *Rickettsia prowazekii* and mouse fibroblasts (L-929 Cells). **Infect. Immun.**, 38(1):109-113.
- Wisniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M. 2009. Universal sample preparation method for proteome analysis. **Nature Methods**, 6(5):359-363.
- Yates III JR, Ruse CI, Nakorchevsky A. 2009. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, 11:49-79.

ANEXO 1

Tabela 3: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos *A. sculptum* não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 1).

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
29	A0A023FFZ3	Putative trna selenocysteine 1-associated protein 1	24	3	15	Female	Male	RNA processing and modification	A
118	A0A023FKZ2	Putative grp-3 321 glycine rich family (Fragment)	31	3	13	Female	Male	RNA processing and modification	A
174	A0A023FPJ7	Putative small ribonucleoprotein particle protein smg (Fragment)	8	1	17	Female	Male	RNA processing and modification	A
262	A0A023GH95	Putative rbp1-like protein	15	2	20	Female	Male	RNA processing and modification	A
269	A0A023GI51	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f	33	5	20	Female	Male	RNA processing and modification	A
272	A0A023GIP7	Putative grp-3 498 glycine rich family	24	6	34	Female	Male	RNA processing and modification	A
14	A0A023FEK0	Putative grp-3 498 glycine rich family	35	1	3	Female		RNA processing and modification	A
21	A0A023FF79	Putative hoi-polloi	14	2	19	Female		RNA processing and modification	A
34	A0A023FGA0	Putative small nuclear ribonucleoprotein sm d3	13	1	8	Female		RNA processing and modification	A
99	A0A023FK48	Putative rna-binding protein elav/hu rrm superfamily	34	1	3	Female		RNA processing and modification	A
110	A0A023FKM7	Putative polyc-binding hnnp-k protein hrb57a/hnnp	34	1	4	Female		RNA processing and modification	A
349	B7QIT4	Pre-mRNA splicing factor Syf1, putative	100	1	1	Female		RNA processing and modification	A
28	A0A023FFY5	Putative small nuclear ribonucleoprotein f	9	1	14		Male	RNA processing and modification	A
101	A0A023FK55	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 27c	34	1	3		Male	RNA processing and modification	A
124	A0A023FLE7	Putative apoptosis-promoting rna-binding protein tia-1/tiar rrm superfamily (Fragment)	35	1	4		Male	RNA processing and modification	A
291	A0A061QLH9	Putative hnRMP	31	1	3		Male	RNA processing and modification	A
396	L7LZC8	Putative trna and rna cytosine-c5-methylase nucleolar protein nol1/nop2	79	1	1		Male	RNA processing and modification	A
397	L7LZS2	Putative deah-box rna helicase	231	1	0		Male	RNA processing and modification	A
405	L7MBD6	Putative tick transposon (Fragment)	131	1	1		Male	RNA processing and modification	A

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
519	L7MD82	Putative tick transposon (Fragment)	121	1	1		Male	RNA processing and modification	A
373	G0N5F0	Putative uncharacterized protein	264	1	1		Male	RNA processing and modification	A
415	Q16UL0	AAEL009878-PA	207	1	1	Female		RNA processing and modification	A
56	A0A023FHH5	Histone H2A	13	3	31	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
210	A0A023FT54	Histone H4 (Fragment)	12	5	49	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
267	A0A023GHR7	Histone H2B	14	4	32	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
368	F0JA43	Histone H3	15	1	5	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
490	A0A0D6L5R9	Histone H4	37	3	7	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
497	B2ZFA6	Histone H2B	14	3	23	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
524	R7T426	Histone H4	25	2	15	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
537	V5HD08	Putative structural maintenance of chromosomes 4 (Fragment)	139	1	1	Female	Male	Chromatin structure and dynamics	B
350	B7QLX5	Fetal alzheimer antigen, putative (EC 2.3.1.48)	267	1	0		Male	Chromatin structure and dynamics	B
370	F1SZA1	Histone H2B-like	14	2	18		Male	Chromatin structure and dynamics	B
412	L7MJL2	Putative zinc finger and btb domain-containing protein 17 (Fragment)	222	1	1		Male	Chromatin structure and dynamics	B
13	A0A023FEB2	Citrate synthase	52	8	21	Female	Male	Energy production and conversion	C
36	A0A023FGC0	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit g/atp20	11	2	22	Female	Male	Energy production and conversion	C
50	A0A023FH45	Putative cytochrome c oxidase subunit va	18	5	31	Female	Male	Energy production and conversion	C
57	A0A023FHH7	Putative atp synthase subunit d	20	4	30	Female	Male	Energy production and conversion	C
72	A0A023FID1	Putative succinyl-coa synthetase alpha subunit	34	3	13	Female	Male	Energy production and conversion	C
74	A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	32	6	26	Female	Male	Energy production and conversion	C
76	A0A023FIN3	Putative oligomycin sensitivity-conferring protein (Fragment)	19	4	30	Female	Male	Energy production and conversion	C
77	A0A023FIQ0	Putative mitochondrial adp/atp carrier	35	6	22	Female	Male	Energy production and conversion	C
87	A0A023FJA0	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufv2/24 kd subunit	28	2	10	Female	Male	Energy production and conversion	C

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
105	A0A023FKC0	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	35	13	49	Female	Male	Energy production and conversion	C
106	A0A023FKC4	Putative nadp-dependent isocitrate dehydrogenase (Fragment)	54	8	20	Female	Male	Energy production and conversion	C
108	A0A023FKF7	Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase) (EC 4.2.1.-)	85	4	7	Female	Male	Energy production and conversion	C
112	A0A023FKR0	ATP synthase subunit alpha	60	16	36	Female	Male	Energy production and conversion	C
135	A0A023FM60	Putative glycolate oxidase	44	12	36	Female	Male	Energy production and conversion	C
141	A0A023FM91	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	58	6	13	Female	Male	Energy production and conversion	C
146	A0A023FM10	Putative acetyl-coa hydrolase	51	2	6	Female	Male	Energy production and conversion	C
157	A0A023FND3	ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (Fragment)	56	18	50	Female	Male	Energy production and conversion	C
165	A0A023FNX0	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufs8/23 kDa subunit	23	2	11	Female	Male	Energy production and conversion	C
202	A0A023FRK5	Putative atp synthase h+ transporting mitochondrial f1 complex delta subunit (Fragment)	19	1	8	Female	Male	Energy production and conversion	C
221	A0A023FUK2	Putative glycolate oxidase (Fragment)	32	4	19	Female	Male	Energy production and conversion	C
229	A0A023FVI3	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit oscp/atp5 (Fragment)	24	2	9	Female	Male	Energy production and conversion	C
240	A0A023FZX4	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	60	15	33	Female	Male	Energy production and conversion	C
249	A0A023G7L4	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	42	4	14	Female	Male	Energy production and conversion	C
266	A0A023GHQ7	Putative nadh dehydrogenase	14	2	16	Female	Male	Energy production and conversion	C
280	A0A023GLT7	Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit	36	2	7	Female	Male	Energy production and conversion	C
311	A0A0C9S2J9	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	36	3	12	Female	Male	Energy production and conversion	C
312	A0A0C9SBD7	Putative mitochondrial atp synthase epsilon chain	7	1	22	Female	Male	Energy production and conversion	C
328	B2D2D5	Cytochrome c oxidase subunit Va (Fragment)	17	2	17	Female	Male	Energy production and conversion	C
359	E2BJ78	Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	35	1	4	Female	Male	Energy production and conversion	C
30	A0A023FG16	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufa2/b8 subunit	11	1	11	Female		Energy production and conversion	C
115	A0A023FKT5	Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2 (Fragment)	37	3	12	Female		Energy production and conversion	C
134	A0A023FM54	Succinyl-CoA ligase subunit beta (EC 6.2.1.-)	41	1	3	Female		Energy production and conversion	C

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
169	A0A023FP71	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit e	10	1	16	Female		Energy production and conversion	C
275	A0A023GKI9	Putative nadh-ubiquinone oxidoreductase ndufs3/30 kDa subunit	31	1	5	Female		Energy production and conversion	C
277	A0A023GKS1	Putative aldehyde dehydrogenase	53	1	2	Female		Energy production and conversion	C
376	G3MGG7	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	62	6	15	Female		Energy production and conversion	C
392	L7LWU5	Putative microtubule associated complex	28	1	5	Female		Energy production and conversion	C
398	L7M097	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase	54	7	19	Female		Energy production and conversion	C
401	L7M642	Putative zinc-binding oxidoreductase	36	1	4	Female		Energy production and conversion	C
447	V5IFY7	Putative mitochondrial adp/atp carrier	36	1	2	Female		Energy production and conversion	C
488	A0A0A1WJM9	Fatty aldehyde dehydrogenase	62	1	2	Female		Energy production and conversion	C
53	A0A023FH84	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	32	1	4		Male	Energy production and conversion	C
55	A0A023FHB9	Putative lipid particle	13	1	9		Male	Energy production and conversion	C
133	A0A023FLY2	Putative prohibitins and stomatins of the pid superfamily	40	1	4		Male	Energy production and conversion	C
150	A0A023FML0	Putative aldehyde dehydrogenase	53	1	2		Male	Energy production and conversion	C
193	A0A023FQU2	Putative cytochrome c ixodes scapularis cytochrome c (Fragment)	14	2	19		Male	Energy production and conversion	C
203	A0A023FRY9	Putative atp synthase subunit b	31	2	10		Male	Energy production and conversion	C
234	A0A023FWF1	Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2	49	3	9		Male	Energy production and conversion	C
236	A0A023FWN3	Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit	35	2	6		Male	Energy production and conversion	C
276	A0A023GKQ8	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	52	3	8		Male	Energy production and conversion	C
283	A0A023GMK2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (EC 1.2.4.1)	44	1	3		Male	Energy production and conversion	C
322	A7XZJ2	Arginine kinase	40	1	3		Male	Energy production and conversion	C
331	B3S5R6	Aldehyde dehydrogenase	59	1	2		Male	Energy production and conversion	C
338	B7PFJ2	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	46	1	3		Male	Energy production and conversion	C
440	V5HQ19	Citrate synthase (Fragment)	59	3	6		Male	Energy production and conversion	C

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
468	A0A023FKN0	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (EC 1.10.2.2)	30	1	3		Male	Energy production and conversion	C
383	G3MPB4	Putative uncharacterized protein	61	1	3	Female	Male	Energy production and conversion	C
178	A0A023FPW3	Uncharacterized protein (Fragment)	15	1	7	Female		Energy production and conversion	C
301	A0A087UX43	Uncharacterized protein (Fragment)	79	1	2		Male	Energy production and conversion	C
89	A0A023FJG7	Putative leucine-rich acidic nuclear protein	30	1	3		Male	Cell cycle control	D
400	L7M506	Putative lamin	70	1	2		Male	Cell cycle control	D
329	B3LXL3	Uncharacterized protein	128	1	1		Male	Cell cycle control	D
98	A0A023FK31	Putative dihydropteridine reductase dhpr/qpdr	25	4	24	Female	Male	Amino acid transport and metabolism	E
158	A0A023FND7	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	56	2	5	Female	Male	Amino acid transport and metabolism	E
162	A0A023FNI1	Putative glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase	62	4	8	Female	Male	Amino acid transport and metabolism	E
346	B7Q1F6	GOT2 aspartate aminotransferase, putative (EC 2.6.1.1)	44	1	4	Female		Amino acid transport and metabolism	E
94	A0A023FJS2	Putative glycine c-acetyltransferase/2-amino-3-ketobutyrate-coa ligase	45	1	3		Male	Amino acid transport and metabolism	E
231	A0A023FW59	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	46	1	3		Male	Amino acid transport and metabolism	E
62	A0A023FHW5	Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	17	5	40	Female	Male	Nucleotide transport and metabolism	F
96	A0A023FJZ1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	55	4	9	Female		Nucleotide transport and metabolism	F
139	A0A023FM85	Putative dihydroorotase (Fragment)	43	1	3	Female		Nucleotide transport and metabolism	F
145	A0A023FMG7	Putative phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase	46	2	9	Female		Nucleotide transport and metabolism	F
242	A0A023G079	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase (Fragment)	69	1	2	Female		Nucleotide transport and metabolism	F
271	A0A023GI14	Putative 5'-nucleotidase (Fragment)	36	1	3	Female		Nucleotide transport and metabolism	F
86	A0A023FJ79	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	27	6	34	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
153	A0A023FN20	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	49	2	7	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
227	A0A023FUW9	Putative alpha-d-galactosidase melibiase	60	11	25	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
230	A0A023FW03	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	40	5	18	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
233	A0A023FWA3	Putative enolase	47	7	21	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
235	A0A023FWM8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	36	16	61	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
274	A0A023GIU8	Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	38	5	17	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
458	B5TMF7	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	36	2	12	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
466	A0A023FIE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	36	10	43	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
479	A0A087TRD9	Solute carrier family 45 member 4 (Fragment)	26	1	5	Female	Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
341	B7PM74	Secreted protein, putative (EC 2.4.1.228) (Fragment)	34	1	6		Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
375	G3MGB9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment)	45	2	4		Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
529	T1KF71	UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)	48	1	3		Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
428	T1KZ51	Uncharacterized protein	106	1	1		Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
453	W4YE44	Uncharacterized protein	43	1	3		Male	Carbohydrate transport and metabolism	G
403	L7M8R8	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	48	3	9	Female		Coenzyme transport and metabolism	H
259	A0A023GGX5	Putative s-adenosylcysteine hydrolase (Fragment)	28	3	13		Male	Coenzyme transport and metabolism	H
73	A0A023FIF5	Putative enoyl-coa hydratase	31	2	11	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
123	A0A023FLB7	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase)	44	6	18	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
147	A0A023FMI5	Putative vitellogenin-2 (Fragment)	95	7	11	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
v156	A0A023FNC5	Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase	83	2	4	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
172	A0A023FPG2	Putative acetyl-coa acetyltransferase (Fragment)	54	1	2	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
173	A0A023FPJ3	Putative tpa exp: fatty acid-binding protein fabp (Fragment)	18	4	36	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
205	A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment)	177	17	15	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
226	A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2	177	12	10	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
282	A0A023GME3	Putative vitellogenin-1 (Fragment)	154	12	10	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
313	A0A0C9SE68	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (Fragment)	44	5	14	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
316	A0MVX0	Heme lipoprotein	177	4	3	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
416	Q19V51	Hemelipoglycoprotein	178	4	3	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
97	A0A023FJZ4	Putative 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	34	1	4	Female		Lipid transport and metabolism	I
126	A0A023FLH9	Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase (Fragment)	46	1	4	Female		Lipid transport and metabolism	I
238	A0A023FYX2	Putative vitellogenin-2	178	3	3	Female		Lipid transport and metabolism	I
253	A0A023GDS5	Putative microtubule associated complex (Fragment)	117	1	1	Female		Lipid transport and metabolism	I
281	A0A023GMC7	Putative vitellogenin-1 (Fragment)	123	5	5	Female		Lipid transport and metabolism	I
284	A0A023GN38	Putative lysosomal & prostatic acid phosphatase	43	2	5	Female		Lipid transport and metabolism	I
292	A0A087SX23	Putative malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial (Fragment)	44	1	3	Female		Lipid transport and metabolism	I
342	B7PQP7	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.211) (Fragment)	80	1	1	Female		Lipid transport and metabolism	I
441	V5HV95	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (Fragment)	38	1	3	Female		Lipid transport and metabolism	I
538	V5HMG5	Putative vitellogenin-b (Fragment)	256	1	0	Female		Lipid transport and metabolism	I
2	A0A023FC72	Putative enoyl-coa isomerase (Fragment)	32	1	3		Male	Lipid transport and metabolism	I
121	A0A023FL46	Putative short-chain acyl-coa dehydrogenase	45	1	3		Male	Lipid transport and metabolism	I

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
129	A0A023FLT6	Putative vitellogenin-2	79	3	5		Male	Lipid transport and metabolism	I
268	A0A023GI46	Putative enoyl-coa hydratase	33	1	3		Male	Lipid transport and metabolism	I
286	A0A023GP33	Putative animal-type fatty acid synthase (Fragment)	86	1	1		Male	Lipid transport and metabolism	I
344	B7PWX1	Phospholipase A-2-activating protein, putative (EC 2.7.11.7) (Fragment)	87	1	1		Male	Lipid transport and metabolism	I
385	G3MR88	Putative uncharacterized protein	46	1	3	Female	Male	Lipid transport and metabolism	I
11	A0A023FDU6	Putative ribosomal protein	12	2	37	Female	Male	Translation	J
26	A0A023FFU4	Putative 40s ribosomal protein s2	18	3	24	Female	Male	Translation	J
40	A0A023FGF3	Putative 60s acidic ribosomal protein p1	13	1	12	Female	Male	Translation	J
49	A0A023FH17	Putative 40s ribosomal protein s16	17	4	28	Female	Male	Translation	J
52	A0A023FH77	40S ribosomal protein S21	9	1	18	Female	Male	Translation	J
70	A0A023FIA8	60S acidic ribosomal protein P0	35	5	21	Female	Male	Translation	J
111	A0A023FKN1	60S acidic ribosomal protein P0	35	4	13	Female	Male	Translation	J
125	A0A023FLH7	Putative translation initiation factor	37	2	8	Female	Male	Translation	J
160	A0A023FNE9	Putative elongation factor 2-like isoform 1	95	6	9	Female	Male	Translation	J
255	A0A023GEE1	Putative ubiquitin-40s ribosomal protein s27a (Fragment)	10	6	66	Female	Male	Translation	J
270	A0A023GI67	40S ribosomal protein SA	35	3	12	Female	Male	Translation	J
289	A0A034WU61	40S ribosomal protein S28 (Fragment)	12	2	21	Female	Male	Translation	J
310	A0A0C9RRZ5	Putative ribosomal protein	12	2	37	Female	Male	Translation	J
366	F0J8I9	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	43	5	19	Female	Male	Translation	J
413	M1XK28	40S ribosomal protein S28	14	2	18	Female	Male	Translation	J
472	A0A023FY92	Putative translation elongation factor ef-1 alpha/tu	31	5	19	Female	Male	Translation	J
492	A6NA05	Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a	17	4	26	Female	Male	Translation	J
25	A0A023FFK4	Putative ribosomal protein s18	18	1	8	Female		Translation	J

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
38	A0A023FGE1	Putative ribosomal protein l31	15	1	7	Female		Translation	J
44	A0A023FGV4	40S ribosomal protein S12	14	1	11	Female		Translation	J
130	A0A023FLU8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	39	1	4	Female		Translation	J
294	A0A087TAB2	Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment)	48	1	4	Female		Translation	J
354	C9W1L6	40S ribosomal protein S27	9	1	13	Female		Translation	J
357	E1GEU2	40S ribosomal protein S16	16	1	8	Female		Translation	J
465	A0A023FFM0	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	17	1	6	Female		Translation	J
500	B7P5Y5	tRNA (Adenine-N(1)-)-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6, putative (Fragment)	41	1	2	Female		Translation	J
83	A0A023FIY8	Putative 60s ribosomal protein l9	22	2	13		Male	Translation	J
93	A0A023FJQ1	Putative translation elongation factor ef-1 gamma	49	1	2		Male	Translation	J
95	A0A023FJS7	Putative atp-dependent rna helicase	48	2	6		Male	Translation	J
296	A0A087U9V3	Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic (Fragment)	127	1	1		Male	Translation	J
362	E5T132	Putative ubiquitin family protein	12	4	39		Male	Translation	J
367	F0JA20	Truncated 40S ribosomal protein S7 (Fragment)	22	1	6		Male	Translation	J
418	Q6WCQ5	Ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	85	1	1		Male	Translation	J
377	G3MHT8	Putative uncharacterized protein (Fragment)	24	1	7	Female	Male	Translation	J
378	G3MI35	Putative uncharacterized protein (Fragment)	28	3	15	Female	Male	Translation	J
384	G3MR86	Putative uncharacterized protein	22	5	28	Female	Male	Translation	J
513	G3MIP1	Putative uncharacterized protein (Fragment)	51	1	2	Female		Translation	J
333	B7P1V6	Putative uncharacterized protein	178	1	0		Male	Translation	J
24	A0A023FFK0	Putative dorsal switch protein 1	24	3	18	Female	Male	Transcription	K
31	A0A023FG19	Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment)	17	2	14	Female	Male	Transcription	K
204	A0A023FS18	Putative salivary gland-associated protein	20	1	7	Female	Male	Transcription	K

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
244	A0A023G3G9	Putative triple helix repeat-containing collagen	53	1	4	Female	Male	Transcription	K
476	A0A087SW11	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 (Fragment)	56	1	1	Female		Transcription	K
501	B7P8J7	Transcription factor, putative (Fragment)	46	1	2	Female		Transcription	K
505	D6WDN7	Zinc finger protein 271-like Protein	51	1	2	Female		Transcription	K
315	A0A0D8Y9K3	RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dimerization domain protein	52	1	2		Male	Transcription	K
339	B7PJK2	Tho2 protein, putative	148	1	1		Male	Transcription	K
411	L7MJB2	Putative tef-1 (Fragment)	55	1	2		Male	Transcription	K
183	A0A023FQ85	Uncharacterized protein (Fragment)	144	24	23	Female	Male	Transcription	K
426	T1KLC0	Uncharacterized protein	35	1	2	Female	Male	Transcription	K
360	E3N179	Putative uncharacterized protein	44	1	2	Female		Transcription	K
343	B7PTZ6	Pacman protein, putative	127	1	1	Female		Replication, recombination and repair	L
306	A0A090XE53	Putative single-stranded dna-binding protein (Fragment)	11	1	10		Male	Replication	L
454	W6UZK1	Exonuclease	86	1	1		Male	Replication, recombination and repair	L
246	A0A023G500	Putative nidogen (Fragment)	124	1	1		Male	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	M
527	T1JYW1	Uncharacterized protein	83	1	1	Female		Cell wall/membrane/envelope biogenesis	M
10	A0A023FDS6	Thioredoxin	12	4	50	Female	Male	Posttranslational modification	O
23	A0A023FFI9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	22	8	46	Female	Male	Posttranslational modification	O
27	A0A023FFW7	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant	26	7	31	Female	Male	Posttranslational modification	O
35	A0A023FGB2	Putative alpha crystallins (Fragment)	21	6	32	Female	Male	Posttranslational modification	O
42	A0A023FGK2	Putative thioredoxin peroxidase	22	2	12	Female	Male	Posttranslational modification	O
59	A0A023FHI8	Putative alpha crystallins	20	3	17	Female	Male	Posttranslational modification	O
61	A0A023FHR7	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1) (Fragment)	21	2	10	Female	Male	Posttranslational modification	O

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
63	A0A023FI08	Putative multifunctional chaperone ixodes scapularis multifunctional chaperone	29	3	11	Female	Male	Posttranslational modification	O
71	A0A023FIC2	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase	26	9	38	Female	Male	Posttranslational modification	O
85	A0A023FJ75	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	27	2	10	Female	Male	Posttranslational modification	O
88	A0A023FJC3	Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb4/pre4	28	2	11	Female	Male	Posttranslational modification	O
90	A0A023FJM5	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase	26	4	22	Female	Male	Posttranslational modification	O
91	A0A023FJP8	Putative tick metalloprotease 64 (Fragment)	47	6	14	Female	Male	Posttranslational modification	O
92	A0A023FJP9	Putative lethal 2 37cc	31	7	30	Female	Male	Posttranslational modification	O
100	A0A023FK49	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	26	2	12	Female	Male	Posttranslational modification	O
107	A0A023FKD7	Putative heat shock protein hsp 90-alpha isoform 1 (Fragment)	85	3	5	Female	Male	Posttranslational modification	O
137	A0A023FM70	Putative heat shock protein (Fragment)	72	14	26	Female	Male	Posttranslational modification	O
140	A0A023FM86	Putative tick metalloprotease 1 (Fragment)	58	4	9	Female	Male	Posttranslational modification	O
148	A0A023FMI6	Putative processing peptidase beta subunit ixodes scapularis processing peptidase beta subunit	53	5	11	Female	Male	Posttranslational modification	O
161	A0A023FNG9	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	12	27	Female	Male	Posttranslational modification	O
175	A0A023FPL0	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	55	8	19	Female	Male	Posttranslational modification	O
219	A0A023FUI3	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	29	8	37	Female	Male	Posttranslational modification	O
224	A0A023FUS3	Putative serine carboxypeptidase cpvl	57	1	2	Female	Male	Posttranslational modification	O
225	A0A023FUS8	Putative tick metalloprotease 1	58	3	8	Female	Male	Posttranslational modification	O
243	A0A023G2B2	Putative tick metalloprotease 1	58	2	2	Female	Male	Posttranslational modification	O
245	A0A023G4V0	Putative heat shock protein	21	1	7	Female	Male	Posttranslational modification	O
248	A0A023G7H2	Putative heat shock protein	22	2	16	Female	Male	Posttranslational modification	O
250	A0A023G841	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment)	29	2	10	Female	Male	Posttranslational modification	O
260	A0A023GGY0	Putative heat shock protein	11	2	26	Female	Male	Posttranslational modification	O

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
285	A0A023GNQ8	Putative t-complex protein 1 (Fragment)	59	1	2	Female	Male	Posttranslational modification	O
439	V5HEE5	Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	341	5	2	Female	Male	Posttranslational modification	O
467	A0A023FJ34	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	26	1	9	Female	Male	Posttranslational modification	O
539	V5RG72	Heat shock protein 70	70	1	2	Female	Male	Posttranslational modification	O
16	A0A023FEV4	Putative heat shock protein	11	2	24	Female		Posttranslational modification	O
46	A0A023FGZ7	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	30	1	4	Female		Posttranslational modification	O
119	A0A023FL38	Putative prohibitin 2	33	2	6	Female		Posttranslational modification	O
138	A0A023FM77	Putative serine carboxypeptidase lysosomal cathepsin a	54	1	2	Female		Posttranslational modification	O
167	A0A023FNY7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	28	1	6	Female		Posttranslational modification	O
180	A0A023FQ39	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	1	2	Female		Posttranslational modification	O
184	A0A023FQA2	Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb2/pre1 (Fragment)	19	1	5	Female		Posttranslational modification	O
201	A0A023FRK0	Putative salivary gland metalloprotease	58	3	6	Female		Posttranslational modification	O
252	A0A023GAP9	Putative alpha crystallins	23	2	10	Female		Posttranslational modification	O
299	A0A087URS9	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	13	1	10	Female		Posttranslational modification	O
320	A7TZ83	1433 protein zetalike [Apis florea] (Tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein)	28	3	11	Female		Posttranslational modification	O
509	E4W3Z1	Protein disulfide isomerase 3 (Fragment)	40	1	3	Female		Posttranslational modification	O
18	A0A023FF42	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	13	1	8		Male	Posttranslational modification	O
48	A0A023FH05	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase	25	2	10		Male	Posttranslational modification	O
78	A0A023FIR2	Putative alpha crystallins	20	5	27		Male	Posttranslational modification	O
116	A0A023FKU2	Putative stress-induced-phosphoprotein 1 (Fragment)	39	2	7		Male	Posttranslational modification	O
128	A0A023FLR7	Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment)	65	7	15		Male	Posttranslational modification	O
142	A0A023FMF0	Putative small heat shock protein ii	20	1	6		Male	Posttranslational modification	O

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
159	A0A023FNE4	Putative atpase of the aaa+ class posttranslational modification (Fragment)	92	4	6		Male	Posttranslational modification	O
166	A0A023FNY4	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1) (Fragment)	28	1	5		Male	Posttranslational modification	O
228	A0A023FV42	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (EC 3.4.19.12)	26	1	6		Male	Posttranslational modification	O
239	A0A023FZW2	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	1	2		Male	Posttranslational modification	O
278	A0A023GKU4	Putative processing peptidase beta subunit ixodes scapularis processing peptidase beta subunit	54	1	2		Male	Posttranslational modification	O
319	A6NA14	Truncated peroxiredoxin (Fragment)	21	1	12		Male	Posttranslational modification	O
337	B7PEV0	Chaperonin subunit, putative	60	3	8		Male	Posttranslational modification	O
352	C5J3T0	Hsp90	83	2	3		Male	Posttranslational modification	O
407	L7MG42	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	28	3	14		Male	Posttranslational modification	O
410	L7MJ61	Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	173	2	2		Male	Posttranslational modification	O
421	S5FWR8	Heat shock protein 60	62	3	8		Male	Posttranslational modification	O
433	T1PFK1	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	30	1	4		Male	Posttranslational modification	O
436	V5H3Z4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase)	69	1	2		Male	Posttranslational modification	O
449	W2TLS2	ATPase, AAA family	47	1	3		Male	Posttranslational modification	O
462	A0A023FDS5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)	11	1	13		Male	Posttranslational modification	O
261	A0A023GGY3	Uncharacterized protein	28	9	39	Female	Male	Posttranslational modification	O
374	G3MF27	Putative uncharacterized protein	73	4	8	Female	Male	Posttranslational modification	O
514	G3MMS7	Putative uncharacterized protein	18	1	4	Female		Posttranslational modification	O
214	A0A023FU35	Uncharacterized protein	23	1	6		Male	Posttranslational modification	O
380	G3MK62	Putative uncharacterized protein	56	1	2		Male	Posttranslational modification	O
382	G3MLW3	Putative uncharacterized protein	35	1	5		Male	Posttranslational modification	O
32	A0A023FG62	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	35	3	9	Female	Male	Inorganic ion transport and metabolism	P

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
67	A0A023F164	Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	24	2	11	Female	Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
113	A0A023FKR8	Putative mitochondrial voltage dependent anion-selective channel	30	6	28	Female	Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
144	A0A023FMF6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (EC 3.6.3.-)	115	12	15	Female	Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
155	A0A023FN97	Catalase (EC 1.11.1.6)	57	6	15	Female	Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
151	A0A023FMU5	Putative pln02957 copper zinc superoxide dismutase (Fragment)	10	1	16	Female		Inorganic ion transport and metabolism	P
307	A0A0A7CAN8	Catalase	58	1	3	Female		Inorganic ion transport and metabolism	P
353	C7SP07	Sodium/potassium ATPase alpha subunit (Fragment)	37	1	3	Female		Inorganic ion transport and metabolism	P
451	W4XA87	Catalase (EC 1.11.1.6)	56	1	3	Female		Inorganic ion transport and metabolism	P
43	A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	16	3	27		Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
263	A0A023GHE3	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	35	1	3		Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
448	W2TKS5	Calcium-activated BK potassium channel alpha subunit	108	1	1		Male	Inorganic ion transport and metabolism	P
452	W4Y783	Uncharacterized protein	323	1	0	Female		Inorganic ion transport and metabolism	P
132	A0A023FLX5	Putative short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	27	3	15	Female		Secondary metabolites biosynthesis	Q
425	T1K2M1	Uncharacterized protein	170	1	1	Female		Secondary metabolites biosynthesis	Q
389	H2VGA8	Uncharacterized protein	873	1	0		Male	Secondary metabolites biosynthesis	Q
423	T1FSL5	Uncharacterized protein	59	1	2		Male	Secondary metabolites biosynthesis	Q
64	A0A023F113	Putative mitochondrial associated endoribonuclease mar1 isochorismatase superfamily	23	3	22	Female	Male	General function prediction only	R
79	A0A023FIS0	Putative tpa exp: metallopeptidase	43	3	10	Female	Male	General function prediction only	R
117	A0A023FKW4	Putative conserved secreted protein	11	2	24	Female	Male	General function prediction only	R

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
122	A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase	48	5	12	Female	Male	General function prediction only	R
143	A0A023FMF5	Putative phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Fragment)	23	2	14	Female	Male	General function prediction only	R
237	A0A023FYN3	Putative carbonic anhydrase ixodes scapularis carbonic anhydrase	33	4	18	Female	Male	General function prediction only	R
288	A0A023GP85	Putative conserved secreted protein	45	1	2	Female		General function prediction only	R
388	G7YI90	Membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein 3	82	1	2	Female		General function prediction only	R
408	L7MIB5	Putative conserved plasma membrane protein (Fragment)	100	1	1	Female		General function prediction only	R
81	A0A023FIV8	Putative rap1a member of ras oncoprotein family	21	1	7		Male	General function prediction only	R
348	B7QIS7	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	31	1	2		Male	General function prediction only	R
351	B7QMY6	Arrestin domain-containing protein, putative	34	1	4		Male	General function prediction only	R
409	L7MIP6	Putative msx2-interacting protein (Fragment)	452	2	0		Male	General function prediction only	R
442	V5HVX4	Putative transporter add1 major facilitator superfamily (Fragment)	55	1	1		Male	General function prediction only	R
47	A0A023FH01	Uncharacterized protein	16	6	47	Female	Male	General function prediction only	R
419	R7TRJ8	Uncharacterized protein	64	1	4	Female		General function prediction only	R
512	G0NYP7	Putative uncharacterized protein	72	1	2	Female		General function prediction only	R
251	A0A023G846	Uncharacterized protein	22	1	6		Male	General function prediction only	R
303	A0A087ZT44	Uncharacterized protein	368	1	0		Male	General function prediction only	R
399	L7M4F3	Uncharacterized protein	28	1	5		Male	General function prediction only	R
33	A0A023FG79	Putative scp gapr-1 like: scp-like extracellular protein	23	9	55	Female	Male	Function unknown	S
207	A0A023FSH0	Putative differentiation-related protein	49	3	10	Female	Male	Function unknown	S
437	V5H7W4	Putative nucleoporin (Fragment)	227	1	1	Female		Function unknown	S
495	A8XKV9	Protein CBG14871	74	1	1	Female		Function unknown	S
431	T1L1E0	Uncharacterized protein	138	1	0	Female	Male	Function unknown	S
526	T1JTJ5	Uncharacterized protein	34	1	4	Female		Function unknown	S

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
535	U4UJC1	Uncharacterized protein	7	1	8		Male	Function unknown	S
20	A0A023FF67	Putative zinc-binding protein of the histidine triad hit family	14	2	17	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
69	A0A023FIA5	Putative g protein	36	3	11	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
127	A0A023FLK6	Putative neural cell adhesion molecule I1 (Fragment)	171	13	10	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
152	A0A023FN19	Putative determination of adult lifespan	35	1	4	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
212	A0A023FTF5	Putative regulatory protein mlp	11	4	53	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
256	A0A023GF33	Putative ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein	17	1	8	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
273	A0A023GIU7	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)	38	1	4	Female		Signal transduction mechanisms	T
298	A0A087UKS4	Tyrosine-protein phosphatase 10D (Fragment)	163	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
317	A1KXD5	G protein coupled receptor	104	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
484	A0A087UW97	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (Fragment)	112	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
507	E0VI60	Alpha-actinin-2-associated lim protein/alp, putative	181	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
516	J0XMM7	Speckle-type poz protein	42	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
22	A0A023FFH5	Putative calmodulin (Fragment)	17	1	7		Male	Signal transduction mechanisms	T
104	A0A023FK97	Putative cytoskeletal protein adducin	74	1	2		Male	Signal transduction mechanisms	T
287	A0A023GP74	Putative titin (Fragment)	389	1	0		Male	Signal transduction mechanisms	T
295	A0A087TAQ5	Titin (Fragment)	279	1	0		Male	Signal transduction mechanisms	T
324	A9QQ35	Troponin C	18	1	10		Male	Signal transduction mechanisms	T
371	F4WZW8	Protogenin	131	1	1		Male	Signal transduction mechanisms	T
393	L7LXD1	Putative phospholipid binding protein	186	1	0		Male	Signal transduction mechanisms	T
434	T1PN36	RIH domain protein (Fragment)	559	1	0		Male	Signal transduction mechanisms	T
297	A0A087UEG9	Uncharacterized protein (Fragment)	61	1	2	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
314	A0A0D6LGP1	Uncharacterized protein	61	1	2	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
429	T1L0G5	Uncharacterized protein	2.049	2	0	Female	Male	Signal transduction mechanisms	T
483	A0A087U3H9	Uncharacterized protein (Fragment)	7	1	14	Female		Signal transduction mechanisms	T
486	A0A090MNP8	Uncharacterized protein	181	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
498	B3RQE7	Putative uncharacterized protein	133	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
530	T1KFN2	Uncharacterized protein	75	1	1	Female		Signal transduction mechanisms	T
364	E9HED0	Putative uncharacterized protein	25	1	4		Male	Signal transduction mechanisms	T
402	L7M6N5	Uncharacterized protein	126	1	1		Male	Signal transduction mechanisms	T
420	R7U8K0	Uncharacterized protein	216	1	0		Male	Signal transduction mechanisms	T
3	A0A023FC75	Annexin (Fragment)	40	8	25	Female	Male	Intracellular trafficking	U
461	A0A023F2W0	Putative guanine nucleotide exchange factor efa6	109	1	1	Female		Intracellular trafficking	U
464	A0A023FF95	Putative nuclear transport factor-2	15	1	10	Female		Intracellular trafficking	U
65	A0A023FI28	Putative gtpase rab2 small g protein superfamily	23	2	14		Male	Intracellular trafficking	U
68	A0A023FI65	GTP-binding nuclear protein	25	1	5		Male	Intracellular trafficking	U
84	A0A023FJ28	Putative vesicle trafficking protein sly1 sec1 family (Fragment)	39	1	3		Male	Intracellular trafficking	U
336	B7P9Z2	AP-2 complex subunit alpha-1, putative	96	1	1		Male	Intracellular trafficking	U
395	L7LYT9	Putative mucin-17	418	1	0		Male	Intracellular trafficking	U
446	V5IF18	Putative golgin subfamily protein a member 5	80	1	2		Male	Intracellular trafficking	U
432	T1L260	Uncharacterized protein	102	1	1	Female		Intracellular trafficking	U
435	V4AQV5	Uncharacterized protein (Fragment)	13	1	9		Male	Intracellular trafficking	U
186	A0A023FQB4	Putative complement component 1 q subcomponent binding protein/mrna splicing factor sf2 subunit p32	29	1	4	Female	Male	Defense mechanisms	V
254	A0A023GE23	Putative tick serpins 9	44	3	9	Female		Defense mechanisms	V
45	A0A023FGW5	Galectin (Fragment)	29	2	7	Female		Extracellular structures	W

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
131	A0A023FLX0	Putative conserved membrane protein (Fragment)	52	6	19	Female	Male	Nuclear structure	Y
163	A0A023FNR2	Putative conserved membrane protein (Fragment)	64	6	12	Female	Male	Nuclear structure	Y
171	A0A023FPF8	Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	48	8	30	Female	Male	Nuclear structure	Y
120	A0A023FL42	Putative conserved membrane protein (Fragment)	37	5	23		Male	Nuclear structure	Y
41	A0A023FGF9	Profilin	14	3	31	Female	Male	Cytoskeleton	Z
60	A0A023FHM0	Calponin	21	6	42	Female	Male	Cytoskeleton	Z
66	A0A023FI34	Putative myosin alkali light chain protein	18	4	39	Female	Male	Cytoskeleton	Z
80	A0A023FIT8	Putative myosin regulatory light chain ixodes scapularis myosin regulatory light chain (Fragment)	20	1	14	Female	Male	Cytoskeleton	Z
102	A0A023FK66	Putative beta tubulin	50	14	41	Female	Male	Cytoskeleton	Z
114	A0A023FKT3	Putative tropomyosin tropomyosin	33	5	21	Female	Male	Cytoskeleton	Z
149	A0A023FMJ4	Putative myosin class ii heavy chain (Fragment)	195	26	19	Female	Male	Cytoskeleton	Z
176	A0A023FPQ2	Putative tpa exp: actin depolymerizing factor (Fragment)	21	5	33	Female	Male	Cytoskeleton	Z
265	A0A023GHG6	Putative tropomyosin tropomyosin	33	6	25	Female	Male	Cytoskeleton	Z
279	A0A023GKX1	Putative alpha tubulin (Fragment)	54	9	25	Female	Male	Cytoskeleton	Z
323	S5FY84	Actin 3	42	13	49	Female	Male	Cytoskeleton	Z
334	B7P5D8	Paramyosin, putative (EC 1.3.1.74)	100	10	16	Female	Male	Cytoskeleton	Z
381	G3MLM7	Putative uncharacterized protein	42	15	57	Female	Male	Cytoskeleton	Z
391	J7LVN2	Paramyosin	102	24	34	Female	Male	Cytoskeleton	Z
414	Q86RN8	Paramyosin	102	23	30	Female	Male	Cytoskeleton	Z
444	V5I001	Putative myosin class i heavy chain	255	9	5	Female	Male	Cytoskeleton	Z
300	A0A087UUE2	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1 (Fragment)	79	1	1	Female		Cytoskeleton	Z
345	B7PYE5	Centrosome-associated protein CEP250, putative (EC 1.3.1.74) (EC 3.1.3.48)	303	1	1	Female		Cytoskeleton	Z

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
404	L7M942	Putative beta-spectrin	279	4	2	Female		Cytoskeleton	Z
493	A7SMP8	Predicted protein (Fragment)	81	1	3	Female		Cytoskeleton	Z
15	A0A023FET8	Putative dynein light chain lc8-type 2b	10	2	20		Male	Cytoskeleton	Z
51	A0A023FH57	Putative calponin (Fragment)	24	2	11		Male	Cytoskeleton	Z
58	A0A023FHI7	Putative myosin regulatory light chain ef-hand protein superfamily (Fragment)	20	2	12		Male	Cytoskeleton	Z
103	A0A023FK91	Putative alpha tubulin (Fragment)	51	1	3		Male	Cytoskeleton	Z
257	A0A023GFW4	Putative ca2+-binding actin-bundling protein	103	1	1		Male	Cytoskeleton	Z
290	A0A034WYZ2	Actin-depolymerizing factor 1	17	3	22		Male	Cytoskeleton	Z
293	A0A087T9W3	Myosin heavy chain, non-muscle (Fragment)	210	1	1		Male	Cytoskeleton	Z
309	A0A0B1PJK0	Tropomyosin (Fragment)	34	1	5		Male	Cytoskeleton	Z
321	A7UMC0	Tropomyosin	33	1	4		Male	Cytoskeleton	Z
355	D4HTS7	Beta actin-like 1 protein	42	9	30		Male	Cytoskeleton	Z
358	E2B796	Myosin heavy chain, muscle	257	5	3		Male	Cytoskeleton	Z
363	Q58NQ6	Beta-actin (Fragment)	14	3	40		Male	Cytoskeleton	Z
456	B5SUT6	Actin (Fragment)	23	3	18		Male	Cytoskeleton	Z
457	D9YST8	Actin (Fragment)	24	6	47		Male	Cytoskeleton	Z
469	A0A023FMG5	Putative actin-binding cytoskeleton protein filamin (Fragment)	121	1	1		Male	Cytoskeleton	Z
332	B4ND90	Uncharacterized protein	135	1	1		Male	Cytoskeleton	Z
356	E0VB58	Putative uncharacterized protein	161	1	1		Male	Cytoskeleton	Z
455	X1XDN9	Uncharacterized protein	459	1	0		Male	Cytoskeleton	Z
1	A0A023FBW3	Putative secreted protein	13	2	19	Female	Male		No Hits
5	A0A023FD00	Putative glycine rich secreted protein (Fragment)	25	4	23	Female	Male		No Hits
6	A0A023FD26	Putative lipocalin-2 1	25	8	35	Female	Male		No Hits

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
7	A0A023FD38	Putative secreted protein	27	3	12	Female	Male		No Hits
8	A0A023FD56	Putative glycine-rich cell wall structural protein	36	11	34	Female	Male		No Hits
9	A0A023FDL5	Putative selenoprotein w 2a	9	1	22	Female	Male		No Hits
12	A0A023FDY8	Putative secreted protein	13	1	10	Female	Male		No Hits
17	A0A023FEZ3	Putative secreted protein (Fragment)	14	3	21	Female	Male		No Hits
19	A0A023FF66	Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	78	17	31	Female	Male		No Hits
37	A0A023FGC6	Putative secreted protein	31	2	7	Female	Male		No Hits
39	A0A023FGE2	Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	80	16	36	Female	Male		No Hits
54	A0A023FHA1	Putative intracellular cystatin	11	5	59	Female	Male		No Hits
82	A0A023FIW3	Putative transglutaminase/protease-like proteinues (Fragment)	37	1	4	Female	Male		No Hits
136	A0A023FM63	Putative glycine-rich cell wall structural protein	41	10	46	Female	Male		No Hits
164	A0A023FNW1	Putative cathepsin c (Fragment)	23	1	8	Female	Male		No Hits
170	A0A023FPD9	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 (Fragment)	33	2	7	Female	Male		No Hits
177	A0A023FPS8	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8 (Fragment)	56	5	17	Female	Male		No Hits
181	A0A023FQ63	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8	54	5	17	Female	Male		No Hits
182	A0A023FQ78	Putative glycine-rich secreted protein	18	4	33	Female	Male		No Hits
190	A0A023FQP1	Putative tick kunitz 88	22	2	11	Female	Male		No Hits
191	A0A023FQQ7	Putative tick til 11	11	1	9	Female	Male		No Hits
192	A0A023FQS0	Putative salivary gland-associated protein	20	1	4	Female	Male		No Hits
194	A0A023FQW8	Putative secreted protein	23	7	37	Female	Male		No Hits
195	A0A023FQZ3	Putative secreted protein	23	1	5	Female	Male		No Hits
196	A0A023FR11	Putative tpa exp: secreted protein	25	4	20	Female	Male		No Hits
197	A0A023FR61	Putative secreted protein	25	3	14	Female	Male		No Hits

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
198	A0A023FRF7	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	36	11	64	Female	Male		No Hits
208	A0A023FSW2	Putative cystatin	13	2	21	Female	Male		No Hits
213	A0A023FTZ8	Putative salivary gland-associated protein	20	1	6	Female	Male		No Hits
217	A0A023FUB8	Putative lipocalin-5 1	26	1	3	Female	Male		No Hits
218	A0A023FUE9	Putative salivary protein	25	1	6	Female	Male		No Hits
222	A0A023FUN5	Putative conserved membrane protein (Fragment)	36	6	34	Female	Male		No Hits
223	A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	37	13	75	Female	Male		No Hits
327	B0X127	Phd finger protein	8	1	11	Female	Male		No Hits
482	A0A087U2J3	Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon opus (Fragment)	171	1	1	Female	Male		No Hits
499	B7P2Z6	(Cytosine-5)-methyltransferase 1, putative	77	1	2	Female	Male		No Hits
503	B7PIG7	Polyprotein of retroviral origin, putative (EC 2.7.7.49) (Fragment)	17	1	5	Female	Male		No Hits
168	A0A023FP20	Putative endoplasmic reticulum protein 29 (Fragment)	32	2	9	Female			No Hits
215	A0A023FU51	Putative sulfotransferase ixodes scapularis sulfotransferase (Fragment)	24	1	7	Female			No Hits
304	A0A090LRQ2	Calycin-like domain and Calycin domain-containing protein (Uncharacterized protein)	42	1	2	Female			No Hits
340	B7PLC7	Cuticular protein, putative	20	1	9	Female			No Hits
463	A0A023FE39	Putative secreted protein (Fragment)	16	1	9	Female			No Hits
470	A0A023FS52	Putative secreted protein	24	1	5	Female			No Hits
473	A0A023G2W2	Putative cuticular protein	18	1	4	Female			No Hits
474	A0A023G5V0	Putative secreted protein	28	1	4	Female			No Hits
475	A0A023G6S8	Putative secreted protein	23	1	3	Female			No Hits
502	B7PG53	Secreted salivary gland peptide, putative (Fragment)	8	1	10	Female			No Hits
185	A0A023FQA7	Putative cuticle protein (Fragment)	17	1	8		Male		No Hits
188	A0A023FQI4	Putative secreted glycine-rich protein (Fragment)	19	1	7		Male		No Hits

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
189	A0A023FQL4	Putative secreted protein 94	22	2	11		Male		No Hits
220	A0A023FUI5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	36	5	21		Male		No Hits
232	A0A023FW93	Putative glycine-rich secreted cement protein	28	4	22		Male		No Hits
241	A0A023G034	Putative transglutaminase/protease-like proteinues	83	1	2		Male		No Hits
247	A0A023G6P9	Putative atpase inhibitory factor 1 (Fragment)	12	1	10		Male		No Hits
308	A0A0A9XG89	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13 (Fragment)	31	1	3		Male		No Hits
326	B0WIJ8	Phosphatase 1 regulatory subunit 12b	55	1	2		Male		No Hits
347	B7QGS6	CHH (PO-type) variant 1, putative	13	1	9		Male		No Hits
361	E5D584	ATAQ protein	57	1	1		Male		No Hits
394	L7LYQ9	Putative tick transposon	125	1	1		Male		No Hits
438	V5H9X8	Putative animal peptidoglycan recognition protein	27	1	4		Male		No Hits
487	A0A090XEK8	Putative myosin light chain kinase	40	1	2		Male		No Hits
520	L7X8L1	Alpha-latrotoxin (Fragment)	24	1	4		Male		No Hits
187	A0A023FQG5	Uncharacterized protein	37	11	60	Female	Male		No Hits
200	A0A023FRH9	Uncharacterized protein	41	9	48	Female	Male		No Hits
206	A0A023FS65	Uncharacterized protein (Fragment)	22	4	24	Female	Male		No Hits
430	T1L133	Uncharacterized protein	8	1	29	Female	Male		No Hits
477	A0A087T6F8	Uncharacterized protein (Fragment)	42	1	3	Female	Male		No Hits
528	T1K3R6	Uncharacterized protein	52	1	2	Female	Male		No Hits
532	T1L6E0	Uncharacterized protein	18	1	4	Female	Male		No Hits
4	A0A023FCF7	Uncharacterized protein (Fragment)	13	1	11	Female			No Hits
335	B7P5P4	Putative uncharacterized protein	68	1	2	Female			No Hits
365	E9HK21	Putative uncharacterized protein	21	1	4	Female			No Hits

Table 3 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Class	KOG Cluster (d)
459	A0A016TCR8	Uncharacterized protein	9	1	6	Female			No Hits
478	A0A087TNG4	Uncharacterized protein (Fragment)	36	1	3	Female			No Hits
480	A0A087TVE4	Uncharacterized protein (Fragment)	91	1	1	Female			No Hits
481	A0A087U1P9	Uncharacterized protein (Fragment)	183	1	1	Female			No Hits
494	A8DZ49	Uncharacterized protein	8	1	7	Female			No Hits
534	U1MEP1	Uncharacterized protein	18	1	3	Female			No Hits
541	X1X222	Uncharacterized protein	170	1	1	Female			No Hits
209	A0A023FSZ8	Uncharacterized protein	13	1	12		Male		No Hits
330	B3MZL3	Uncharacterized protein	131	1	1		Male		No Hits
372	F4X766	Putative uncharacterized protein	23	1	10		Male		No Hits
379	G3MI66	Putative uncharacterized protein (Fragment)	33	2	7		Male		No Hits
390	I1EDG0	Uncharacterized protein	48	1	3		Male		No Hits
406	L7MCX4	Uncharacterized protein (Fragment)	9	1	8		Male		No Hits
427	T1KRA3	Uncharacterized protein	132	1	1		Male		No Hits
450	W4WMB3	Uncharacterized protein	10	1	11		Male		No Hits
460	A0A016UGQ7	Uncharacterized protein	13	1	6		Male		No Hits
536	V5H4C9	Uncharacterized protein	47	1	2		Male		No Hits
540	X1WKX8	Uncharacterized protein	19	1	8		Male		No Hits

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "no hits", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG.

Anexo 2

Tabela 4: Proteínas identificadas em glândulas salivares de fêmeas de carrapatos *A. sculptum* não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 2).

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
349	B7QIT4	Pre-mRNA splicing factor Syf1, putative	100	1	1	RNA processing and modification	A
14	A0A023FEK0	Putative grp-3 498 glycine rich family	35	1	3	RNA processing and modification	A
21	A0A023FF79	Putative hoi-polloi	14	2	19	RNA processing and modification	A
110	A0A023FKM7	Putative polyc-binding hnmp-k protein hrb57a/hnmp	34	1	4	RNA processing and modification	A
99	A0A023FK48	Putative rna-binding protein elav/hu rrm superfamily	34	1	3	RNA processing and modification	A
34	A0A023FGA0	Putative small nuclear ribonucleoprotein sm d3	13	1	8	RNA processing and modification	A
415	Q16UL0	AAEL009878-PA	207	1	1	RNA processing and modification	A
376	G3MGG7	ATP synthase subunit alpha (Fragment)	62	6	15	Energy production and conversion	C
488	A0A0A1WJM9	Fatty aldehyde dehydrogenase	62	1	2	Energy production and conversion	C
277	A0A023GKS1	Putative aldehyde dehydrogenase	53	1	2	Energy production and conversion	C
398	L7M097	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase	54	7	19	Energy production and conversion	C
392	L7LWU5	Putative microtubule associated complex	28	1	5	Energy production and conversion	C
447	V5IFY7	Putative mitochondrial adp/atp carrier	36	1	2	Energy production and conversion	C
169	A0A023FP71	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit e	10	1	16	Energy production and conversion	C
30	A0A023FG16	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufa2/b8 subunit	11	1	11	Energy production and conversion	C
275	A0A023GKI9	Putative nadh-ubiquinone oxidoreductase ndufs3/30 kDa subunit	31	1	5	Energy production and conversion	C
115	A0A023FKT5	Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2 (Fragment)	37	3	12	Energy production and conversion	C
401	L7M642	Putative zinc-binding oxidoreductase	36	1	4	Energy production and conversion	C
134	A0A023FM54	Succinyl-CoA ligase subunit beta (EC 6.2.1.-)	41	1	3	Energy production and conversion	C

Table 4 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
178	A0A023FPW3	Uncharacterized protein (Fragment)	15	1	7	Energy production and conversion	C
346	B7Q1F6	GOT2 aspartate aminotransferase, putative (EC 2.6.1.1)	44	1	4	Amino acid transport and metabolism	E
96	A0A023FJZ1	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	55	4	9	Nucleotide transport and metabolism	F
271	A0A023GII4	Putative 5'-nucleotidase (Fragment)	36	1	3	Nucleotide transport and metabolism	F
242	A0A023G079	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase (Fragment)	69	1	2	Nucleotide transport and metabolism	F
139	A0A023FM85	Putative dihydroorotase (Fragment)	43	1	3	Nucleotide transport and metabolism	F
145	A0A023FMG7	Putative phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase	46	2	9	Nucleotide transport and metabolism	F
403	L7M8R8	Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	48	3	9	Coenzyme transport and metabolism	H
441	V5HV95	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (Fragment)	38	1	3	Lipid transport and metabolism	I
342	B7PQP7	Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.211) (Fragment)	80	1	1	Lipid transport and metabolism	I
97	A0A023FJZ4	Putative 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	34	1	4	Lipid transport and metabolism	I
126	A0A023FLH9	Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase (Fragment)	46	1	4	Lipid transport and metabolism	I
284	A0A023GN38	Putative lysosomal & prostatic acid phosphatase	43	2	5	Lipid transport and metabolism	I
292	A0A087SX23	Putative malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial (Fragment)	44	1	3	Lipid transport and metabolism	I
253	A0A023GDS5	Putative microtubule associated complex (Fragment)	117	1	1	Lipid transport and metabolism	I
281	A0A023GMC7	Putative vitellogenin-1 (Fragment)	123	5	5	Lipid transport and metabolism	I
238	A0A023FYX2	Putative vitellogenin-2	178	3	3	Lipid transport and metabolism	I
538	V5HMG5	Putative vitellogenin-b (Fragment)	256	1	0	Lipid transport and metabolism	I
44	A0A023FGV4	40S ribosomal protein S12	14	1	11	Translation	J
357	E1GEU2	40S ribosomal protein S16	16	1	8	Translation	J
354	C9W1L6	40S ribosomal protein S27	9	1	13	Translation	J
294	A0A087TAB2	Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment)	48	1	4	Translation	J

Table 4 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
130	A0A023FLU8	Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	39	1	4	Translation	J
465	A0A023FFM0	Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	17	1	6	Translation	J
38	A0A023FGE1	Putative ribosomal protein I31	15	1	7	Translation	J
25	A0A023FFK4	Putative ribosomal protein s18	18	1	8	Translation	J
500	B7P5Y5	tRNA (Adenine-N(1)-)-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6, putative (Fragment)	41	1	2	Translation	J
513	G3MIP1	Putative uncharacterized protein (Fragment)	51	1	2	Translation	J
476	A0A087SW11	Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 (Fragment)	56	1	1	Transcription	K
501	B7P8J7	Transcription factor, putative (Fragment)	46	1	2	Transcription	K
505	D6WDN7	Zinc finger protein 271-like Protein	51	1	2	Transcription	K
360	E3N179	Putative uncharacterized protein	44	1	2	Transcription	K
343	B7PTZ6	Pacman protein, putative	127	1	1	Replication, recombination and repair	L
527	T1JYW1	Uncharacterized protein	83	1	1	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	M
320	A7TZ83	1433 protein zetalike [Apis florea] (Tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein)	28	3	11	Posttranslational modification	O
299	A0A087URS9	Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	13	1	10	Posttranslational modification	O
167	A0A023FNY7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	28	1	6	Posttranslational modification	O
46	A0A023FGZ7	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	30	1	4	Posttranslational modification	O
509	E4W3Z1	Protein disulfide isomerase 3 (Fragment)	40	1	3	Posttranslational modification	O
180	A0A023FQ39	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	1	2	Posttranslational modification	O
184	A0A023FQA2	Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb2/pre1 (Fragment)	19	1	5	Posttranslational modification	O
252	A0A023GAP9	Putative alpha crystallins	23	2	10	Posttranslational modification	O
16	A0A023FEV4	Putative heat shock protein	11	2	24	Posttranslational modification	O
119	A0A023FL38	Putative prohibitin 2	33	2	6	Posttranslational modification	O

Table 4 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
201	A0A023FRK0	Putative salivary gland metalloprotease	58	3	6	Posttranslational modification	O
138	A0A023FM77	Putative serine carboxypeptidase lysosomal cathepsin a	54	1	2	Posttranslational modification	O
514	G3MMS7	Putative uncharacterized protein	18	1	4	Posttranslational modification	O
307	A0A0A7CAN8	Catalase	58	1	3	Inorganic ion transport and metabolism	P
451	W4XA87	Catalase (EC 1.11.1.6)	56	1	3	Inorganic ion transport and metabolism	P
151	A0A023FMU5	Putative pln02957 copper zinc superoxide dismutase (Fragment)	10	1	16	Inorganic ion transport and metabolism	P
353	C7SP07	Sodium/potassium ATPase alpha subunit (Fragment)	37	1	3	Inorganic ion transport and metabolism	P
452	W4Y783	Uncharacterized protein	323	1	0	Inorganic ion transport and metabolism	P
132	A0A023FLX5	Putative short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	27	3	15	Secondary metabolites biosynthesis	Q
425	T1K2M1	Uncharacterized protein	170	1	1	Secondary metabolites biosynthesis	Q
388	G7YI90	Membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein 3	82	1	2	General function prediction only	R
408	L7MIB5	Putative conserved plasma membrane protein (Fragment)	100	1	1	General function prediction only	R
288	A0A023GP85	Putative conserved secreted protein	45	1	2	General function prediction only	R
512	G0NYP7	Putative uncharacterized protein	72	1	2	General function prediction only	R
419	R7TRJ8	Uncharacterized protein	64	1	4	General function prediction only	R
495	A8XKV9	Protein CBG14871	74	1	1	Function unknown	S
437	V5H7W4	Putative nucleoporin (Fragment)	227	1	1	Function unknown	S
526	T1JTJ5	Uncharacterized protein	34	1	4	Function unknown	S
507	E0VI60	Alpha-actinin-2-associated lim protein/alp, putative	181	1	1	Signal transduction mechanisms	T
273	A0A023GIU7	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)	38	1	4	Signal transduction mechanisms	T
484	A0A087UW97	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (Fragment)	112	1	1	Signal transduction mechanisms	T
317	A1KXD5	G protein coupled receptor	104	1	1	Signal transduction mechanisms	T

Table 4 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
516	J0XMM7	Speckle-type poz protein	42	1	1	Signal transduction mechanisms	T
298	A0A087UKS4	Tyrosine-protein phosphatase 10D (Fragment)	163	1	1	Signal transduction mechanisms	T
498	B3RQE7	Putative uncharacterized protein	133	1	1	Signal transduction mechanisms	T
486	A0A090MNP8	Uncharacterized protein	181	1	1	Signal transduction mechanisms	T
530	T1KFN2	Uncharacterized protein	75	1	1	Signal transduction mechanisms	T
483	A0A087U3H9	Uncharacterized protein (Fragment)	7	1	14	Signal transduction mechanisms	T
461	A0A023F2W0	Putative guanine nucleotide exchange factor efa6	109	1	1	Intracellular trafficking	U
464	A0A023FF95	Putative nuclear transport factor-2	15	1	10	Intracellular trafficking	U
432	T1L260	Uncharacterized protein	102	1	1	Intracellular trafficking	U
254	A0A023GE23	Putative tick serpins 9	44	3	9	Defense mechanisms	V
45	A0A023FGW5	Galectin (Fragment)	29	2	7	Extracellular structures	W
345	B7PYE5	Centrosome-associated protein CEP250, putative (EC 1.3.1.74) (EC 3.1.3.48)	303	1	1	Cytoskeleton	Z
300	A0A087UUE2	E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1 (Fragment)	79	1	1	Cytoskeleton	Z
493	A7SMP8	Predicted protein (Fragment)	81	1	3	Cytoskeleton	Z
404	L7M942	Putative beta-spectrin	279	4	2	Cytoskeleton	Z
304	A0A090LRQ2	Calycin-like domain and Calycin domain-containing protein (Uncharacterized protein)	42	1	2		No Hits
340	B7PLC7	Cuticular protein, putative	20	1	9		No Hits
473	A0A023G2W2	Putative cuticular protein	18	1	4		No Hits
168	A0A023FP20	Putative endoplasmic reticulum protein 29 (Fragment)	32	2	9		No Hits
470	A0A023FS52	Putative secreted protein	24	1	5		No Hits
474	A0A023G5V0	Putative secreted protein	28	1	4		No Hits
475	A0A023G6S8	Putative secreted protein	23	1	3		No Hits
463	A0A023FE39	Putative secreted protein (Fragment)	16	1	9		No Hits

Table 4 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
215	A0A023FU51	Putative sulfotransferase ixodes scapularis sulfotransferase (Fragment)	24	1	7		No Hits
502	B7PG53	Secreted salivary gland peptide, putative (Fragment)	8	1	10		No Hits
335	B7P5P4	Putative uncharacterized protein	68	1	2		No Hits
365	E9HK21	Putative uncharacterized protein	21	1	4		No Hits
459	A0A016TCR8	Uncharacterized protein	9	1	6		No Hits
494	A8DZ49	Uncharacterized protein	8	1	7		No Hits
534	U1MEP1	Uncharacterized protein	18	1	3		No Hits
541	X1X222	Uncharacterized protein	170	1	1		No Hits
4	A0A023FCF7	Uncharacterized protein (Fragment)	13	1	11		No Hits
478	A0A087TNG4	Uncharacterized protein (Fragment)	36	1	3		No Hits
480	A0A087TVE4	Uncharacterized protein (Fragment)	91	1	1		No Hits
481	A0A087U1P9	Uncharacterized protein (Fragment)	183	1	1		No Hits

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "no hits", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG

Anexo 3

Tabela 5: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos de carrapatos *A. sculptum* não alimentados, caracterizados funcionalmente pelo KOG (Anexo 3).

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
28	A0A023FFY5	Putative small nuclear ribonucleoprotein f	9	1	14	RNA processing and modification	A
101	A0A023FK55	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 27c	34	1	3	RNA processing and modification	A
124	A0A023FLE7	Putative apoptosis-promoting rna-binding protein tia-1/tiar rrm superfamily (Fragment)	35	1	4	RNA processing and modification	A
291	A0A061QLH9	Putative hnRMP	31	1	3	RNA processing and modification	A
396	L7LZC8	Putative trna and rna cytosine-c5-methylase nucleolar protein nol1/nop2	79	1	1	RNA processing and modification	A
397	L7LZS2	Putative deah-box rna helicase	231	1	0	RNA processing and modification	A
405	L7MBD6	Putative tick transposon (Fragment)	131	1	1	RNA processing and modification	A
519	L7MD82	Putative tick transposon (Fragment)	121	1	1	RNA processing and modification	A
373	G0N5F0	Putative uncharacterized protein	264	1	1	RNA processing and modification	A
350	B7QLX5	Fetal alzheimer antigen, putative (EC 2.3.1.48)	267	1	0	Chromatin structure and dynamics	B
370	F1SZA1	Histone H2B-like	14	2	18	Chromatin structure and dynamics	B
412	L7MJL2	Putative zinc finger and btb domain-containing protein 17 (Fragment)	222	1	1	Chromatin structure and dynamics	B
53	A0A023FH84	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	32	1	4	Energy production and conversion	C
55	A0A023FHB9	Putative lipid particle	13	1	9	Energy production and conversion	C
133	A0A023FLY2	Putative prohibitins and stomatins of the pid superfamily	40	1	4	Energy production and conversion	C
150	A0A023FML0	Putative aldehyde dehydrogenase	53	1	2	Energy production and conversion	C
193	A0A023FQU2	Putative cytochrome c ixodes scapularis cytochrome c (Fragment)	14	2	19	Energy production and conversion	C
203	A0A023FRY9	Putative atp synthase subunit b	31	2	10	Energy production and conversion	C
234	A0A023FWF1	Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2	49	3	9	Energy production and conversion	C

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
236	A0A023FWN3	Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit	35	2	6	Energy production and conversion	C
276	A0A023GKQ8	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	52	3	8	Energy production and conversion	C
283	A0A023GMK2	Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (EC 1.2.4.1)	44	1	3	Energy production and conversion	C
322	A7XZJ2	Arginine kinase	40	1	3	Energy production and conversion	C
331	B3S5R6	Aldehyde dehydrogenase	59	1	2	Energy production and conversion	C
338	B7PFJ2	Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	46	1	3	Energy production and conversion	C
440	V5HQ19	Citrate synthase (Fragment)	59	3	6	Energy production and conversion	C
468	A0A023FKN0	Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (EC 1.10.2.2)	30	1	3	Energy production and conversion	C
301	A0A087UX43	Uncharacterized protein (Fragment)	79	1	2	Energy production and conversion	C
89	A0A023FJG7	Putative leucine-rich acidic nuclear protein	30	1	3	Cell cycle control	D
400	L7M506	Putative lamin	70	1	2	Cell cycle control	D
329	B3LXL3	Uncharacterized protein	128	1	1	Cell cycle control	D
94	A0A023FJS2	Putative glycine c-acetyltransferase/2-amino-3-ketobutyrate-coa ligase	45	1	3	Amino acid transport and metabolism	E
231	A0A023FW59	Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	46	1	3	Amino acid transport and metabolism	E
341	B7PM74	Secreted protein, putative (EC 2.4.1.228) (Fragment)	34	1	6	Carbohydrate transport and metabolism	G
375	G3MGB9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment)	45	2	4	Carbohydrate transport and metabolism	G
529	T1KF71	UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)	48	1	3	Carbohydrate transport and metabolism	G
428	T1KZ51	Uncharacterized protein	106	1	1	Carbohydrate transport and metabolism	G
453	W4YE44	Uncharacterized protein	43	1	3	Carbohydrate transport and metabolism	G
259	A0A023GGX5	Putative s-adenosylcysteine hydrolase (Fragment)	28	3	13	Coenzyme transport and metabolism	H
2	A0A023FC72	Putative enoyl-coa isomerase (Fragment)	32	1	3	Lipid transport and metabolism	I

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
121	A0A023FL46	Putative short-chain acyl-coa dehydrogenase	45	1	3	Lipid transport and metabolism	I
129	A0A023FLT6	Putative vitellogenin-2	79	3	5	Lipid transport and metabolism	I
268	A0A023GI46	Putative enoyl-coa hydratase	33	1	3	Lipid transport and metabolism	I
286	A0A023GP33	Putative animal-type fatty acid synthase (Fragment)	86	1	1	Lipid transport and metabolism	I
344	B7PWX1	Phospholipase A-2-activating protein, putative (EC 2.7.11.7) (Fragment)	87	1	1	Lipid transport and metabolism	I
83	A0A023FIY8	Putative 60s ribosomal protein I9	22	2	13	Translation	J
93	A0A023FJQ1	Putative translation elongation factor ef-1 gamma	49	1	2	Translation	J
95	A0A023FJS7	Putative atp-dependent rna helicase	48	2	6	Translation	J
296	A0A087U9V3	Isoleucine--trna ligase, cytoplasmic (Fragment)	127	1	1	Translation	J
362	E5T132	Putative ubiquitin family protein	12	4	39	Translation	J
367	F0JA20	Truncated 40S ribosomal protein S7 (Fragment)	22	1	6	Translation	J
418	Q6WCQ5	Ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	85	1	1	Translation	J
333	B7P1V6	Putative uncharacterized protein	178	1	0	Translation	J
315	A0A0D8Y9K3	RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dimerization domain protein	52	1	2	Transcription	K
339	B7PJK2	Tho2 protein, putative	148	1	1	Transcription	K
411	L7MJB2	Putative tef-1 (Fragment)	55	1	2	Transcription	K
306	A0A090XE53	Putative single-stranded dna-binding protein (Fragment)	11	1	10	Replication	L
454	W6UZK1	Exonuclease	86	1	1	Replication, recombination and repair	L
246	A0A023G500	Putative nidogen (Fragment)	124	1	1	Cell wall/membrane/envelope biogenesis	M
18	A0A023FF42	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	13	1	8	Posttranslational modification	O
48	A0A023FH05	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase	25	2	10	Posttranslational modification	O
78	A0A023FIR2	Putative alpha crystallins	20	5	27	Posttranslational modification	O

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
116	A0A023FKU2	Putative stress-induced-phosphoprotein 1 (Fragment)	39	2	7	Posttranslational modification	O
128	A0A023FLR7	Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment)	65	7	15	Posttranslational modification	O
142	A0A023FMF0	Putative small heat shock protein ii	20	1	6	Posttranslational modification	O
159	A0A023FNE4	Putative atpase of the aaa+ class posttranslational modification (Fragment)	92	4	6	Posttranslational modification	O
166	A0A023FNY4	Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1) (Fragment)	28	1	5	Posttranslational modification	O
228	A0A023FV42	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (EC 3.4.19.12)	26	1	6	Posttranslational modification	O
239	A0A023FZW2	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	1	2	Posttranslational modification	O
278	A0A023GKU4	Putative processing peptidase beta subunit ixodes scapularis processing peptidase beta subunit	54	1	2	Posttranslational modification	O
319	A6NA14	Truncated peroxiredoxin (Fragment)	21	1	12	Posttranslational modification	O
337	B7PEV0	Chaperonin subunit, putative	60	3	8	Posttranslational modification	O
352	C5J3T0	Hsp90	83	2	3	Posttranslational modification	O
407	L7MG42	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	28	3	14	Posttranslational modification	O
410	L7MJ61	Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	173	2	2	Posttranslational modification	O
421	S5FWR8	Heat shock protein 60	62	3	8	Posttranslational modification	O
433	T1PFK1	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	30	1	4	Posttranslational modification	O
436	V5H3Z4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase)	69	1	2	Posttranslational modification	O
449	W2TLS2	ATPase, AAA family	47	1	3	Posttranslational modification	O
462	A0A023FDS5	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)	11	1	13	Posttranslational modification	O
214	A0A023FU35	Uncharacterized protein	23	1	6	Posttranslational modification	O
380	G3MK62	Putative uncharacterized protein	56	1	2	Posttranslational modification	O
382	G3MLW3	Putative uncharacterized protein	35	1	5	Posttranslational modification	O
43	A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	16	3	27	Inorganic ion transport and metabolism	P

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
263	A0A023GHE3	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	35	1	3	Inorganic ion transport and metabolism	P
448	W2TKS5	Calcium-activated BK potassium channel alpha subunit	108	1	1	Inorganic ion transport and metabolism	P
389	H2VGA8	Uncharacterized protein	873	1	0	Secondary metabolites biosynthesis	Q
423	T1FSL5	Uncharacterized protein	59	1	2	Secondary metabolites biosynthesis	Q
81	A0A023FIV8	Putative rap1a member of ras oncoprotein family	21	1	7	General function prediction only	R
348	B7QIS7	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	31	1	2	General function prediction only	R
351	B7QMY6	Arrestin domain-containing protein, putative	34	1	4	General function prediction only	R
409	L7MIP6	Putative msx2-interacting protein (Fragment)	452	2	0	General function prediction only	R
442	V5HVX4	Putative transporter add1 major facilitator superfamily (Fragment)	55	1	1	General function prediction only	R
251	A0A023G846	Uncharacterized protein	22	1	6	General function prediction only	R
303	A0A087ZT44	Uncharacterized protein	368	1	0	General function prediction only	R
399	L7M4F3	Uncharacterized protein	28	1	5	General function prediction only	R
535	U4UJC1	Uncharacterized protein	7	1	8	Function unknown	S
22	A0A023FFH5	Putative calmodulin (Fragment)	17	1	7	Signal transduction mechanisms	T
104	A0A023FK97	Putative cytoskeletal protein adducin	74	1	2	Signal transduction mechanisms	T
287	A0A023GP74	Putative titin (Fragment)	389	1	0	Signal transduction mechanisms	T
295	A0A087TAQ5	Titin (Fragment)	279	1	0	Signal transduction mechanisms	T
324	A9QQ35	Troponin C	18	1	10	Signal transduction mechanisms	T
371	F4WZW8	Protogenin	131	1	1	Signal transduction mechanisms	T
393	L7LXD1	Putative phospholipid binding protein	186	1	0	Signal transduction mechanisms	T
434	T1PN36	RIH domain protein (Fragment)	559	1	0	Signal transduction mechanisms	T
364	E9HED0	Putative uncharacterized protein	25	1	4	Signal transduction mechanisms	T

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
402	L7M6N5	Uncharacterized protein	126	1	1	Signal transduction mechanisms	T
420	R7U8K0	Uncharacterized protein	216	1	0	Signal transduction mechanisms	T
65	A0A023FI28	Putative gtpase rab2 small g protein superfamily	23	2	14	Intracellular trafficking	U
68	A0A023FI65	GTP-binding nuclear protein	25	1	5	Intracellular trafficking	U
84	A0A023FJ28	Putative vesicle trafficking protein sly1 sec1 family (Fragment)	39	1	3	Intracellular trafficking	U
336	B7P9Z2	AP-2 complex subunit alpha-1, putative	96	1	1	Intracellular trafficking	U
395	L7LYT9	Putative mucin-17	418	1	0	Intracellular trafficking	U
446	V5IF18	Putative golgin subfamily protein a member 5	80	1	2	Intracellular trafficking	U
435	V4AQV5	Uncharacterized protein (Fragment)	13	1	9	Intracellular trafficking	U
120	A0A023FL42	Putative conserved membrane protein (Fragment)	37	5	23	Nuclear structure	Y
15	A0A023FET8	Putative dynein light chain lc8-type 2b	10	2	20	Cytoskeleton	Z
51	A0A023FH57	Putative calponin (Fragment)	24	2	11	Cytoskeleton	Z
58	A0A023FHI7	Putative myosin regulatory light chain ef-hand protein superfamily (Fragment)	20	2	12	Cytoskeleton	Z
103	A0A023FK91	Putative alpha tubulin (Fragment)	51	1	3	Cytoskeleton	Z
257	A0A023GFW4	Putative ca2+-binding actin-bundling protein	103	1	1	Cytoskeleton	Z
290	A0A034WYZ2	Actin-depolymerizing factor 1	17	3	22	Cytoskeleton	Z
293	A0A087T9W3	Myosin heavy chain, non-muscle (Fragment)	210	1	1	Cytoskeleton	Z
309	A0A0B1PJK0	Tropomyosin (Fragment)	34	1	5	Cytoskeleton	Z
321	A7UMC0	Tropomyosin	33	1	4	Cytoskeleton	Z
355	D4HTS7	Beta actin-like 1 protein	42	9	30	Cytoskeleton	Z
356	E0VB58	Putative uncharacterized protein	161	1	1	Cytoskeleton	Z
358	E2B796	Myosin heavy chain, muscle	257	5	3	Cytoskeleton	Z
363	Q58NQ6	Beta-actin (Fragment)	14	3	40	Cytoskeleton	Z

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
456	B5SUT6	Actin (Fragment)	23	3	18	Cytoskeleton	Z
457	D9YST8	Actin (Fragment)	24	6	47	Cytoskeleton	Z
469	A0A023FMG5	Putative actin-binding cytoskeleton protein filamin (Fragment)	121	1	1	Cytoskeleton	Z
332	B4ND90	Uncharacterized protein	135	1	1	Cytoskeleton	Z
455	X1XDN9	Uncharacterized protein	459	1	0	Cytoskeleton	Z
185	A0A023FQA7	Putative cuticle protein (Fragment)	17	1	8		No Hits
188	A0A023FQI4	Putative secreted glycine-rich protein (Fragment)	19	1	7		No Hits
189	A0A023FQL4	Putative secreted protein 94	22	2	11		No Hits
220	A0A023FUI5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	36	5	21		No Hits
232	A0A023FW93	Putative glycine-rich secreted cement protein	28	4	22		No Hits
241	A0A023G034	Putative transglutaminase/protease-like proteinues	83	1	2		No Hits
247	A0A023G6P9	Putative atpase inhibitory factor 1 (Fragment)	12	1	10		No Hits
308	A0A0A9XG89	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13 (Fragment)	31	1	3		No Hits
326	B0WIJ8	Phosphatase 1 regulatory subunit 12b	55	1	2		No Hits
347	B7QGS6	CHH (PO-type) variant 1, putative	13	1	9		No Hits
361	E5D584	ATAQ protein	57	1	1		No Hits
394	L7LYQ9	Putative tick transposon	125	1	1		No Hits
438	V5H9X8	Putative animal peptidoglycan recognition protein	27	1	4		No Hits
487	A0A090XEK8	Putative myosin light chain kinase	40	1	2		No Hits
520	L7X8L1	Alpha-latrotoxin (Fragment)	24	1	4		No Hits
209	A0A023FSZ8	Uncharacterized protein	13	1	12		No Hits
330	B3MZL3	Uncharacterized protein	131	1	1		No Hits
372	F4X766	Putative uncharacterized protein	23	1	10		No Hits

Table 5 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Peptide Number	Coverage (%)	KOG Class	KOG Cluster (d)
379	G3MI66	Putative uncharacterized protein (Fragment)	33	2	7		No Hits
390	I1EDG0	Uncharacterized protein	48	1	3		No Hits
406	L7MCX4	Uncharacterized protein (Fragment)	9	1	8		No Hits
427	T1KRA3	Uncharacterized protein	132	1	1		No Hits
450	W4WMB3	Uncharacterized protein	10	1	11		No Hits
460	A0A016UGQ7	Uncharacterized protein	13	1	6		No Hits
536	V5H4C9	Uncharacterized protein	47	1	2		No Hits
540	X1WKX8	Uncharacterized protein	19	1	8		No Hits

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "no hits", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG

Anexo 4

Tabela 6: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos *A. sculptum* preditas como de membrana (Anexo 4).

Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)	TMHMM PredHelice (e)	N-Glyc	O-Glyc
77	A0A023FIQ0	Putative mitochondrial adp/atp carrier	35	Female	Male	C	2,00		
447	V5IFY7	Putative mitochondrial adp/atp carrier	36	Female		C	3,00		Yes
488	A0A0A1WJM9	Fatty aldehyde dehydrogenase	62	Female		C	1,00		Yes
55	A0A023FHB9	Putative lipid particle	13		Male	C	1,00		
440	V5HQ19	Citrate synthase (Fragment)	59		Male	C	1,00		Yes
153	A0A023FN20	Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	49	Female	Male	G	1,00		Yes
479	A0A087TRD9	Solute carrier family 45 member 4 (Fragment)	26	Female	Male	G	1,00	Yes	Yes
453	W4YE44	Uncharacterized protein	43		Male	G	8,00		
315	A0A0D8Y9K3	RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dimerization domain protein	52		Male	K	1,00		Yes
527	T1JYW1	Uncharacterized protein	83	Female		M	7,00		Yes
410	L7MJ61	Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	173		Male	O	1,00		Yes
32	A0A023FG62	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	35	Female	Male	P	1,00		
144	A0A023FMF6	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (EC 3.6.3.-)	115	Female	Male	P	8,00		
263	A0A023GHE3	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	35		Male	P	1,00		
452	W4Y783	Uncharacterized protein	323	Female		P	7,00		
425	T1K2M1	Uncharacterized protein	170	Female		Q	14,00		Yes
408	L7MIB5	Putative conserved plasma membrane protein (Fragment)	100	Female		R	3,00		Yes
442	V5HVX4	Putative transporter add1 major facilitator superfamily (Fragment)	55		Male	R	10,00		
419	R7TRJ8	Uncharacterized protein	64	Female		R	9,00		
512	G0NYP7	Putative uncharacterized protein	72	Female		R	1,00		Yes
298	A0A087UKS4	Tyrosine-protein phosphatase 10D (Fragment)	163	Female		T	1,00		Yes

Table 6 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)	TMHMM PredHelices (e)	N-Glyc	O-Glyc
317	A1KXD5	G protein coupled receptor	104	Female		T	6,00		Yes
484	A0A087UW97	Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (Fragment)	112	Female		T	1,00		Yes
371	F4WZW8	Protogenin	131		Male	T	1,00	Yes	Yes
434	T1PN36	RIH domain protein (Fragment)	559		Male	T	6,00		
498	B3RQE7	Putative uncharacterized protein	133	Female		T	1,00		Yes
420	R7U8K0	Uncharacterized protein	216		Male	T	1,00	Yes	Yes
446	V5IF18	Putative golgin subfamily protein a member 5	80		Male	U	1,00		Yes
131	A0A023FLX0	Putative conserved membrane protein (Fragment)	52	Female	Male	Y	6,00		Yes
163	A0A023FNR2	Putative conserved membrane protein (Fragment)	64	Female	Male	Y	8,00		Yes
120	A0A023FL42	Putative conserved membrane protein (Fragment)	37		Male	Y	5,00		
356	E0VB58	Putative uncharacterized protein	161		Male	Z	1,00		Yes
222	A0A023FUN5	Putative conserved membrane protein (Fragment)	36	Female	Male	No hit	4,00		Yes
430	T1L133	Uncharacterized protein	8	Female	Male	No hit	2,00		
528	T1K3R6	Uncharacterized protein	52	Female	Male	No hit	7,00		
365	E9HK21	Putative uncharacterized protein	21	Female		No hit	2,00		Yes
534	U1MEP1	Uncharacterized protein	18	Female		No hit	1,00		

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "No hit", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG.

(e) Number of predicted transmembrane helices.

Anexo 5

Tabela 7: Proteínas identificadas em glândulas salivares detectadas apenas em machos e fêmeas de carrapatos *A. sculptum* não alimentados, classificadas como secretadas putativas por via clássica ou não clássica. Nas colunas N-Glyc e O-Glyc trata-se da presença predita de sítios de glicosilação nas proteínas (Anexo 5).

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
174	A0A023FPJ7	Putative small ribonucleoprotein particle protein smg (Fragment)	8	Female	Male	A	Yes	S	Yes		
272	A0A023GIP7	Putative grp-3 498 glycine rich family	24	Female	Male	A			Yes		
14	A0A023FEK0	Putative grp-3 498 glycine rich family	35	Female		A			Yes		Yes
21	A0A023FF79	Putative hoi-polloi	14	Female		A			Yes		Yes
56	A0A023FHH5	Histone H2A	13	Female	Male	B			Yes		Yes
210	A0A023FT54	Histone H4 (Fragment)	12	Female	Male	B			Yes		Yes
368	F0JA43	Histone H3	15	Female	Male	B			Yes		Yes
524	R7T426	Histone H4	25	Female	Male	B			Yes		Yes
13	A0A023FEB2	Citrate synthase	52	Female	Male	C			Yes		Yes
36	A0A023FGC0	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit g/atp20	11	Female	Male	C			Yes		
74	A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	32	Female	Male	C			Yes		Yes
87	A0A023FJA0	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufv2/24 kd subunit	28	Female	Male	C			Yes		Yes
105	A0A023FKC0	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	35	Female	Male	C			Yes		Yes
135	A0A023FM60	Putative glycolate oxidase	44	Female	Male	C	Yes	S	Yes	Yes	Yes
141	A0A023FM91	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	58	Female	Male	C			Yes	Yes	Yes
165	A0A023FNX0	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufs8/23 kDa subunit	23	Female	Male	C			Yes		Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
202	A0A023FRK5	Putative atp synthase h+ transporting mitochondrial f1 complex delta subunit (Fragment)	19	Female	Male	C			Yes		
221	A0A023FUK2	Putative glycolate oxidase (Fragment)	32	Female	Male	C	Yes	S	Yes	Yes	Yes
249	A0A023G7L4	Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	42	Female	Male	C			Yes		Yes
266	A0A023GHQ7	Putative nadh dehydrogenase	14	Female	Male	C			Yes		Yes
328	B2D2D5	Cytochrome c oxidase subunit Va (Fragment)	17	Female	Male	C			Yes		
30	A0A023FG16	Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufa2/b8 subunit	11	Female		C			Yes		
169	A0A023FP71	Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit e	10	Female		C			Yes		Yes
275	A0A023GKI9	Putative nadh-ubiquinone oxidoreductase ndufs3/30 kDa subunit	31	Female		C			Yes		Yes
53	A0A023FH84	Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	32		Male	C			Yes		Yes
133	A0A023FLY2	Putative prohibitins and stomatins of the pid superfamily	40		Male	C			Yes		Yes
203	A0A023FRY9	Putative atp synthase subunit b	31		Male	C			Yes		Yes
276	A0A023GKQ8	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	52		Male	C			Yes		
331	B3S5R6	Aldehyde dehydrogenase	59		Male	C			Yes		Yes
383	G3MPB4	Putative uncharacterized protein	61	Female	Male	C	Yes	S		Yes	Yes
178	A0A023FPW3	Uncharacterized protein (Fragment)	15	Female		C			Yes		Yes
94	A0A023FJS2	Putative glycine c-acetyltransferase/2-amino-3-ketobutyrate-coa ligase	45		Male	E			Yes		Yes
139	A0A023FM85	Putative dihydroorotase (Fragment)	43	Female		F			Yes		Yes
86	A0A023FJ79	Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	27	Female	Male	G			Yes		
227	A0A023FUW9	Putative alpha-d-galactosidase melibiase	60	Female	Male	G	Yes	S		Yes	Yes
375	G3MGB9	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment)	45		Male	G			Yes		Yes
428	T1KZ51	Uncharacterized protein	106		Male	G	Yes	S		Yes	Yes
73	A0A023FIF5	Putative enoyl-coa hydratase	31	Female	Male	I			Yes		Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
123	A0A023FLB7	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase)	44	Female	Male	I			Yes		Yes
147	A0A023FMI5	Putative vitellogenin-2 (Fragment)	95	Female	Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
205	A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment)	177	Female	Male	I	Yes	S		Yes	Yes
226	A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2	177	Female	Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
316	A0MVX0	Heme lipoprotein	177	Female	Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
416	Q19V51	Hemelipoglycoprotein	178	Female	Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
97	A0A023FJZ4	Putative 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	34	Female		I			Yes		Yes
238	A0A023FYX2	Putative vitellogenin-2	178	Female		I	Yes	S		Yes	Yes
253	A0A023GDS5	Putative microtubule associated complex (Fragment)	117	Female		I	Yes	S		Yes	Yes
284	A0A023GN38	Putative lysosomal & prostatic acid phosphatase	43	Female		I	Yes		Yes	Yes	Yes
292	A0A087SX23	Putative malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial (Fragment)	44	Female		I			Yes		Yes
441	V5HV95	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (Fragment)	38	Female		I			Yes		Yes
2	A0A023FC72	Putative enoyl-coa isomerase (Fragment)	32		Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
121	A0A023FL46	Putative short-chain acyl-coa dehydrogenase	45		Male	I			Yes		Yes
129	A0A023FLT6	Putative vitellogenin-2	79		Male	I	Yes	S	Yes	Yes	Yes
268	A0A023GI46	Putative enoyl-coa hydratase	33		Male	I			Yes		Yes
385	G3MR88	Putative uncharacterized protein	46	Female	Male	I			Yes		Yes
26	A0A023FFU4	Putative 40s ribosomal protein s2	18	Female	Male	J			Yes		Yes
49	A0A023FH17	Putative 40s ribosomal protein s16	17	Female	Male	J			Yes		
52	A0A023FH77	40S ribosomal protein S21	9	Female	Male	J			Yes		Yes
289	A0A034WU61	40S ribosomal protein S28 (Fragment)	12	Female	Male	J			Yes		Yes
44	A0A023FGV4	40S ribosomal protein S12	14	Female		J			Yes		Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
354	C9W1L6	40S ribosomal protein S27	9	Female		J			Yes		Yes
357	E1GEU2	40S ribosomal protein S16	16	Female		J			Yes		Yes
362	E5T132	Putative ubiquitin family protein	12		Male	J			Yes		Yes
367	F0JA20	Truncated 40S ribosomal protein S7 (Fragment)	22		Male	J			Yes		Yes
377	G3MHT8	Putative uncharacterized protein (Fragment)	24	Female	Male	J			Yes		Yes
384	G3MR86	Putative uncharacterized protein	22	Female	Male	J			Yes		Yes
501	B7P8J7	Transcription factor, putative (Fragment)	46	Female		K			Yes		Yes
426	T1KLC0	Uncharacterized protein	35	Female	Male	K			Yes		Yes
306	A0A090XE53	Putative single-stranded dna-binding protein (Fragment)	11		Male	L			Yes		Yes
246	A0A023G500	Putative nidogen (Fragment)	124		Male	M			Yes		Yes
10	A0A023FDS6	Thioredoxin	12	Female	Male	O			Yes		
27	A0A023FFW7	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant	26	Female	Male	O			Yes		Yes
35	A0A023FGB2	Putative alpha crystallins (Fragment)	21	Female	Male	O			Yes		
59	A0A023FHI8	Putative alpha crystallins	20	Female	Male	O			Yes		Yes
140	A0A023FM86	Putative tick metalloprotease 1 (Fragment)	58	Female	Male	O	Yes	S		Yes	Yes
161	A0A023FNG9	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	Female	Male	O	Yes	S			Yes
175	A0A023FPL0	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	55	Female	Male	O	Yes	S			
219	A0A023FUI3	Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	29	Female	Male	O	Yes		Yes		Yes
224	A0A023FUS3	Putative serine carboxypeptidase cpvl	57	Female	Male	O	Yes	S		Yes	Yes
225	A0A023FUS8	Putative tick metalloprotease 1	58	Female	Male	O	Yes	S		Yes	Yes
243	A0A023G2B2	Putative tick metalloprotease 1	58	Female	Male	O	Yes	S		Yes	Yes
245	A0A023G4V0	Putative heat shock protein	21	Female	Male	O			Yes		

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
119	A0A023FL38	Putative prohibitin 2	33	Female		O			Yes		Yes
138	A0A023FM77	Putative serine carboxypeptidase lysosomal cathepsin a	54	Female		O	Yes	S	Yes	Yes	Yes
167	A0A023FNY7	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	28	Female		O			Yes		
180	A0A023FQ39	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57	Female		O	Yes	S			Yes
201	A0A023FRK0	Putative salivary gland metalloprotease	58	Female		O	Yes	S	Yes	Yes	
252	A0A023GAP9	Putative alpha crystallins	23	Female		O			Yes		
18	A0A023FF42	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	13		Male	O			Yes		
48	A0A023FH05	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase	25		Male	O			Yes		
78	A0A023FIR2	Putative alpha crystallins	20		Male	O			Yes		
128	A0A023FLR7	Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment)	65		Male	O	Yes	S			Yes
142	A0A023FMF0	Putative small heat shock protein ii	20		Male	O			Yes		
228	A0A023FV42	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (EC 3.4.19.12)	26		Male	O			Yes		
239	A0A023FZW2	Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	57		Male	O	Yes	S			
433	T1PFK1	Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	30		Male	O			Yes		Yes
436	V5H3Z4	Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase)	69		Male	O			Yes		
449	W2TLS2	ATPase, AAA family	47		Male	O			Yes		Yes
374	G3MF27	Putative uncharacterized protein	73	Female	Male	O	Yes	S			Yes
514	G3MMS7	Putative uncharacterized protein	18	Female		O			Yes		Yes
214	A0A023FU35	Uncharacterized protein	23		Male	O	Yes	S	Yes	Yes	Yes
382	G3MLW3	Putative uncharacterized protein	35		Male	O			Yes		Yes
67	A0A023FI64	Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	24	Female	Male	P			Yes		
151	A0A023FMU5	Putative pln02957 copper zinc superoxide dismutase (Fragment)	10	Female		P			Yes		

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
132	A0A023FLX5	Putative short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	27	Female		Q			Yes		Yes
143	A0A023FMF5	Putative phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Fragment)	23	Female	Male	R			Yes		Yes
288	A0A023GP85	Putative conserved secreted protein	45	Female		R			Yes		Yes
348	B7QIS7	S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	31		Male	R			Yes		Yes
251	A0A023G846	Uncharacterized protein	22		Male	R			Yes		Yes
33	A0A023FG79	Putative scp gapr-1 like: scp-like extracellular protein	23	Female	Male	S	Yes	S	Yes		
207	A0A023FSH0	Putative differentiation-related protein	49	Female	Male	S			Yes		Yes
535	U4UJC1	Uncharacterized protein	7		Male	S			Yes		Yes
152	A0A023FN19	Putative determination of adult lifespan	35	Female	Male	T	Yes	S	Yes		Yes
212	A0A023FTF5	Putative regulatory protein mlp	11	Female	Male	T			Yes		
273	A0A023GIU7	Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)	38	Female		T			Yes		Yes
297	A0A087UEG9	Uncharacterized protein (Fragment)	61	Female	Male	T	Yes	S	Yes	Yes	Yes
314	A0A0D6LGP1	Uncharacterized protein	61	Female	Male	T			Yes		Yes
483	A0A087U3H9	Uncharacterized protein (Fragment)	7	Female		T			Yes		Yes
22	A0A023FFH5	Putative calmodulin (Fragment)	17		Male	T			Yes		
3	A0A023FC75	Annexin (Fragment)	40	Female	Male	U	Yes		Yes		Yes
186	A0A023FQB4	Putative complement component 1 q subcomponent binding protein/mrna splicing factor sf2 subunit p32	29	Female	Male	V			Yes		Yes
254	A0A023GE23	Putative tick serpins 9	44	Female		V			Yes	Yes	Yes
41	A0A023FGF9	Profilin	14	Female	Male	Z			Yes		
60	A0A023FHM0	Calponin	21	Female	Male	Z			Yes		
80	A0A023FIT8	Putative myosin regulatory light chain ixodes scapularis myosin regulatory light chain (Fragment)	20	Female	Male	Z			Yes		Yes
493	A7SMP8	Predicted protein (Fragment)	81	Female		Z			Yes		Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
58	A0A023FHI7	Putative myosin regulatory light chain ef-hand protein superfamily (Fragment)	20		Male	Z			Yes		Yes
1	A0A023FBW3	Putative secreted protein	13	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		
5	A0A023FD00	Putative glycine rich secreted protein (Fragment)	25	Female	Male	No Hit	Yes	S			
6	A0A023FD26	Putative lipocalin-2 1	25	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
7	A0A023FD38	Putative secreted protein	27	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
8	A0A023FD56	Putative glycine-rich cell wall structural protein	36	Female	Male	No Hit	Yes	S			Yes
9	A0A023FDL5	Putative selenoprotein w 2a	9	Female	Male	No Hit			Yes		Yes
12	A0A023FDY8	Putative secreted protein	13	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	
17	A0A023FEZ3	Putative secreted protein (Fragment)	14	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		
37	A0A023FGC6	Putative secreted protein	31	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
82	A0A023FIW3	Putative transglutaminase/protease-like proteinues (Fragment)	37	Female	Male	No Hit			Yes		Yes
136	A0A023FM63	Putative glycine-rich cell wall structural protein	41	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		Yes
164	A0A023FNW1	Putative cathepsin c (Fragment)	23	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	
177	A0A023FPS8	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8 (Fragment)	56	Female	Male	No Hit	Yes	S			Yes
181	A0A023FQ63	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8	54	Female	Male	No Hit	Yes	S			
182	A0A023FQ78	Putative glycine-rich secreted protein	18	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		
190	A0A023FQP1	Putative tick kunitz 88	22	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		Yes
191	A0A023FQQ7	Putative tick til 11	11	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
194	A0A023FQW8	Putative secreted protein	23	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	
195	A0A023FQZ3	Putative secreted protein	23	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
196	A0A023FR11	Putative tpa exp: secreted protein	25	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
197	A0A023FR61	Putative secreted protein	25	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
198	A0A023FRF7	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	36	Female	Male	No Hit	Yes	S			Yes
208	A0A023FSW2	Putative cystatin	13	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		Yes
217	A0A023FUB8	Putative lipocalin-5 1	26	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
218	A0A023FUE9	Putative salivary protein	25	Female	Male	No Hit	Yes	S			Yes
223	A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	37	Female	Male	No Hit	Yes	S			Yes
168	A0A023FP20	Putative endoplasmic reticulum protein 29 (Fragment)	32	Female		No Hit			Yes		Yes
215	A0A023FU51	Putative sulfotransferase ixodes scapularis sulfotransferase (Fragment)	24	Female		No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
304	A0A090LRQ2	Calycin-like domain and Calycin domain-containing protein (Uncharacterized protein)	42	Female		No Hit	Yes	S	Yes		Yes
463	A0A023FE39	Putative secreted protein (Fragment)	16	Female		No Hit	Yes	S	Yes		Yes
470	A0A023FS52	Putative secreted protein	24	Female		No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
473	A0A023G2W2	Putative cuticular protein	18	Female		No Hit	Yes	S	Yes		Yes
474	A0A023G5V0	Putative secreted protein	28	Female		No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
475	A0A023G6S8	Putative secreted protein	23	Female		No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
502	B7PG53	Secreted salivary gland peptide, putative (Fragment)	8	Female		No Hit	Yes	S	Yes		
185	A0A023FQA7	Putative cuticle protein (Fragment)	17		Male	No Hit	Yes	S	Yes		Yes
189	A0A023FQL4	Putative secreted protein 94	22		Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
220	A0A023FUI5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	36		Male	No Hit	Yes	S			Yes
232	A0A023FW93	Putative glycine-rich secreted cement protein	28		Male	No Hit	Yes	S			
347	B7QGS6	CHH (PO-type) variant 1, putative	13		Male	No Hit	Yes		Yes		Yes
361	E5D584	ATAQ protein	57		Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
394	L7LYQ9	Putative tick transposon	125		Male	No Hit			Yes		Yes
438	V5H9X8	Putative animal peptidoglycan recognition protein	27		Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes

Table 7 (Continued)

Protein Number (a)	Protein Accession (b, c)	Protein Name	Theoretical MW (kDa)	Gender (F)	Gender (M)	KOG Cluster (d)	SignalP	TargetP	SecretomeP	N-Glyc	O-Glyc
487	A0A090XEK8	Putative myosin light chain kinase	40		Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
520	L7X8L1	Alpha-latrotoxin (Fragment)	24		Male	No Hit			Yes		Yes
200	A0A023FRH9	Uncharacterized protein	41	Female	Male	No Hit	Yes	S	Yes		Yes
206	A0A023FS65	Uncharacterized protein (Fragment)	22	Female	Male	No Hit	Yes	S		Yes	Yes
477	A0A087T6F8	Uncharacterized protein (Fragment)	42	Female	Male	No Hit			Yes		Yes
4	A0A023FCF7	Uncharacterized protein (Fragment)	13	Female		No Hit			Yes		
459	A0A016TCR8	Uncharacterized protein	9	Female		No Hit			Yes		Yes
209	A0A023FSZ8	Uncharacterized protein	13		Male	No Hit	Yes	S	Yes		
330	B3MZL3	Uncharacterized protein	131		Male	No Hit	Yes	S		Yes	Yes
372	F4X766	Putative uncharacterized protein	23		Male	No Hit			Yes		Yes
379	G3MI66	Putative uncharacterized protein (Fragment)	33		Male	No Hit	Yes	S	Yes	Yes	Yes
406	L7MCX4	Uncharacterized protein (Fragment)	9		Male	No Hit			Yes		Yes
450	W4WMB3	Uncharacterized protein	10		Male	No Hit			Yes		Yes
460	A0A016UGQ7	Uncharacterized protein	13		Male	No Hit			Yes		
536	V5H4C9	Uncharacterized protein	47		Male	No Hit			Yes		Yes
540	X1WKX8	Uncharacterized protein	19		Male	No Hit			Yes		Yes

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "No hit", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG.

(*) Secretome predicted classical pathway.

(**) Secretome predicted non-classical pathway.

Anexo 6

Tabela 8: Proteínas identificadas em glândulas salivares de machos e fêmeas de carrapatos *A. sculptum* classificadas funcionalmente como “Putative Secreted Proteins” e “Putative Housekeeping Proteins” (Anexo 6).

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
PUTATIVE SECRETED PROTEINS (77)							
GLYCINE RICH FAMILY (26)							
Putative grp-3 321 glycine rich family (Fragment)	118	A0A023FKZ2	31	13	Female	Male	A
Putative grp-3 498 glycine rich family	272	A0A023GIP7	24	34	Female	Male	A
Putative grp-3 498 glycine rich family	14	A0A023FEK0	35	3	Female		A
Uncharacterized protein (Fragment)	183	A0A023FQ85	144	23	Female	Male	K
Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	171	A0A023FPF8	48	30	Female	Male	Y
Putative glycine rich secreted protein (Fragment)	5	A0A023FD00	25	23	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein	8	A0A023FD56	36	34	Female	Male	No Hit
Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	19	A0A023FF66	78	31	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich secreted cement protein (Fragment)	39	A0A023FGE2	80	36	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein	136	A0A023FM63	41	46	Female	Male	No Hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 (Fragment)	170	A0A023FPD9	33	7	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8 (Fragment)	177	A0A023FPS8	56	17	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1.8	181	A0A023FQ63	54	17	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich secreted protein	182	A0A023FQ78	18	33	Female	Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	198	A0A023FRF7	36	64	Female	Male	No hit

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	223	A0A023FUP5	37	75	Female	Male	No hit
Putative cuticular protein	473	A0A023G2W2	18	4	Female		No hit
Putative cuticle protein (Fragment)	185	A0A023FQA7	17	8		Male	No hit
Putative secreted glycine-rich protein (Fragment)	188	A0A023FQI4	19	7		Male	No hit
Putative glycine-rich cell wall structural protein 1	220	A0A023FUI5	36	21		Male	No hit
Putative glycine-rich secreted cement protein	232	A0A023FW93	28	22		Male	No hit
Uncharacterized protein	187	A0A023FQG5	37	60	Female	Male	No Hit
Uncharacterized protein	200	A0A023FRH9	41	48	Female	Male	No Hit
Uncharacterized protein (Fragment)	206	A0A023FS65	22	24	Female	Male	No hit
Uncharacterized protein	209	A0A023FSZ8	13	12		Male	No hit
Putative uncharacterized protein (Fragment)	379	G3MI66	33	7		Male	No Hit
UNKNOWN SECRETED PROTEINS (13)							
Putative secreted protein	1	A0A023FBW3	13	19	Female	Male	No hit
Putative secreted protein	7	A0A023FD38	27	12	Female	Male	No hit
Putative secreted protein	12	A0A023FDY8	13	10	Female	Male	No hit
Putative secreted protein (Fragment)	17	A0A023FEZ3	14	21	Female	Male	No hit
Putative secreted protein	37	A0A023FGC6	31	7	Female	Male	No hit
Putative secreted protein	195	A0A023FQZ3	23	5	Female	Male	No hit
Putative secreted protein	197	A0A023FR61	25	14	Female	Male	No hit
Putative secreted protein (Fragment)	463	A0A023FE39	16	9	Female		No hit
Putative secreted protein	470	A0A023FS52	24	5	Female		No hit
Putative secreted protein	474	A0A023G5V0	28	4	Female		No hit

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative secreted protein	475	A0A023G6S8	23	3	Female		No hit
Putative secreted protein 94	189	A0A023FQL4	22	11		Male	No hit
Uncharacterized protein (Fragment)	4	A0A023FCF7	13	11	Female		No hit
ENZYMES (11)							
Putative tick metalloprotease 64 (Fragment)	91	A0A023FJP8	47	14	Female	Male	O
Putative tick metalloprotease 1 (Fragment)	140	A0A023FM86	58	9	Female	Male	O
Putative serine carboxypeptidase cpvl	224	A0A023FUS3	57	2	Female	Male	O
Putative tick metalloprotease 1	225	A0A023FUS8	58	8	Female	Male	O
Putative tick metalloprotease 1	243	A0A023G2B2	58	2	Female	Male	O
Putative serine carboxypeptidase lysosomal cathepsin a	138	A0A023FM77	54	2	Female		O
Putative salivary gland metalloprotease	201	A0A023FRK0	58	6	Female		O
Putative uncharacterized protein	380	G3MK62	56	2		Male	O
Putative tpa exp: metallopeptidase	79	A0A023FIS0	43	10	Female	Male	R
Putative transglutaminase/protease-like proteinues (Fragment)	82	A0A023FIW3	37	4	Female	Male	No hit
Putative transglutaminase/protease-like proteinues	241	A0A023G034	83	2		Male	No hit
FERRITIN (7)							
Putative vitellogenin-2 (Fragment)	147	A0A023FMI5	95	11	Female	Male	I
Putative vitellogenin-2 (Fragment)	205	A0A023FS61	177	15	Female	Male	I
Putative vitellogenin-2	226	A0A023FUV2	177	10	Female	Male	I
Heme lipoprotein	316	A0MVX0	177	3	Female	Male	I
Hemelipoglycoprotein	416	Q19V51	178	3	Female	Male	I
Putative vitellogenin-2	238	A0A023FYX2	178	3	Female		I

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative vitellogenin-2	129	A0A023FLT6	79	5		Male	I
PROTEINASE INHIBITOR DOMAINS (7)							
Uncharacterized protein	214	A0A023FU35	23	6		Male	O
Putative phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Fragment)	143	A0A023FMF5	23	14	Female	Male	R
Putative tick serpins 9	254	A0A023GE23	44	9	Female		V
Putative intracellular cystatin	54	A0A023FHA1	11	59	Female	Male	No hit
Putative tick kunitz 88	190	A0A023FQP1	22	11	Female	Male	No hit
Putative tick til 11	191	A0A023FQQ7	11	9	Female	Male	No hit
Putative cystatin	208	A0A023FSW2	13	21	Female	Male	No hit
OTHER SECRETED PROTEINS (5)							
Putative lysosomal & prostatic acid phosphatase	284	A0A023GN38	43	5	Female		I
Putative secreted protein	194	A0A023FQW8	23	37	Female	Male	No hit
Putative tpa exp: secreted protein	196	A0A023FR11	25	20	Female	Male	No hit
Putative salivary protein	218	A0A023FUE9	25	6	Female	Male	No hit
Secreted salivary gland peptide, putative (Fragment)	502	B7PG53	8	10	Female		No hit
MUCINS (3)							
Putative salivary gland-associated protein	204	A0A023FS18	20	7	Female	Male	K
Putative salivary gland-associated protein	192	A0A023FQS0	20	4	Female	Male	No hit
Putative salivary gland-associated protein	213	A0A023FTZ8	20	6	Female	Male	No hit
LIPOCALINS (2)							
Putative lipocalin-2 1	6	A0A023FD26	25	35	Female	Male	No hit
Putative lipocalin-5 1	217	A0A023FUB8	26	3	Female	Male	No hit

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
SECRETED PROTEINS RELATED TO MODULATION OF HOST IMMUNITY (2)							
Putative scp gapr-1 like: scp-like extracellular protein	33	A0A023FG79	23	55	Female	Male	S
Putative animal peptidoglycan recognition protein	438	V5H9X8	27	4		Male	No hit
SECRETED NUCLEASES (1)							
Putative 5'-nucleotidase (Fragment)	271	A0A023GI14	36	3	Female		F
PUTATIVE HOUSEKEEPING PROTEINS (258)							
ENERGY METABOLISM (43)							
Citrate synthase	13	A0A023FEB2	52	21	Female	Male	C
Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit g/atp20	36	A0A023FGC0	11	22	Female	Male	C
Putative cytochrome c oxidase subunit va	50	A0A023FH45	18	31	Female	Male	C
Putative succinyl-coa synthetase alpha subunit	72	A0A023FID1	34	13	Female	Male	C
Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	74	A0A023FIH9	32	26	Female	Male	C
Putative mitochondrial adp/atp carrier	77	A0A023FIQ0	35	22	Female	Male	C
Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufv2/24 kd subunit	87	A0A023FJA0	28	10	Female	Male	C
Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)	105	A0A023FKC0	35	49	Female	Male	C
Putative nadp-dependent isocitrate dehydrogenase (Fragment)	106	A0A023FKC4	54	20	Female	Male	C
Aconitate hydratase, mitochondrial (Aconitase) (EC 4.2.1.-)	108	A0A023FKF7	85	7	Female	Male	C
ATP synthase subunit alpha	112	A0A023FKR0	60	36	Female	Male	C
Putative glycolate oxidase	135	A0A023FM60	44	36	Female	Male	C
Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	141	A0A023FM91	58	13	Female	Male	C
Putative acetyl-coa hydrolase	146	A0A023FMI0	51	6	Female	Male	C
ATP synthase subunit beta (EC 3.6.3.14) (Fragment)	157	A0A023FND3	56	50	Female	Male	C

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufs8/23 kDa subunit	165	A0A023FNX0	23	11	Female	Male	C
Putative glycolate oxidase (Fragment)	221	A0A023FUK2	32	19	Female	Male	C
Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit oscp/atp5 (Fragment)	229	A0A023FVI3	24	9	Female	Male	C
ATP synthase subunit alpha (Fragment)	240	A0A023FZX4	60	33	Female	Male	C
Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	249	A0A023G7L4	42	14	Female	Male	C
Putative nadh dehydrogenase	266	A0A023GHQ7	14	16	Female	Male	C
Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit	280	A0A023GLT7	36	7	Female	Male	C
Malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37) (Fragment)	311	A0A0C9S2J9	36	12	Female	Male	C
Cytochrome c oxidase subunit Va (Fragment)	328	B2D2D5	17	17	Female	Male	C
Putative nadh:ubiquinone oxidoreductase ndufa2/b8 subunit	30	A0A023FG16	11	11	Female		C
Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2 (Fragment)	115	A0A023FKT5	37	12	Female		C
Succinyl-CoA ligase subunit beta (EC 6.2.1.-)	134	A0A023FM54	41	3	Female		C
Putative mitochondrial f1f0-atp synthase subunit e	169	A0A023FP71	10	16	Female		C
Putative nadh-ubiquinone oxidoreductase ndufs3/30 kDa subunit	275	A0A023GKI9	31	5	Female		C
Putative aldehyde dehydrogenase	277	A0A023GKS1	53	2	Female		C
ATP synthase subunit alpha (Fragment)	376	G3MGG7	62	15	Female		C
Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase	398	L7M097	54	19	Female		C
Succinate dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur subunit, mitochondrial (EC 1.3.5.1)	53	A0A023FH84	32	4		Male	C
Putative prohibitins and stomatins of the pid superfamily	133	A0A023FLY2	40	4		Male	C
Putative aldehyde dehydrogenase	150	A0A023FML0	53	2		Male	C
Putative cytochrome c ixodes scapularis cytochrome c (Fragment)	193	A0A023FQU2	14	19		Male	C
Putative ubiquinol cytochrome c reductase subunit qcr2	234	A0A023FWF1	49	9		Male	C

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative electron transfer flavoprotein alpha subunit	236	A0A023FWN3	35	6		Male	C
Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment)	276	A0A023GKQ8	52	8		Male	C
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha (EC 1.2.4.1)	283	A0A023GMK2	44	3		Male	C
Citrate synthase (Fragment)	440	V5HQ19	59	6		Male	C
Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial (EC 1.10.2.2)	468	A0A023FKN0	30	3		Male	C
Uncharacterized protein (Fragment)	178	A0A023FPW3	15	7	Female		C
CYTOSKELETAL (33)							
Putative lethal 2 37cc	92	A0A023FJP9	31	30	Female	Male	O
Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	175	A0A023FPL0	55	19	Female	Male	O
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	167	A0A023FNY7	28	6	Female		O
Putative calmodulin (Fragment)	22	A0A023FFH5	17	7		Male	T
Putative titin (Fragment)	287	A0A023GP74	389	0		Male	T
Profilin	41	A0A023FGF9	14	31	Female	Male	Z
Calponin	60	A0A023FHM0	21	42	Female	Male	Z
Putative myosin alkali light chain protein	66	A0A023FI34	18	39	Female	Male	Z
Putative myosin regulatory light chain ixodes scapularis myosin regulatory light chain (Fragment)	80	A0A023FIT8	20	14	Female	Male	Z
Putative beta tubulin	102	A0A023FK66	50	41	Female	Male	Z
Putative tropomyosin tropomyosin	114	A0A023FKT3	33	21	Female	Male	Z
Putative myosin class ii heavy chain (Fragment)	149	A0A023FMJ4	195	19	Female	Male	Z
Putative tpa exp: actin depolymerizing factor (Fragment)	176	A0A023FPQ2	21	33	Female	Male	Z
Putative tropomyosin tropomyosin	265	A0A023GHG6	33	25	Female	Male	Z
Putative alpha tubulin (Fragment)	279	A0A023GKX1	54	25	Female	Male	Z

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Actin 3	323	S5FY84	42	49	Female	Male	Z
Paramyosin, putative	334	B7P5D8	100	16	Female	Male	Z
Paramyosin	391	J7LVN2	102	34	Female	Male	Z
Paramyosin	414	Q86RN8	102	30	Female	Male	Z
Putative myosin class i heavy chain	444	V51001	255	5	Female	Male	Z
Putative dynein light chain lc8-type 2b	15	A0A023FET8	10	20		Male	Z
Putative calponin (Fragment)	51	A0A023FH57	24	11		Male	Z
Putative myosin regulatory light chain ef-hand protein superfamily (Fragment)	58	A0A023FHI7	20	12		Male	Z
Putative alpha tubulin (Fragment)	103	A0A023FK91	51	3		Male	Z
Putative ca2+-binding actin-bundling protein	257	A0A023GFW4	103	1		Male	Z
Actin-depolymerizing factor 1	290	A0A034WYZ2	17	22		Male	Z
Beta actin-like 1 protein	355	D4HTS7	42	30		Male	Z
Myosin heavy chain, muscle	358	E2B796	257	3		Male	Z
Beta-actin (Fragment)	363	Q58NQ6	14	40		Male	Z
Actin (Fragment)	456	B5SUT6	23	18		Male	Z
Actin (Fragment)	457	D9YST8	24	47		Male	Z
Putative actin-binding cytoskeleton protein filamin (Fragment)	469	A0A023FMG5	121	1		Male	Z
Putative uncharacterized protein	381	G3MLM7	42	57	Female	Male	Z
PROTEIN MODIFICATION MACHINERY (29)							
Thioredoxin	10	A0A023FDS6	12	50	Female	Male	O
Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant	27	A0A023FFW7	26	31	Female	Male	O
Putative alpha crystallins (Fragment)	35	A0A023FGB2	21	32	Female	Male	O

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative alpha crystallins	59	A0A023FHI8	20	17	Female	Male	O
Putative multifunctional chaperone ixodes scapularis multifunctional chaperone	63	A0A023FI08	29	11	Female	Male	O
Putative heat shock protein hsp 90-alpha isoform 1	107	A0A023FKD7	85	5	Female	Male	O
Putative heat shock protein (Fragment)	137	A0A023FM70	72	26	Female	Male	O
Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	219	A0A023FUI3	29	37	Female	Male	O
Putative heat shock protein	245	A0A023G4V0	21	7	Female	Male	O
Putative heat shock protein	248	A0A023G7H2	22	16	Female	Male	O
Putative heat shock protein	260	A0A023GGY0	11	26	Female	Male	O
Putative t-complex protein 1 (Fragment)	285	A0A023GNQ8	59	2	Female	Male	O
Putative heat shock protein	16	A0A023FEV4	11	24	Female		O
Putative alpha crystallins	252	A0A023GAP9	23	10	Female		O
1433 protein zetalike [Apis florea] (Tyrosine 3/tryptophan 5-monooxygenase activation protein)	320	A7TZ83	28	11	Female		O
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	18	A0A023FF42	13	8		Male	O
Putative alpha crystallins	78	A0A023FIR2	20	27		Male	O
Putative stress-induced-phosphoprotein 1 (Fragment)	116	A0A023FKU2	39	7		Male	O
Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment)	128	A0A023FLR7	65	15		Male	O
Putative small heat shock protein ii	142	A0A023FMF0	20	6		Male	O
Putative atpase of the aaa+ class posttranslational modification (Fragment)	159	A0A023FNE4	92	6		Male	O
Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase (EC 3.4.19.12)	228	A0A023FV42	26	6		Male	O
Hsp90	352	C5J3T0	83	3		Male	O
Putative alkyl hydroperoxide reductase thiol specific antioxidant (Fragment)	407	L7MG42	28	14		Male	O
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (Fragment)	462	A0A023FDS5	11	13		Male	O

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Uncharacterized protein	261	A0A023GGY3	28	39	Female	Male	O
Putative uncharacterized protein	374	G3MF27	73	8	Female	Male	O
Putative cathepsin c (Fragment)	164	A0A023FNW1	23	8	Female	Male	No hit
Putative endoplasmic reticulum protein 29 (Fragment)	168	A0A023FP20	32	9	Female		No hit
PROTEIN SYNTHESIS MACHINERY (26)							
Putative trna selenocysteine 1-associated protein 1	29	A0A023FFZ3	24	15	Female	Male	A
Putative ribosomal protein	11	A0A023FDU6	12	37	Female	Male	J
Putative 40s ribosomal protein s2	26	A0A023FFU4	18	24	Female	Male	J
Putative 60s acidic ribosomal protein p1	40	A0A023FGF3	13	12	Female	Male	J
Putative 40s ribosomal protein s16	49	A0A023FH17	17	28	Female	Male	J
40S ribosomal protein S21	52	A0A023FH77	9	18	Female	Male	J
60S acidic ribosomal protein P0	70	A0A023FIA8	35	21	Female	Male	J
60S acidic ribosomal protein P0	111	A0A023FKN1	35	13	Female	Male	J
Putative translation initiation factor	125	A0A023FLH7	37	8	Female	Male	J
Putative elongation factor 2-like isoform 1	160	A0A023FNE9	95	9	Female	Male	J
Putative ubiquitin-40s ribosomal protein s27a (Fragment)	255	A0A023GEE1	10	66	Female	Male	J
40S ribosomal protein SA	270	A0A023GI67	35	12	Female	Male	J
40S ribosomal protein S28 (Fragment)	289	A0A034WU61	12	21	Female	Male	J
Putative ribosomal protein	310	A0A0C9RRZ5	12	37	Female	Male	J
Elongation factor 1-alpha (Fragment)	366	F0J8I9	43	19	Female	Male	J
40S ribosomal protein S28	413	M1XK28	14	18	Female	Male	J
Putative translation elongation factor ef-1 alpha/tu OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	472	A0A023FY92	31	19	Female	Male	J

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Ubiquitin/40S ribosomal protein S27a OS=Ornithodoros parkeri PE=2 SV=1	492	A6NA05	17	26	Female	Male	J
Putative ribosomal protein s18	25	A0A023FFK4	18	8	Female		J
Putative ribosomal protein I31	38	A0A023FGE1	15	7	Female		J
40S ribosomal protein S12	44	A0A023FGV4	14	11	Female		J
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I (Fragment)	130	A0A023FLU8	39	4	Female		J
Eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF-5A)	465	A0A023FFM0	17	6	Female		J
Putative 60s ribosomal protein I9	83	A0A023FIY8	22	13		Male	J
Putative translation elongation factor ef-1 gamma	93	A0A023FJQ1	49	2		Male	J
Putative ubiquitin family protein	362	E5T132	12	39		Male	J
TRANSPORTERS AND STORAGE (15)							
Putative atp synthase subunit d	57	A0A023FHH7	20	30	Female	Male	C
Putative oligomycin sensitivity-conferring protein (Fragment)	76	A0A023FIN3	19	30	Female	Male	C
Putative atp synthase h+ transporting mitochondrial f1 complex delta subunit (Fragment)	202	A0A023FRK5	19	8	Female	Male	C
Putative mitochondrial atp synthase epsilon chain	312	A0A0C9SBD7	7	22	Female	Male	C
Putative lipid particle	55	A0A023FHB9	13	9		Male	C
Putative atp synthase subunit b	203	A0A023FRY9	31	10		Male	C
Putative vitellogenin-1 (Fragment)	282	A0A023GME3	154	10	Female	Male	I
Putative microtubule associated complex (Fragment)	253	A0A023GDS5	117	1	Female		I
Putative vitellogenin-1 (Fragment)	281	A0A023GMC7	123	5	Female		I
Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	32	A0A023FG62	35	9	Female	Male	P
Putative mitochondrial voltage dependent anion-selective channel	113	A0A023FKR8	30	28	Female	Male	P
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha (EC 3.6.3.-)	144	A0A023FMF6	115	15	Female	Male	P

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit beta	263	A0A023GHE3	35	3		Male	P
Putative carbonic anhydrase ixodes scapularis carbonic anhydrase	237	A0A023FYN3	33	18	Female	Male	R
Putative atpase inhibitory factor 1 (Fragment)	247	A0A023G6P9	12	10		Male	No hit
TRANSCRIPTION MACHINERY (13)							
Putative small ribonucleoprotein particle protein smg (Fragment)	174	A0A023FPJ7	8	17	Female	Male	A
Putative rbp1-like protein	262	A0A023GH95	15	20	Female	Male	A
Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f	269	A0A023GI51	33	20	Female	Male	A
Putative hoi-polloi	21	A0A023FF79	14	19	Female		A
Putative rna-binding protein elav/hu rrm superfamily	99	A0A023FK48	34	3	Female		A
Putative polyc-binding hnnp-k protein hrb57a/hnnp	110	A0A023FKM7	34	4	Female		A
Putative small nuclear ribonucleoprotein f	28	A0A023FFY5	9	14		Male	A
Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 27c	101	A0A023FK55	34	3		Male	A
Putative apoptosis-promoting rna-binding protein tia-1/tiar rrm superfamily (Fragment)	124	A0A023FLE7	35	4		Male	A
Putative atp-dependent rna helicase	95	A0A023FJS7	48	6		Male	J
Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment)	31	A0A023FG19	17	14	Female	Male	K
Putative prohibitin 2	119	A0A023FL38	33	6	Female		O
Putative complement component 1 q subcomponent binding protein/mrna splicing factor sf2 subunit p32	186	A0A023FQB4	29	4	Female	Male	V
LIPID METABOLISM (12)							
Putative enoyl-coa hydratase	73	A0A023FIF5	31	11	Female	Male	I
Putative enoyl-coa hydratase	123	A0A023FLB7	44	18	Female	Male	I
Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase	156	A0A023FNC5	83	4	Female	Male	I
Putative acetyl-coa acetyltransferase (Fragment)	172	A0A023FPG2	54	2	Female	Male	I

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative tpa exp: fatty acid-binding protein fabp (Fragment)	173	A0A023FPJ3	18	36	Female	Male	I
Putative enoyl-coa hydratase (Fragment)	313	A0A0C9SE68	44	14	Female	Male	I
Putative 3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	97	A0A023FJZ4	34	4	Female		I
Putative hydroxyacyl-coa dehydrogenase/enoyl-coa hydratase (Fragment)	126	A0A023FLH9	46	4	Female		I
Putative enoyl-coa isomerase (Fragment)	2	A0A023FC72	32	3		Male	I
Putative short-chain acyl-coa dehydrogenase	121	A0A023FL46	45	3		Male	I
Putative enoyl-coa hydratase	268	A0A023GI46	33	3		Male	I
Putative animal-type fatty acid synthase (Fragment)	286	A0A023GP33	86	1		Male	I
DETOXIFICATION (12)							
Putative thioredoxin peroxidase	42	A0A023FGK2	22	12	Female	Male	O
Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase	71	A0A023FIC2	26	38	Female	Male	O
Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase	90	A0A023FJM5	26	22	Female	Male	O
Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment)	250	A0A023G841	29	10	Female	Male	O
Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase	48	A0A023FH05	25	10		Male	O
Superoxide dismutase (EC 1.15.1.1)	67	A0A023FI64	24	11	Female	Male	P
Catalase (EC 1.11.1.6)	155	A0A023FN97	57	15	Female	Male	P
Putative pln02957 copper zinc superoxide dismutase (Fragment)	151	A0A023FMU5	10	16	Female		P
Superoxide dismutase [Cu-Zn] (EC 1.15.1.1)	43	A0A023FGU1	16	27		Male	P
Putative short-chain alcohol dehydrogenase/3-hydroxyacyl-coa dehydrogenase	132	A0A023FLX5	27	15	Female		Q
Putative selenoprotein w 2a	9	A0A023FDL5	9	22	Female	Male	No hit
Putative sulfotransferase ixodes scapularis sulfotransferase (Fragment)	215	A0A023FU51	24	7	Female		No hit
CARBOHYDRATE METABOLISM (10)							

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Triosephosphate isomerase (EC 5.3.1.1)	86	A0A023FJ79	27	34	Female	Male	G
Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3)	153	A0A023FN20	49	7	Female	Male	G
Putative alpha-d-galactosidase melibiase	227	A0A023FUW9	60	25	Female	Male	G
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	230	A0A023FW03	40	18	Female	Male	G
Putative enolase	233	A0A023FWA3	47	21	Female	Male	G
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12)	235	A0A023FWM8	36	61	Female	Male	G
Fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13)	274	A0A023GIU8	38	17	Female	Male	G
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	458	B5TMF7	36	12	Female	Male	G
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	466	A0A023FIE8	36	43	Female	Male	G
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12) (Fragment)	375	G3MGB9	45	4		Male	G
NUCLEAR REGULATION (10)							
Putative small nuclear ribonucleoprotein sm d3	34	A0A023FGA0	13	8	Female		A
Histone H2A	56	A0A023FHH5	13	31	Female	Male	B
Histone H4 (Fragment)	210	A0A023FT54	12	49	Female	Male	B
Histone H2B	267	A0A023GHR7	14	32	Female	Male	B
Histone H3	368	F0JA43	15	5	Female	Male	B
A0A0D6L5R9_9BILA Core histone H2A/H2B/H3/H4 OS=Ancylostoma ceylanicum GN=ANCCEY_14054 PE=4 SV=1	490	A0A0D6L5R9	37	7	Female	Male	B
B2ZF66_PHIRO Histone H2B OS=Philodina roseola PE=3 SV=1	497	B2ZF66	14	23	Female	Male	B
Histone H2B-like	370	F1SZA1	14	18		Male	B
Putative leucine-rich acidic nuclear protein	89	A0A023FJG7	30	3		Male	D
R7T426_CAPTE Uncharacterized protein OS=Capitella teleta GN=CAPTEDRAFT_198869 PE=4 SV=1	524	R7T426	25	15	Female	Male	B
SIGNAL TRANSDUCTION (10)							

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase (PPIase) (EC 5.2.1.8)	23	A0A023FFI9	22	46	Female	Male	O
Putative rap1a member of ras oncoprotein family	81	A0A023FIV8	21	7		Male	R
Uncharacterized protein	251	A0A023G846	22	6		Male	R
Putative zinc-binding protein of the histidine triad hit family	20	A0A023FF67	14	17	Female	Male	T
Putative g protein	69	A0A023FIA5	36	11	Female	Male	T
Putative neural cell adhesion molecule l1 (Fragment)	127	A0A023FLK6	171	10	Female	Male	T
Putative regulatory protein mlp	212	A0A023FTF5	11	53	Female	Male	T
Putative ca ²⁺ /calmodulin-dependent protein	256	A0A023GF33	17	8	Female	Male	T
Carboxylic ester hydrolase (EC 3.1.1.-) (Fragment)	273	A0A023GIU7	38	4	Female		T
Putative cytoskeletal protein adducin	104	A0A023FK97	74	2		Male	T
EXTRACELLULAR MATRIX AND ADHESION (9)							
Putative triple helix repeat-containing collagen	244	A0A023G3G9	53	4	Female	Male	K
Putative nidogen (Fragment)	246	A0A023G500	124	1		Male	M
Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	161	A0A023FNG9	57	27	Female	Male	O
Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	439	V5HEE5	341	2	Female	Male	O
Protein disulfide-isomerase	180	A0A023FQ39	57	2	Female		O
Protein disulfide-isomerase (EC 5.3.4.1)	239	A0A023FZW2	57	2		Male	O
Putative heparan sulfate proteoglycan 2 (Fragment)	410	L7MJ61	173	2		Male	O
Putative determination of adult lifespan	152	A0A023FN19	35	4	Female	Male	T
Galectin (Fragment)	45	A0A023FGW5	29	7	Female		W
PROTEASOME MACHINERY (8)							
Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1) (Fragment)	61	A0A023FHR7	21	10	Female	Male	O

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	85	A0A023FJ75	27	10	Female	Male	O
Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb4/pre4	88	A0A023FJC3	28	11	Female	Male	O
Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	100	A0A023FK49	26	12	Female	Male	O
Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	467	A0A023FJ34	26	9	Female	Male	O
Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	46	A0A023FGZ7	30	4	Female		O
Putative 20s proteasome regulatory subunit beta type psmb2/pre1 (Fragment)	184	A0A023FQA2	19	5	Female		O
Proteasome subunit beta type (EC 3.4.25.1) (Fragment)	166	A0A023FNY4	28	5		Male	O
NUCLEOTIDE METABOLISM (6)							
Nucleoside diphosphate kinase (EC 2.7.4.6)	62	A0A023FHW5	17	40	Female	Male	F
Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.205)	96	A0A023FJZ1	55	9	Female		F
Putative dihydroorotase (Fragment)	139	A0A023FM85	43	3	Female		F
Putative phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase	145	A0A023FMG7	46	9	Female		F
Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase (Fragment)	242	A0A023G079	69	2	Female		F
Putative mitochondrial associated endoribonuclease mar1 isochorismatase superfamily	64	A0A023FI13	23	22	Female	Male	R
UNKNOWN CONSERVED PROTEIN (6)							
Uncharacterized protein	47	A0A023FH01	16	47	Female	Male	R
Putative differentiation-related protein	207	A0A023FSH0	49	10	Female	Male	S
Putative conserved membrane protein (Fragment)	131	A0A023FLX0	52	19	Female	Male	Y
Putative conserved membrane protein (Fragment)	163	A0A023FNR2	64	12	Female	Male	Y
Putative conserved membrane protein (Fragment)	120	A0A023FL42	37	23		Male	Y
Putative conserved membrane protein (Fragment)	222	A0A023FUN5	36	34	Female	Male	No Hit

AMINO ACID METABOLISM (5)

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative dihydropteridine reductase dhpr/qdpr	98	A0A023FK31	25	24	Female	Male	E
D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (EC 1.1.1.95)	158	A0A023FND7	56	5	Female	Male	E
Putative glutamate/leucine/phenylalanine/valine dehydrogenase	162	A0A023FNI1	62	8	Female	Male	E
Putative glycine c-acetyltransferase/2-amino-3-ketobutyrate-coa ligase	94	A0A023FJS2	45	3		Male	E
Aspartate aminotransferase (EC 2.6.1.1)	231	A0A023FW59	46	3		Male	E
PROTEIN EXPORT MACHINERY (4)							
Annexin (Fragment)	3	A0A023FC75	40	25	Female	Male	U
Putative gtpase rab2 small g protein superfamily	65	A0A023FI28	23	14		Male	U
GTP-binding nuclear protein	68	A0A023FI65	25	5		Male	U
Putative vesicle trafficking protein sly1 sec1 family (Fragment)	84	A0A023FJ28	39	3		Male	U
OTHER PEPTIDASES (3)							
Putative processing peptidase beta subunit ixodes scapularis processing peptidase beta subunit	148	A0A023FMI6	53	11	Female	Male	O
Putative processing peptidase beta subunit ixodes scapularis processing peptidase beta subunit	278	A0A023GKU4	54	2		Male	O
Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase	122	A0A023FLA5	48	12	Female	Male	R
INTERMEDIATE METABOLISM (2)							
Adenosylhomocysteinase (EC 3.3.1.1)	403	L7M8R8	48	9	Female		H
Putative s-adenosylcysteine hydrolase (Fragment)	259	A0A023GGX5	28	13		Male	H
IMMUNITY RELATED PRODUCTS (2)							
Putative dorsal switch protein 1	24	A0A023FFK0	24	18	Female	Male	K
Putative nuclear transport factor-2	464	A0A023FF95	15	10	Female		U
NON-CLASSIFIED PROTEINS (166)							
AAEL009878-PA	415	Q16UL0	207	1	Female		A

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Pre-mRNA splicing factor Syf1, putative	349	B7QIT4	100	1	Female		A
Putative deah-box rna helicase	397	L7LZS2	231	0		Male	A
Putative hnRMP	291	A0A061QLH9	31	3		Male	A
Putative tick transposon (Fragment)	405	L7MBD6	131	1		Male	A
Putative tick transposon (Fragment)	519	L7MD82	121	1		Male	A
Putative trna and rna cytosine-c5-methylase nucleolar protein nol1/nop2	396	L7LZC8	79	1		Male	A
Putative uncharacterized protein	373	G0N5F0	264	1		Male	A
Putative structural maintenance of chromosomes 4 (Fragment)	537	V5HD08	139	1	Female	Male	B
Fetal alzheimer antigen, putative (EC 2.3.1.48)	350	B7QLX5	267	0		Male	B
Putative zinc finger and btb domain-containing protein 17 (Fragment)	412	L7MJL2	222	1		Male	B
Electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	359	E2BJ78	35	4	Female	Male	C
Fatty aldehyde dehydrogenase	488	A0A0A1WJM9	62	2	Female		C
Putative microtubule associated complex	392	L7LWU5	28	5	Female		C
Putative mitochondrial adp/atp carrier	447	V5IFY7	36	2	Female		C
Putative zinc-binding oxidoreductase	401	L7M642	36	4	Female		C
Aldehyde dehydrogenase	331	B3S5R6	59	2		Male	C
Arginine kinase	322	A7XZJ2	40	3		Male	C
Isocitrate dehydrogenase [NADP] (EC 1.1.1.42)	338	B7PFJ2	46	3		Male	C
Putative uncharacterized protein	383	G3MPB4	61	3	Female	Male	C
Uncharacterized protein (Fragment)	301	A0A087UX43	79	2		Male	C
Putative lamin	400	L7M506	70	2		Male	D
Uncharacterized protein	329	B3LXL3	128	1		Male	D

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
GOT2 aspartate aminotransferase, putative (EC 2.6.1.1)	346	B7Q1F6	44	4	Female		E
Solute carrier family 45 member 4 (Fragment)	479	A0A087TRD9	26	5	Female	Male	G
Secreted protein, putative (EC 2.4.1.228) (Fragment)	341	B7PM74	34	6		Male	G
UDP-glucuronosyltransferase (EC 2.4.1.17)	529	T1KF71	48	3		Male	G
Uncharacterized protein	428	T1KZ51	106	1		Male	G
Uncharacterized protein	453	W4YE44	43	3		Male	G
3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase, mitochondrial (EC 3.1.2.4) (3-hydroxyisobutyryl-coenzyme A hydrolase) (Fragment)	441	V5HV95	38	3	Female		I
Hydroxyacyl-CoA dehydrogenase, putative (EC 1.1.1.211) (Fragment)	342	B7PQP7	80	1	Female		I
Putative malonyl-CoA-acyl carrier protein transacylase, mitochondrial (Fragment)	292	A0A087SX23	44	3	Female		I
Putative vitellogenin-b (Fragment)	538	V5HMG5	256	0	Female		I
Phospholipase A-2-activating protein, putative (EC 2.7.11.7) (Fragment)	344	B7PWX1	87	1		Male	I
Putative uncharacterized protein	385	G3MR88	46	3	Female	Male	I
Putative uncharacterized protein	384	G3MR86	22	28	Female	Male	J
Putative uncharacterized protein (Fragment)	377	G3MHT8	24	7	Female	Male	J
Putative uncharacterized protein (Fragment)	378	G3MI35	28	15	Female	Male	J
40S ribosomal protein S16	357	E1GEU2	16	8	Female		J
40S ribosomal protein S27	354	C9W1L6	9	13	Female		J
Eukaryotic initiation factor 4A-II (Fragment)	294	A0A087TAB2	48	4	Female		J
tRNA (Adenine-N(1)-)-methyltransferase non-catalytic subunit TRM6, putative (Fragment)	500	B7P5Y5	41	2	Female		J
Isoleucine--tRNA ligase, cytoplasmic (Fragment)	296	A0A087U9V3	127	1		Male	J
Ribosome biogenesis protein BOP1 homolog	418	Q6WCQ5	85	1		Male	J
Truncated 40S ribosomal protein S7 (Fragment)	367	F0JA20	22	6		Male	J

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Putative uncharacterized protein	333	B7P1V6	178	0		Male	J
Putative uncharacterized protein (Fragment)	513	G3MIP1	51	2	Female		J
Hepatoma-derived growth factor-related protein 2 (Fragment)	476	A0A087SW11	56	1	Female		K
Transcription factor, putative (Fragment)	501	B7P8J7	46	2	Female		K
Zinc finger protein 271-like Protein	505	D6WDN7	51	2	Female		K
Putative tef-1 (Fragment)	411	L7MJB2	55	2		Male	K
RNA polymerase Rpb3/Rpb11 dimerization domain protein	315	A0A0D8Y9K3	52	2		Male	K
Tho2 protein, putative	339	B7PJK2	148	1		Male	K
Uncharacterized protein	426	T1KLC0	35	2	Female	Male	K
Putative uncharacterized protein	360	E3N179	44	2	Female		K
Pacman protein, putative	343	B7PTZ6	127	1	Female		L
Exonuclease	454	W6UZK1	86	1		Male	L
Putative single-stranded dna-binding protein (Fragment)	306	A0A090XE53	11	10		Male	L
Uncharacterized protein	527	T1JYW1	83	1	Female		M
Heat shock protein 70	539	V5RG72	70	2	Female	Male	O
Alpha-(1,6)-fucosyltransferase (Fragment)	299	A0A087URS9	13	10	Female		O
Protein disulfide isomerase 3 (Fragment)	509	E4W3Z1	40	3	Female		O
ATPase, AAA family	449	W2TLS2	47	3		Male	O
Chaperonin subunit, putative	337	B7PEV0	60	8		Male	O
Heat shock protein 60	421	S5FWR8	62	8		Male	O
Polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase (EC 2.4.1.-) (Protein-UDP acetylgalactosaminyltransferase)	436	V5H3Z4	69	2		Male	O
Proteasome subunit alpha type (EC 3.4.25.1)	433	T1PFK1	30	4		Male	O

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Truncated peroxiredoxin (Fragment)	319	A6NA14	21	12		Male	O
Putative uncharacterized protein	514	G3MMS7	18	4	Female		O
Putative uncharacterized protein	382	G3MLW3	35	5		Male	O
Catalase	307	A0A0A7CAN8	58	3	Female		P
Catalase (EC 1.11.1.6)	451	W4XA87	56	3	Female		P
Sodium/potassium ATPase alpha subunit (Fragment)	353	C7SP07	37	3	Female		P
Calcium-activated BK potassium channel alpha subunit	448	W2TKS5	108	1		Male	P
Uncharacterized protein	452	W4Y783	323	0	Female		P
Uncharacterized protein	425	T1K2M1	170	1	Female		Q
Uncharacterized protein	389	H2VGA8	873	0		Male	Q
Uncharacterized protein	423	T1FSL5	59	2		Male	Q
Putative conserved secreted protein	117	A0A023FKW4	11	24	Female	Male	R
Membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein 3	388	G7YI90	82	2	Female		R
Putative conserved plasma membrane protein (Fragment)	408	L7MIB5	100	1	Female		R
Putative conserved secreted protein	288	A0A023GP85	45	2	Female		R
Putative uncharacterized protein	512	G0NYP7	72	2	Female		R
Arrestin domain-containing protein, putative	351	B7QMY6	34	4		Male	R
Putative msx2-interacting protein (Fragment)	409	L7MIP6	452	0		Male	R
Putative transporter add1 major facilitator superfamily (Fragment)	442	V5HVX4	55	1		Male	R
S-formylglutathione hydrolase (EC 3.1.2.12)	348	B7QIS7	31	2		Male	R
Uncharacterized protein	419	R7TRJ8	64	4	Female		R
Uncharacterized protein	303	A0A087ZT44	368	0		Male	R

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Uncharacterized protein	399	L7M4F3	28	5		Male	R
Protein CBG14871	495	A8XKV9	74	1	Female		S
Putative nucleoporin (Fragment)	437	V5H7W4	227	1	Female		S
Uncharacterized protein	431	T1L1E0	138	0	Female	Male	S
Uncharacterized protein	526	T1JTJ5	34	4	Female		S
Uncharacterized protein	535	U4UJC1	7	8		Male	S
Alpha-actinin-2-associated lim protein/alp, putative	507	E0VI60	181	1	Female		T
Down syndrome cell adhesion molecule-like protein Dscam2 (Fragment)	484	A0A087UW97	112	1	Female		T
G protein coupled receptor	317	A1KXD5	104	1	Female		T
Speckle-type poz protein	516	J0XMM7	42	1	Female		T
Tyrosine-protein phosphatase 10D (Fragment)	298	A0A087UKS4	163	1	Female		T
Protogenin	371	F4WZW8	131	1		Male	T
Putative phospholipid binding protein	393	L7LXD1	186	0		Male	T
RIH domain protein (Fragment)	434	T1PN36	559	0		Male	T
Titin (Fragment)	295	A0A087TAQ5	279	0		Male	T
Troponin C	324	A9QQ35	18	10		Male	T
Uncharacterized protein	314	A0A0D6LGP1	61	2	Female	Male	T
Uncharacterized protein	429	T1L0G5	2.049	0	Female	Male	T
Uncharacterized protein (Fragment)	297	A0A087UEG9	61	2	Female	Male	T
Putative uncharacterized protein	498	B3RQE7	133	1	Female		T
Uncharacterized protein	486	A0A090MNP8	181	1	Female		T
Uncharacterized protein	530	T1KFN2	75	1	Female		T

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Uncharacterized protein (Fragment)	483	A0A087U3H9	7	14	Female		T
Putative uncharacterized protein	364	E9HED0	25	4		Male	T
Uncharacterized protein	402	L7M6N5	126	1		Male	T
Uncharacterized protein	420	R7U8K0	216	0		Male	T
Putative guanine nucleotide exchange factor efa6	461	A0A023F2W0	109	1	Female		U
AP-2 complex subunit alpha-1, putative	336	B7P9Z2	96	1		Male	U
Putative golgin subfamily protein a member 5	446	V5IF18	80	2		Male	U
Putative mucin-17	395	L7LYT9	418	0		Male	U
Uncharacterized protein	432	T1L260	102	1	Female		U
Uncharacterized protein (Fragment)	435	V4AQV5	13	9		Male	U
Centrosome-associated protein CEP250, putative (EC 1.3.1.74) (EC 3.1.3.48)	345	B7PYE5	303	1	Female		Z
E3 ubiquitin-protein ligase LRSAM1 (Fragment)	300	A0A087UUE2	79	1	Female		Z
Predicted protein (Fragment)	493	A7SMP8	81	3	Female		Z
Putative beta-spectrin	404	L7M942	279	2	Female		Z
Actin (Fragment)	457	D9YST8	24	47		Male	Z
Myosin heavy chain, non-muscle (Fragment)	293	A0A087T9W3	210	1		Male	Z
Tropomyosin (Fragment)	309	A0A0B1PJK0	34	5		Male	Z
Tropomyosin	321	A7UMC0	33	4		Male	Z
Putative uncharacterized protein	356	E0VB58	161	1		Male	Z
Uncharacterized protein	332	B4ND90	135	1		Male	Z
(Cytosine-5)-methyltransferase 1, putative	499	B7P2Z6	77	2	Female	Male	No Hit
Phd finger protein	327	B0X127	8	11	Female	Male	No Hit

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Polyprotein of retroviral origin, putative (EC 2.7.7.49) (Fragment)	503	B7PIG7	17	5	Female	Male	No Hit
Retrovirus-related Pol polyprotein from transposon opus (Fragment)	482	A0A087U2J3	171	1	Female	Male	No Hit
Calycin-like domain and Calycin domain-containing protein (Uncharacterized protein)	304	A0A090LRQ2	42	2	Female		No Hit
Cuticular protein, putative	340	B7PLC7	20	9	Female		No Hit
Alpha-latrotoxin (Fragment)	520	L7X8L1	24	4		Male	No Hit
ATAQ protein	361	E5D584	57	1		Male	No Hit
CHH (PO-type) variant 1, putative	347	B7QGS6	13	9		Male	No Hit
Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 13 (Fragment)	308	A0A0A9XG89	31	3		Male	No Hit
Phosphatase 1 regulatory subunit 12b	326	B0WIJ8	55	2		Male	No Hit
Putative myosin light chain kinase	487	A0A090XEK8	40	2		Male	No Hit
Putative tick transposon	394	L7LYQ9	125	1		Male	No Hit
Uncharacterized protein	390	I1EDG0	48	3		Male	No Hit
Uncharacterized protein	430	T1L133	8	29	Female	Male	No Hit
Uncharacterized protein	528	T1K3R6	52	2	Female	Male	No Hit
Uncharacterized protein	532	T1L6E0	18	4	Female	Male	No Hit
Uncharacterized protein (Fragment)	477	A0A087T6F8	42	3	Female	Male	No Hit
Putative uncharacterized protein	335	B7P5P4	68	2	Female		No Hit
Putative uncharacterized protein	365	E9HK21	21	4	Female		No Hit
Uncharacterized protein	459	A0A016TCR8	9	6	Female		No Hit
Uncharacterized protein	494	A8DZ49	8	7	Female		No Hit
Uncharacterized protein	534	U1MEP1	18	3	Female		No Hit
Uncharacterized protein	541	X1X222	170	1	Female		No Hit

Table 8 (Continued)

Protein Name	Protein Number (a)	Protein Accession (b,c)	Theoretical MW (kDa)	Coverage (%)	Gender (F)	Gender (M)	KOG CLUSTER (d)
Uncharacterized protein (Fragment)	478	A0A087TNG4	36	3	Female		No Hit
Uncharacterized protein (Fragment)	480	A0A087TVE4	91	1	Female		No Hit
Uncharacterized protein (Fragment)	481	A0A087U1P9	183	1	Female		No Hit
Putative uncharacterized protein	372	F4X766	23	10		Male	No Hit
Uncharacterized protein	330	B3MZL3	131	1		Male	No Hit
Uncharacterized protein	427	T1KRA3	132	1		Male	No Hit
Uncharacterized protein	450	W4WMB3	10	11		Male	No Hit
Uncharacterized protein	460	A0A016UGQ7	13	6		Male	No Hit
Uncharacterized protein	536	V5H4C9	47	2		Male	No Hit
Uncharacterized protein	540	X1WKX8	19	8		Male	No Hit
Uncharacterized protein (Fragment)	406	L7MCX4	9	8		Male	No Hit

(a) Identification numbers refer for this shotgun study.

(b) Accession number and protein identity are listed according to the Chelicerata and Metazoa database deposited in Uniprot.

(c) Proteins identified by at least 1 peptide with FDR < 1.

(d) The letters KOG cluster represent their classes. In "No hit", the protein identified is not aligned with any ortholog annotated in KOG.

NOTE: Proteins not classified by this strategy were determined as non-classified.