

FERNANDA SALES DE ARAÚJO

ANÁLISE PROTEÔMICA DO INTESTINO DE CARRAPATOS *Amblyomma sculptum* MACHOS E FÊMEAS NÃO ALIMENTADOS

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2017

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

T

A663a
2017

Araújo, Fernanda Sales de, 1990-

Análise proteômica do intestino de carrapatos *Amblyomma sculptum* machos e fêmeas não alimentados / Fernanda Sales de Araújo. – Viçosa, MG, 2017.

xiv, 112f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

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

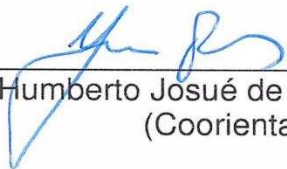
CDD 22 ed. 595.429

FERNANDA SALES DE ARAÚJO

ANÁLISE PROTEÔMICA DO INTESTINO DE CARRAPATOS *Amblyomma sculptum* MACHOS E FÊMEAS NÃO ALIMENTADOS

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

APROVADA: 10 de fevereiro de 2017



Humberto Josué de Oliveira Ramos
(Coorientador)



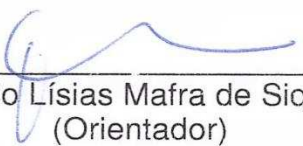
Itabajara da Silva Vaz Júnior



Edvaldo Barros



Tiago Antônio de Oliveira Mendes



Cláudio Lísias Mafra de Siqueira
(Orientador)

Dedico este trabalho a Deus, que sempre está presente em todos os momentos da minha vida, aos meu pais e demais familiares, pela paciência e esforços imensuráveis para que eu pudesse alcançar meus sonhos.

“Quando estiveres em oração, sorvendo a taça de angústia, na sentença que indicaste a ti próprio diante das leis Divinas, roga a benção da saúde e a riqueza da paz, a luz da consolação e o favor da alegria, mas pede a Deus, acima de tudo, o apoio da humildade e a força da paciência. ”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

- ✓ À Deus, por sua infinita bondade e amparo nos difíceis e bons momentos da vida;
- ✓ À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade, obtenção de conhecimento e crescimento profissional e pessoal;
- ✓ Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada, pela disponibilidade e apoio;
- ✓ Ao professor e orientador, Cláudio Mafra, pela amizade, paciência e dedicação desde a minha graduação até o presente momento, por todos os ensinamentos e esclarecimentos durante as minhas indagações;
- ✓ Ao Edvaldo, pela infinita disponibilidade, paciência e compartilhamento de ideias que foram fundamentais para a realização do trabalho, além dos conselhos que levarei para toda vida;
- ✓ Aos amigos Davilson, Paulão, Carlão, Rafael Barcelos, Paolla, Igor, Raquel, Virgílio, Nadja e Flaviane pela imensa ajuda e suporte durante o trabalho;
- ✓ Aos doutorandos, mestrandos e estagiários do Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia, pela amizade, momentos de descontração, companheirismo e ajuda;
- ✓ Ao NUBIOMOL, pela disponibilidade da estrutura utilizada;
- ✓ Aos amigos do NUBIOMOL, Humberto, Nívea, Cláudia, Edvaldo, Pedro e Camilo, pelo apoio e incentivo durante este período;
- ✓ Aos professores que contribuíram para meu crescimento profissional;
- ✓ Ao professor Mathias Szabó e à doutoranda Maria Marlene Martins da Universidade Federal de Uberlândia, pela disponibilidade dos carrapatos utilizados no trabalho;
- ✓ Aos amigos de Viçosa, pelo companheirismo e momentos de descontração;
- ✓ À CAPES, pela bolsa para a realização deste trabalho;
- ✓ Aos meus familiares, pelo imenso apoio durante toda a minha vida, tendo a educação como prioridade em vários momentos que passamos.

BIOGRAFIA

Fernanda Sales de Araújo, nasceu em 8 de setembro de 1990 na cidade de Ponte Nova, Minas Gerais, Brasil, filha de Expedito de Araújo Filho e Maria Aparecida de Sales de Araújo.

Em 2009, ingressou no Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto. No ano de 2010 transferiu-se para o curso de Bacharelado em Bioquímica pela Universidade Federal de Viçosa cujo estágio e trabalho de conclusão de curso foram realizados no Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular, colando grau em janeiro de 2015. No mesmo ano, iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Aplicada.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. Introdução e Justificativa	1
2. Revisão Bibliográfica.....	3
2.1. Aspectos taxonômicos e morfológicos dos carrapatos	3
2.2. Importância médico-veterinária do carrapato <i>A. sculptum</i>	3
2.3. Ciclo de vida	4
2.4. Intestino de carrapatos machos e fêmeas	5
2.5. A utilização da proteômica na identificação de proteínas	8
3. Objetivos	10
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos	10
4. Materiais e métodos.....	11
4.1. Obtenção dos carrapatos.....	11
4.2. Dissecção dos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> e extração do intestino....	11
4.3. Extração e quantificação das proteínas totais do <i>pool</i> de intestinos.....	12
4.4. Separação das proteínas totais por gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e digestão enzimática	12
4.5. Análise dos peptídeos trípticos por Espectrometria de Massas.....	14
4.6. Identificação das proteínas	15
4.7. Classificação funcional das proteínas identificadas	17
5. Resultados e Discussão	18
5.1. Quantificação e separação das proteínas totais do intestino	18

.....	18
5.2. Identificação das proteínas do intestino de carrapatos pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD na estratégia IF.....	19
5.3. Identificação das proteínas do intestino de carrapatos pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD na estratégia INF	24
5.4. Comparação entre os dados obtidos pelos algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD.....	28
5.5. Análise da classificação funcional das proteínas do intestino dos carrapatos identificadas pelos algoritmos PEAKS e MASCOT	30
5.5.1 Dinâmica e estrutura da cromatina.....	32
5.5.2 Tradução, biogênese e estrutura ribossomal	32
5.5.3 Modificação pós-traducional, <i>turnover</i> proteico, chaperonas	33
5.5.4 Citoesqueleto	34
5.5.5 Conversão e produção de energia	34
5.5.6 Metabolismo e transporte de carboidratos	35
5.5.7 Metabolismo e transporte de lipídeos.....	35
5.5.8 Metabolismo e transporte de íons inorgânicos.....	36
5.6. Análise da classificação funcional das proteínas do hospedeiro vertebrado no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> identificadas pelos algoritmos PEAKS e MASCOT	37
6. Conclusão.....	39
7. Referências Bibliográficas	40
ANEXO 1	47
ANEXO 2	53
ANEXO 3	54
ANEXO 4	57
ANEXO 5	58

ANEXO 6	60
ANEXO 7	61
ANEXO 8	63
ANEXO 9	64
ANEXO 10	66
ANEXO 11	67
ANEXO 12	68
ANEXO 13	69
ANEXO 14	70
ANEXO 15	71
ANEXO 16	86
ANEXO 17	97
ANEXO 18	107

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

FMB	Febre Maculosa Brasileira
m/z	Massa/carga
ESI	Ionização Eletrospray
EI	Impacto de Elétrons
IQ	Ionização Química
MALDI	Dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz
IT	Ion Trap
TOF	<i>Time of flight</i> (tempo de voo)
Q	Quadrupolo
QTOF	Analisadores Quadrupolo e TOF “ <i>in tandem</i> ”
MS/MS	Técnica de espectrometria de massas “ <i>in tandem</i> ”, utilizando dois ou mais analisadores.
LC-MS/MS	Técnica hifenada de cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas “ <i>in tandem</i> ”.
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
LAPEM	Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular
DBB	Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
DTT	Ditiotritol
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Pressão
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
ID	Identificação
PTM	Modificação pós-traducional
ATP	Adenosina Trifosfato
mgf	<i>Mascot generic format</i>
mzXML	<i>Extensible mark-up language</i>
IF	Intestino Fracionado
INF	Intestino Não Fracionado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios ativos de vida do carrapato <i>A. cajennense</i>	5
Figura 2: Predominância bacteriana no intestino, ovário, glândulas salivares e túbulos de Malpighi.	6
Figura 3: Desenho esquemático da histologia do intestino de fêmeas de <i>A. sculptum</i>	7
Figura 4: Separação do extrato de proteínas totais do intestino dos carrapatos machos e fêmeas, em triplicatas, pela estratégia IF.	18
Figura 5: Separação do extrato de proteínas totais do intestino dos carrapatos machos e fêmeas, em triplicatas, pela estratégia INF.....	18
Figura 6: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.	20
Figura 7: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	23
Figura 8: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.....	25
Figura 9: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	27
Figura 10: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, para amostras IF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata e <i>Oryctolagus</i>	29
Figura 11: Número de proteínas identificadas no intestino dos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentado pela estratégia INF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata e <i>Oryctolagus</i>	29
Figura 12: Classificação funcional das proteínas identificadas no intestino dos carrapatos <i>A. sculptum</i> machos e fêmeas, anotadas no KOG.....	31
Figura 13: Classificação funcional das proteínas do hospedeiro identificadas no intestino dos carrapatos <i>A. sculptum</i> machos e fêmeas, anotadas no KOG.....	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	47
Tabela 2: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (<i>Uncharacterized Protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.	53
Tabela 3: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	54
Tabela 4: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (<i>Uncharacterized Protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.	57
Tabela 5: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i> , caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	58
Tabela 6: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (<i>Uncharacterized protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	60
Tabela 7: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i> , caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	61
Tabela 8: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (<i>Uncharacterized Protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	63
Tabela 9: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, com auxílio do algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	64

Tabela 10: BLASTp das proteínas INF e não caracterizadas* (<i>Uncharacterized protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.	66
Tabela 11: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	67
Tabela 12: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i> , caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	68
Tabela 13: BLASTp das proteínas INF e não caracterizadas* (<i>Uncharacterized protein</i>) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	69
Tabela 14: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i> , caracterizadas funcionalmente pelo KOG.	70
Tabela 15: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.	71
Tabela 16: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.	86
Tabela 17: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	97
Tabela 18: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de <i>A. sculptum</i> não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados <i>Oryctolagus</i>	107

RESUMO

ARAÚJO, Fernanda Sales, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2017. **Análise proteômica do intestino de carrapatos *Amblyomma sculptum* machos e fêmeas não alimentados.** Orientador: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Os carrapatos são artrópodes parasitas que se alimentam obrigatoriamente de sangue, sendo capazes de parasitar diversos hospedeiros vertebrados. O intestino dos carrapatos machos e fêmeas possui diferenças morfológicas, tendo como principal função a digestão intracelular dos componentes do sangue obtidos durante a alimentação. Este órgão possui várias proteínas relacionadas com o desenvolvimento, metabolismo e mecanismo de digestão da hemoglobina. Neste trabalho, as proteínas do intestino de carrapatos *Amblyomma sculptum*, machos e fêmeas foram analisadas com o auxílio da cromatografia líquida acoplada com a espectrometria de massas. O algoritmo PEAKS identificou um maior número de proteínas do intestino nas estratégias fracionadas e não fracionadas em relação aos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, tanto para o banco de dados Chelicerata quanto para o banco de dados *Oryctolagus*, utilizando os analisadores Ion Trap e QTOF. Pelo KOG, as classes das proteínas analisadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas que se destacaram estão envolvidas na dinâmica e estrutura da cromatina, tradução, biogênese e estrutura ribossomal, modificação pós-traducional, *turnover* proteico, chaperonas, citoesqueleto, conversão e produção de energia, metabolismo e transporte de carboidratos, lipídeos e íons inorgânicos. Na identificação das proteínas do hospedeiro, a hemoglobina, componente de maior volume no sangue, foi encontrada em ambos os sexos. As informações obtidas neste trabalho podem fornecer uma base sobre a fisiologia do intestino de machos e fêmeas *A. sculptum* e auxiliar na escolha de proteínas como alvos moleculares potenciais, visando avanço nas estratégias de controle aplicadas para estes artrópodes.

ABSTRACT

ARAÚJO, Fernanda Sales, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, February, 2017. **Proteomic analysis of midgut from the *Amblyomma sculptum* ticks unfed males and females.** Advisor: Cláudio Lísias Mafra de Siqueira.

Ticks are parasitic arthropods that feed necessarily of blood, being able of parasitizing various vertebrate hosts. The midgut of males and females ticks has morphological differences, having as main function the intracellular digestion of blood components obtained during feeding. This organ has several proteins related to the development, metabolism, and mechanism of hemoglobin digestion. In this work, the midgut proteins of *Amblyomma sculptum* ticks, males and females were analyzed with aid of liquid chromatography coupled with mass spectrometry. The PEAKS algorithm identified a larger number of proteins in fractional and non-fractionated strategies in relation to algorithms MASCOT and SCAFFOLD for both Chelicerata and *Oryctolagus* databases, using Ion Trap and QTOF analyzers. By KOG, the classes of proteins analyzed in the midgut of the males and females ticks are involved in the chromatin structure and dynamics, translation, ribosomal structure and biogenesis, post-translational modification, protein turnover and chaperones, cytoskeleton, energy production and conversion, metabolism and transport of carbohydrates, lipids and inorganic ions. In the identification of the host proteins, the hemoglobin, greater blood volume component, was found in both genders. The informations obtained in this work can provide a basis about the midgut phisiology of males and females *A. sculptum* and assist in the selection of proteins as potencial molecular targets, aiming advance in the control strategies applied to these arthropods.

1. Introdução e Justificativa

Os carrapatos são artrópodes parasitas que se alimentam obrigatoriamente de sangue, sendo pertencentes à classe Arachnida, ordem Acari, classificados em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. São capazes de parasitar diversos hospedeiros vertebrados, como bovinos, equinos, cães, capivaras e o homem, podendo ser encontrados em diferentes ecossistemas, exceto no continente Antártico (PAROLA & RAOULT, 2005).

A espécie mais comumente encontrada do sul dos Estados Unidos ao norte das áreas úmidas da Argentina (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004) é o *Amblyomma sculptum* (complexo *Amblyomma cajennense*) (NAVA *et al.*, 2014), pertencente à família Ixodidae (OLIVER, 1989). Este carrapato, também conhecido como carrapato-estrela, sendo considerado de grande importância médico-veterinária, visto seu grande potencial vetorial de agentes infecciosos, como por exemplo, a bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da Febre Maculosa Brasileira (FMB) que acomete os seres humanos. No Brasil, o carrapato-estrela encontra-se nas regiões Centro-Oeste (Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e Goiás) e Sudeste (Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Minas Gerais) podendo ser encontrado em outras localidades, cujo seu parasitismo inclui mamíferos domésticos e silvestres, aves e o homem.

O *A. sculptum* exige três hospedeiros para completar seu ciclo de vida (trioxeno) o qual é dividido em larva, ninfa e adulto. Após a oviposição da fêmea ingurgitada no solo, tem-se a eclosão das larvas, popularmente conhecidas como micuins. Estas, após um período de maturação, permanecem em aglomerados e, ao encontrarem um hospedeiro, se alimentam por um período de até 5 dias, após o qual caem ao solo, sofrendo processo de muda (ecdise), e transformando-se em ninfas. Ao encontrar um hospedeiro vertebrado, as ninfas fixam-se a este, alimentando-se por cerca de 4 a 7 dias, caindo ao solo, onde ocorre muda, tornando-se adulto macho ou fêmea. Após fixar-se a um novo hospedeiro e realizar a hematofagia, a fêmea é fecundada e cai ao solo para a oviposição, dando sequência ao ciclo (OLIVIERI & SERRA-FREIRE, 1984a; OLIVIERI & SERRA-FREIRE, 1984b).

O sistema digestório dos carrapatos está dividido em três partes: a região anterior (estomodeu); intestino médio (mesenteron) e posterior (proctodeu) (SONENSHINE, 1991). Os processos de digestão e absorção de alimento obtido ocorrem na região do intestino médio. Nesta região ocorre a digestão intracelular dos componentes do sangue obtidos dos hospedeiros e o armazenamento de grande

quantidade de alimento. Além disso, este órgão é um local para o desenvolvimento e multiplicação de diversos agentes causadores de doenças, os quais, potencialmente, poderão ser transmitidos para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo (MASUDA, 2007).

Segundo Caperucci *et al.* (2010), o intestino de carrapatos fêmeas não-alimentadas possui um epitélio pseudoestratificado constituído de dois tipos celulares: células digestivas e células indiferenciadas. As células digestivas de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas apresentam retículo endoplasmático rugoso desenvolvido e com elevada capacidade secretória.

Há necessidade de se obter um melhor entendimento sobre a biologia e as moléculas fundamentais envolvidas na fisiologia do carrapato *A. sculptum*, visando avanço nas estratégias de controle através da seleção de alvos moleculares potenciais. Com a identificação de possíveis moléculas com potencial de aplicação biotecnológica, este trabalho teve como objetivo identificar e caracterizar proteínas expressas no intestino de carrapatos machos e fêmeas.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. Aspectos taxonômicos e morfológicos dos carrapatos

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos obrigatórios, pertencentes ao filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, incluídos na classe Arachnida e ordem Ixodida, exclusivamente distribuídos em três famílias: (a) Ixodidae, cujas espécies são comumente conhecidas como carrapatos duros, apresentando escudo rígido quitinoso na superfície dorsal que cobre o corpo inteiro dos machos adultos e cerca da metade anterior do dorso das fêmeas, ninfas e larvas (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006); (b) Argasidae, cujas espécies são conhecidas como carrapatos moles por não possuírem escudo dorsal e apresentarem uma cutícula dobrada que se expande durante a alimentação; e (c) Nuttalliellidae, representada pela espécie *Nuttalliella namaqua*, encontrada na África, cujas características morfológicas são compartilhadas tanto dos carrapatos moles quanto para os duros (GUGLIELMONE *et al.*, 2010).

As espécies pertencentes à família Ixodidae realizam parasitismo em morcegos, aves domésticas, roedores e o homem. Na família Argasidae encontram-se espécies que parasitam bovinos, equinos, cães, aves, mamíferos silvestres e o homem.

No Brasil foram identificadas, até o momento, 66 espécies de carrapatos, das quais 45 estão inseridos na família Ixodidae e 21 na família Argasidae (SPONCHIADO *et al.*, 2015).

2.2. Importância médico-veterinária do carrapato *A. sculptum*

Os carrapatos da espécie *A. sculptum*, também conhecidos como carrapato-estrela, estão inseridos no complexo *A. cajennense* (constituído por *A. cajennense* s.s., *A. tonelliae* n. sp., *A. interandinum* n. sp., *A. patinoi* n. sp. e *A. mixtum*) (NAVA *et al.*, 2014) e distribuídos do sul dos Estados Unidos (Texas e Flórida) ao norte da Argentina (ESTRADA-PEÑA *et al.*, 2004). No Brasil, podem ser encontrados nas regiões Sudeste, Centro-Oeste e parte das regiões Sul e Nordeste, atuando como um dos principais vetores da bactéria *Rickettsia rickettsii*, causadora da FMB, doença potencialmente letal para humanos, considerada de grande importância médico-veterinária, sendo relatada primeiramente em 1929, quando foram diagnosticados os primeiros casos (DIAS & MARTINS, 1939). A FMB foi em outubro de 2001, incluída na Lista Nacional de Doenças de Notificação Compulsória do Ministério da Saúde, pela Portaria Nº 1.943, da Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde.

Atualmente sua ocorrência tem sido relatada, com maior frequência, nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia, Santa Catarina e recentemente no Paraná, Rio Grande do Sul, Distrito Federal, Goiás, Ceará e Mato Grosso do Sul, de acordo com informações da Secretaria de Vigilância em Saúde/MS.

O *A. sculptum* parasita uma grande variedade de vertebrados domésticos, silvestres e o homem devido a sua baixa especificidade parasitária. As infestações em bovinos, equinos, aves, ovelhas, cabras, coelhos e porcos, proporcionam perdas econômicas significativas devido à espoliação sanguínea quando em situação de elevado parasitismo, com grande probabilidade de propagação de agentes patogênicos por estes veiculados e aos altos custos e estratégias logísticas para seu controle ambiental efetivo. Segundo Teglas *et al.* (2005), as infestações em bovinos podem levar à diminuição da produção de leite, diminuição do peso, desnutrição, fome e desvalorização comercial do couro, ocasionando grande impacto nesta atividade econômica.

2.3. Ciclo de vida

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* necessitam de três hospedeiros para o desenvolvimento completo do seu ciclo de vida o qual é dividido em ovo, larva, ninfa e adulto (Figura 1). Nas condições climáticas da maioria dos estados da região Sudeste do Brasil, o estágio larval é predominante nos meses de abril a julho, com as ninfas predominando de julho a outubro (meses com temperaturas mais baixas e o ar mais seco) e os adultos de outubro a março (meses mais quentes e chuvosos) (LABRUNA *et al.*, 2003). As fêmeas adultas realizam a oviposição no solo, seguida da eclosão das larvas. Estas, ao encontrarem um hospedeiro vertebrado susceptível, se alimentam por um período de até 5 dias, após o qual, retornam ao solo sofrendo processo de muda, tornando-se ninfas. Ao encontrar um (novo) hospedeiro vertebrado, as ninfas fixam-se a este, alimentando-se por cerca de 4 a 7 dias e caindo ao solo, onde ocorre a muda, tornando-se adulto (macho ou fêmea). Após fixar-se a um novo hospedeiro e realizar a hematofagia, a fêmea é fecundada e cai ao solo, onde procura locais frescos e de alta umidade para a oviposição, dando sequência ao ciclo (OLIVIERI & SERRA-FREIRE, 1984a; OLIVIERI & SERRA-FREIRE, 1984b).

Nas fases de larva e ninfa, os carrapatos são menos exigentes em relação à especificidade parasitária, sendo hospedeiros primários do *A. sculptum*, equinos, antas e capivaras os quais possuem um habitat propício e favorável para o seu desenvolvimento nas fases de vida livre e parasitária (LABRUNA *et al.*, 2001). A predominância das larvas nas estações outono/inverno, das ninfas no inverno/primavera e dos adultos na primavera/verão é ajustada pelo processo de diapausa comportamental exibida pelas larvas, as quais esperam os meses de abril ou maio para buscarem seus hospedeiros nas extremidades das vegetações (BELOZEROV, 1982). Existem relatos de infestação por *A. sculptum* em outros animais, como aves domésticas, silvestres e répteis. No entanto, o parasitismo nestes hospedeiros não é comumente encontrado (BARROS-BATTESTI *et al.*, 2006).



Figura 1: Estágios ativos de vida do carrapato *A. cajennense*.

Fonte: http://www.tickencounter.org/tick_identification/cayenee_tick

2.4. Intestino de carrapatos machos e fêmeas

A principal função do intestino dos carrapatos é realizar a digestão intracelular dos componentes do sangue obtidos dos hospedeiros, permitindo o armazenamento de grande quantidade de alimento (BALASHOV, 1972). Além disso, este órgão é um local para o desenvolvimento e propagação de diversos agentes causadores de doenças que potencialmente poderão ser transmitidos para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo (MASUDA, 2007). Segundo Narasimhan e Fikrig (2015), alguns patógenos entram no intestino do carrapato no estágio larval durante a alimentação de um hospedeiro infectado, colonizando este órgão, como é o caso da *Enterobacter* spp., outros podem sair do intestino e infectar as glândulas salivares como nos casos de *Anaplasma phagocytophilum* e *Borrelia hermsii*, os quais podem permanecer nestes órgãos durante as fases posteriores dos estágios de vida do carrapato

(transmissão transestadial). Bactérias do gênero *Rickettsia* spp. podem ser encontradas em ovos, intestino, túbulos de Malpighi, ovários e glândulas salivares (Figura 2), as quais também são capazes de realizar transmissão transovariana, facilitando a sua passagem para as próximas gerações dos carrapatos (SONENSHINE, 1991).

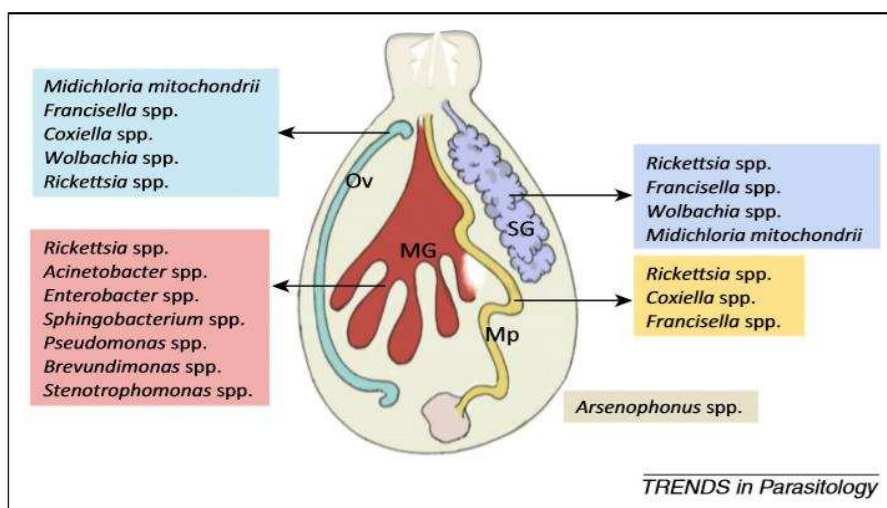


Figura 2: Predominância bacteriana no intestino (MG), ovário (Ov), glândulas salivares (SG) e túbulos de Malpighi (Mp). Fonte: Narasimhan e Fikrig (2015).

O sistema digestório está dividido em três partes: a região anterior (estomodeu), localizada na região proximal do hipostômio e conectado ao esôfago; intestino médio (mesêntero), possuindo várias dobras que permitem a total acomodação da estrutura na cavidade do carrapato e reserva de nutrientes; e posterior (proctodeu), localizado próximo ao bulbo retal e reto. O sangue ingerido durante a alimentação é encaminhado para um canal preoral por sucção e passado para o intestino através do esôfago. Por este mesmo canal, ocorre a passagem da saliva dos ductos salivares em direção à lesão provocada na pele do hospedeiro (SONENSHINE, 1991).

A parede do intestino é constituída de um epitélio, o qual representa a maior barreira física entre os carrapatos e os mecanismos de defesa dos hospedeiros, e uma camada fina de células alongadas de músculo liso. Este órgão estabelece uma importante interface hospedeiro-carrapato-patógeno, expressando proteínas que possuem envolvimento nas funções consideradas vitais para este artrópode e a invasão de patógenos ingeridos com o sangue (OLEAGA *et al.*, 2015).

Segundo Caperucci *et al.* (2010), o intestino médio de carrapatos fêmeas não alimentadas possui um epitélio pseudoestratificado que se encontra acima da fibra muscular (camada mais externa), constituído de dois tipos celulares: células digestivas e células indiferenciadas ou geradoras (Figura 3), as quais são compostas por grande quantidade de gotículas lipídicas de reserva. Os machos possuem intestino similar ao das fêmeas, apresentando, no entanto, um lúmen menor e com muito menos células presentes no estado não alimentado (SONENSHINE & ROE, 2013). As células digestivas de carrapatos *A. sculptum* secretam proteínas, visto que, uma grande quantidade de retículo endoplasmático rugoso está presente; além disso, contém endossomos com grânulos de hematina (provenientes do processo digestivo) e hemoglobina não digerida ou parcialmente digerida. Estas células são responsáveis pela absorção dos nutrientes, excreção e formação de resíduos digestivos, sendo as células indiferenciadas responsáveis pela origem das células digestivas (CAPERUCCI *et al.*, 2010).

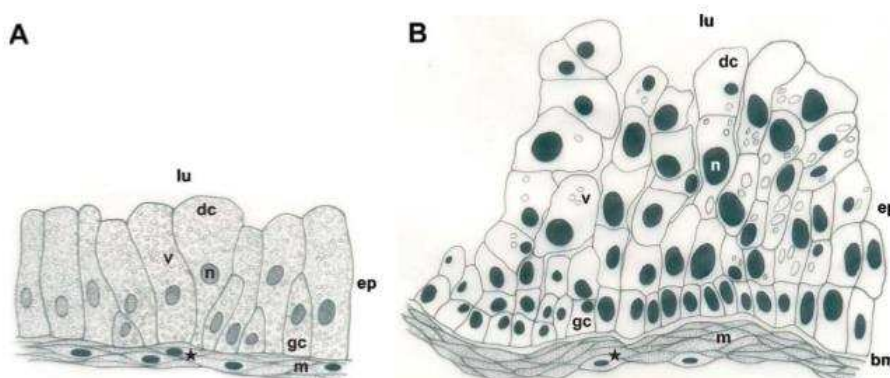


Figura 3: Desenho esquemático da histologia do intestino de fêmeas de *A. sculptum*. (A) Fêmeas não alimentadas com epitélio pseudoestratificado (ep) composto por células digestivas (dc) e células geradoras (gc) que contêm vacúolos citoplasmáticos (v). Fibra muscular (m) com vários núcleos (n). (B) Fêmeas engorgitadas com epitélio estratificado sobre a membrana basal (bm). Fonte: Caperucci *et al.*, (2010).

Segundo Caperucci (2009), outros autores consideram a existência de seis tipos de células no intestino dos carrapatos durante a vida, sendo elas: digestiva, regenerativa, secretória, endócrina, indiferenciada e vitelogênica.

Durante o estado de jejum dos carrapatos, as células epiteliais apresentam poucas organelas citoplasmáticas e possuem em sua composição principalmente grânulos de glicogênio, gotículas lipídicas e corpos residuais devido ao sangue remanescente da alimentação no estágio de ninfa (TARNOWSKI & COONS, 1989). No estágio adulto, podem permanecer até 12 meses sem se alimentarem devido a

forma gradual de absorção dos nutrientes presentes no sangue obtido dos hospedeiros, sendo de grande importância para manutenção dos processos anabólicos desse artrópode; outra característica de grande relevância é a sua capacidade de absorver e manter em seu corpo vapor de água do ar insaturado presente no ambiente, garantindo-lhes sobrevivência por um maior período de tempo (RUDOLPH, 1974).

2.5. A utilização da proteômica na identificação de proteínas

A proteômica é uma ferramenta utilizada para a separação e identificação de proteínas ou de peptídeos, permitindo também avaliação de sua localização, presença de modificações pós-traducionais, funções, quantificação e possíveis interações ou complexos que podem formar. Para estes estudos, diferentes abordagens proteômicas podem ser utilizadas, como: extração das proteínas; separação proteica por eletroforese unidimensional e bidimensional; digestão proteolítica e técnicas cromatográficas; identificação das proteínas utilizando espectrometria de massas; utilização de analisadores que possuem diferenças na capacidade de resolução, seletividade, sensibilidade, precisão e velocidade de análise; identificação das proteínas por ferramentas de bioinformática.

A espectrometria de massas é uma técnica analítica capaz de quantificar e identificar compostos e moléculas desconhecidas com o auxílio de um espectrômetro de massas constituído por uma fonte de ionização, analisador de massas e detector de íons. A fonte de ionização é responsável pela geração de íons livres em fase gasosa, podendo sofrer ou não fragmentação, os quais podem ser produzidos por ionização Eletrospray (ESI), Impacto de Elétrons (EI), Ionização Química (IQ), dessorção/ionização a laser auxiliada por matriz (MALDI), dentre outros métodos. Após a ionização, os íons percorrem uma trajetória através de um campo magnético e são separados de acordo com sua massa/carga (m/z) em um analisador de massas, tais como: quadrupolo (Q), baseado na estabilidade da m/z ; armadilha de íons (IT – *Ion Trap*) baseado na frequência de ressonância; tempo de voo (TOF – *Time of flight*), fundamentado no tempo de voo dos íons; setores elétricos e magnéticos, híbridos (QTOF) ou *in tandem* (MS/MS), cada qual possuindo vantagens e desvantagens na separação de íons (YATES *et al.*, 2009). Por fim, o detector recebe os íons e gera uma corrente elétrica, cujo sinal será amplificado e registrado, gerando os dados que podem ser analisados em diferentes algoritmos para a identificação das proteínas.

A identidade das proteínas presentes no intestino de carrapatos machos e fêmeas ainda não foi totalmente elucidada, principalmente da espécie *A. sculptum*, fazendo-se necessário o isolamento e identificação dessas moléculas para que haja um maior entendimento, o que pode propiciar o desenvolvimento de novas estratégias de controle desses artrópodes por meio de indicação de alvos moleculares (RENESTO *et al.*, 2006; RACHINSKY *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2011) e aumentar a quantidade de informações depositadas nos bancos de dados.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Identificar e caracterizar o perfil proteômico do intestino de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas não alimentados, visando uma melhor compreensão da fisiologia deste artrópode.

3.2. Objetivos específicos

- Extrair as proteínas do intestino de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas não alimentados, submetendo-as à diferentes estratégias de separação, visando a identificação por espectrometria de massas;
- Sequenciar os peptídeos trípticos das proteínas do intestino de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas, utilizando duas configurações diferentes de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS);
- Identificar as proteínas mais abundantes no intestino de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas por confronto entre a lista de peptídeos trípticos sequenciados e bancos de dados anotados no UNIPROT, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD;
- Classificar funcionalmente as proteínas identificadas no intestino de carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas, confrontando a sequência das mesmas contra um conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no banco de dados KOG;
- Avaliar as funções biológicas dos grupos de proteínas identificadas no intestino de machos e fêmeas do carrapato *A. sculptum*.

4. Materiais e métodos

4.1. Obtenção dos carrapatos

Todos os carrapatos machos e fêmeas adultos *A. sculptum* foram obtidos de colônias mantidas no Laboratório de Ixodologia, na Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por cessão do Prof. Dr. Matias Szabó. Foi utilizada uma proporção de macho para fêmea de 1:1.

No Laboratório de Parasitologia e Epidemiologia Molecular (LAPEM) do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (DBB/UFV), os carrapatos foram separados pelo sexo e mantidos em placas de Petri estéreis em um recipiente de tampa gradeada, acondicionado em uma estufa B.O.D com temperatura de 25°C, em um regime de foto-período de 16 horas de luz/ 8 horas escuro, até o momento da dissecação, conforme previamente descrito por BECHARA *et al.* (1995).

Considerando experimentos prévios realizados por este grupo de pesquisa, visando a obtenção do máximo rendimento proteico durante o processo de extração das proteínas, foram utilizados 180 carrapatos machos não alimentados (GRUPO 1) e 180 carrapatos fêmeas não alimentados (GRUPO 2).

4.2. Dissecação dos machos e fêmeas de *A. sculptum* e extração do intestino

A dissecação dos machos e fêmeas de *A. sculptum* foi realizada de acordo com ANATRIELLO *et al.* (2010). Resumidamente, os carrapatos foram dissecados com o auxílio de um microscópio estereoscópio com fonte de luz direta (*Motic SMZ-140*) no LAPEM/DBB/UFV. Cada indivíduo, depois de lavado com água ultrapura e secado, foi fixado em base de parafina estéril para a total imobilização do mesmo, sendo mantido por todo o período embebido em tampão fosfato salino (PBS – *Phosphate Buffered Saline*) 1X gelado, pH 7,4. Para a dissecação, foram utilizados bisturis estéreis descartáveis (número 11) e agulhas de acupuntura acopladas às pinças cirúrgicas para a retirada do órgão interno. Após a dissecação, os intestinos coletados foram colocados em solução de lise (Ureia 7M, Tiourea 2M, CHAPS 4% e DTT 40 mM) em *pools* de 60 para cada 100 µL de solução, sendo armazenados à – 80°C até o uso (OLEAGA-PÉREZ *et al.*, 1994; OLEAGA *et al.*, 2007).

4.3. Extração e quantificação das proteínas totais do *pool* de intestinos

A extração das proteínas totais do *pool* de intestinos foi realizada como descrito por Oleaga-Pérez *et al.* (1994). Resumidamente, o *pool* de intestinos em solução de lise armazenados à – 80°C foram descongelados e sonicados na presença de gelo (cinco pulsos de seis segundos cada, com amplitude de 70 Hz) por um sonificador. Para cada ciclo as amostras foram deixadas em repouso em banho de gelo por um minuto. Posteriormente, foram centrifugadas a 18.000 xg por 30 minutos à 4°C, obtendo-se o sobrenadante o qual foi retirado e transferido para novos tubos identificados como proteínas totais do intestino (PTIN) de carrapatos machos e fêmeas. A concentração das amostras foi aferida por meio do método de BRADFORD (1976), utilizando albumina sérica bovina para o preparo da curva padrão. As amostras de PTIN machos e fêmeas foram armazenadas à -80°C até o passo seguinte.

4.4. Separação das proteínas totais por gel de eletroforese unidimensional (SDS-PAGE) e digestão enzimática

As proteínas totais do intestino de machos e fêmeas *A. sculptum* foram separadas por duas estratégias distintas: mobilização e separação completa das proteínas em SDS-PAGE 1D (intestinos fracionados – IF), cuja separação ocorreu em toda a extensão do gel; e mobilização sem separação das proteínas em SDS-PAGE 1D (intestinos não fracionados – INF), cuja eletroforese foi paralisada após o deslocamento das amostras no gel em torno de alguns milímetros. Os géis de eletroforese monodimensionais foram preparados de acordo com Laemmli (1970), sendo o gel de empilhamento utilizado na concentração de 4% de acrilamida para uma maior migração das proteínas sob o efeito do campo elétrico. As amostras IF e INF foram preparadas em triplicatas para machos e fêmeas. A eletroforese ocorreu a 81 v por 2h20, sendo os géis lavados posteriormente com água ultrapura e colocados em um recipiente contendo solução de fixação (etanol 40%, água 50% e ácido acético 10%) deixado “*overnight*” no agitador. Posteriormente, os géis foram lavados três vezes com água ultrapura, adicionando-se Azul de Coomassie Brilhante G250, mantendo por três dias no agitador. Após esse procedimento, os géis foram novamente lavados com água e fotodigitalizados utilizando o aplicativo Image Scanner III (GE-Healthcare, Suécia).

As proteínas detectadas na estratégia IF foram cortadas em 23 frações, enquanto as proteínas na estratégia INF foram cortadas em um único pedaço. Ambas as estratégias passaram pelo processo de tripsinização com tripsina de pâncreas suíno, tratada com TPCK, referência T-6567 (Sigma Aldrich, EUA), para utilização em proteômica. A concentração utilizada de tripsina foi de 25 ng/μL e as proporções entre a enzima e as proteínas totais de 20:1 na abordagem IF e 40:1 na INF.

A digestão enzimática ocorreu de acordo com Shevchenko *et al.* (2006). Resumidamente, na primeira etapa foram adicionados 200 μL de solução de acetonitrila (ACN) 50%/Bicarbonato de Amônio (Ambic) 25 mM em cada tubo contendo as frações do gel, sendo a solução removida e descartada em seguida. Para uma segunda lavagem, foram adicionados 200 μL da mesma solução e deixada “overnight” à temperatura ambiente. Após esse procedimento, a solução de ACN 50%/Ambic 25mM foi removida e descartada e posteriormente foi realizada mais uma lavagem utilizando 200 μL da solução. Esta foi em seguida removida e descartada e adicionou-se ACN 100%, aguardando 5 minutos. A solução foi removida e descartada e em seguida foram adicionados outros 200 μL de ACN 100%, aguardando mais 5 minutos. A solução foi removida e descartada para posterior etapa de total secagem dos géis colocando os tubos na centrífuga à vácuo por aproximadamente 5 minutos. Os tubos foram inseridos abertos e cobertos com parafilme com um furo central para que os géis não saíssem durante a secagem. Posteriormente, foram adicionados 100 μL de DTT 65 mM nos tubos contendo os géis, os quais foram deixados em banho maria à 56°C por 30 minutos. Em seguida, a solução foi descartada e foram adicionados nos tubos 100 μL de iodoacetamida 200 mM, os quais foram deixados à temperatura ambiente por 30 minutos. Após esse procedimento, a solução foi removida e descartada para a etapa seguinte de lavagens dos géis. Primeiramente foram adicionados 200 μL de Ambic 100 mM, deixando reagir por 10 minutos e posteriormente descartado. Em seguida, foram adicionados 200 μL de ACN 100%, deixando reagir por 5 minutos e posteriormente descartado. Estas duas últimas etapas foram realizadas duas vezes. Na última lavagem, a ACN 100% foi removida e descartada, adicionando-se outra solução de ACN 100%, deixando reagir por 5 minutos, e em seguida, removida e descartada. Os tubos contendo os géis foram colocados na centrífuga à vácuo por 5 minutos. A tripsina foi preparada segundo o protocolo do fabricante e ativada com a adição de ACN 10%/Ambic 40 mM. Os tubos contendo os géis e a tripsina ativada foram colocados no banho maria à 37°C deixado

“overnight”. Para a recuperação dos peptídeos trípticos, a solução foi sonicada em ultrassom por 10 minutos, e em seguida, foi vortexada por 20 segundos e centrifugada por 1 minuto a 2.500 xg. O sobrenadante foi removido para um tubo limpo e mantido em gelo. No tubo que continha o gel, foram adicionados 30 µL da solução de ácido fórmico 5%/ACN 50%, vortexado por 20 segundos, centrifugado por 1 minuto a 2.500 xg, e em seguida, deixado à temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente, a solução foi sonicada por 2 minutos, vortexada por 20 segundos e centrifugada por 1 minuto a 2.500 xg. O sobrenadante foi removido e transferido para o tubo que já continha o primeiro sobrenadante retirado. A etapa da adição da solução de ácido fórmico 5%/ACN 50% foi repetida e o terceiro sobrenadante foi adicionado aos outros anteriores. Os peptídeos trípticos obtidos foram secos em centrífuga à vácuo e armazenados à -80°C até o uso posterior.

4.5. Análise dos peptídeos trípticos por Espectrometria de Massas

Os peptídeos trípticos obtidos do processo de tripsinização foram ressuspensos em 80 µL de solução aquosa contendo ácido fórmico 0,1% e centrifugados a 20.000 xg durante 20 minutos, transferindo-os a seguir para recipientes adequados. Para a aquisição dos espectros de massas, 20 µL de cada amostra foram aplicados primeiramente em equipamento LC-MS/MS, contendo UPLC nanoAcquity (Waters, EUA) e um espectrômetro de massas micrOTOF QII® - QTOF (Bruker Daltonics, Alemanha). A separação cromatográfica dos peptídeos trípticos ocorreu em uma coluna trap e uma coluna capilar Protecol C18 GHQ303 3,0 µm – 300 µm x 150 mm, com uma taxa de fluxo de 4,5 µL/min. Os peptídeos eluídos automaticamente foram injetados no espectrômetro de massas, modo *ONLINE*, com uma agulha de ionização microESI. Para o gradiente foram utilizadas as seguintes soluções de fase móvel: água e ácido fórmico 0,1% (v/v), acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v). O programa da separação teve início com um passo de dessalinização mantendo 5% de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) por 14 minutos. Posteriormente, foi realizada uma rampa de gradiente linear a partir de 5% até 50% da solução de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) durante 30 minutos e 50% por 5 minutos; de 50% a 90% ocorreu por 3 minutos e a de 90% por 2 minutos. A rampa de descida linear ocorreu a partir de 90% até 10% por 3 minutos, mantendo-se a 10% por 3 minutos. Foi realizado para a faixa de massas entre 100 e 2000 m/z o escaneamento em modo POSITIVO dos íons para os espectros de MS1. Para os

espectros de MS2, a faixa foi entre 70 e 2000 m/z. O QTOF operou no modo auto-MSn, coletando espectros MS2 para os íons que apresentaram maior intensidade em cada um dos espectros de varredura, excluindo da análise os íons que apresentaram carga simples.

Uma segunda abordagem foi realizada com o outro volume que havia restado das amostras analisadas no micrOTOF QII® - QTOF, aplicando-as em um sistema LC-MS/MS, composto por UPLC nanoAcquity (Waters, USA) e um espectrômetro de massas do tipo Amazon Ion Trap® (Bruker Daltonics, Alemanha). A separação dos peptídeos tripticos ocorreu em uma coluna trap e uma coluna capilar C18 BEH130 1,7 µm – 100 µm x 100 mm, com uma taxa de fluxo de 0,400 µL/min. Os peptídeos eluídos automaticamente foram injetados no espectrômetro de massas, modo *ONLINE*, com uma agulha de ionização nanoESI. Para o gradiente foram utilizadas as seguintes soluções de fase móvel: água e ácido fórmico 0,1% (v/v), acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v). O programa da separação teve início com um passo de dessalinização, mantendo-se 5% de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v) por 5 minutos. Posteriormente, foi realizada uma rampa de gradiente linear a partir de 5% até 50% da solução de acetonitrila e ácido fórmico 0,1% (v/v), durante 30 minutos e 50% por 5 minutos; a rampa de subida de 50% a 90% ocorreu por 5 minutos, mantendo-se a 90% por 5 minutos. A rampa de descida linear ocorreu a partir de 90% até 10% por 5 minutos, mantendo-se a 10% por 5 minutos. Foi realizado para a faixa de massas entre 300 e 1500 m/z o escaneamento em modo POSITIVO dos íons para os espectros de MS1. Para os espectros de MS2, a faixa foi entre 70 e 3000 m/z. O Ion Trap operou no modo auto-MSn, coletando espectros MS2 para os íons que apresentaram maior intensidade em cada um dos espectros de varredura, excluindo da análise os íons que apresentaram carga simples.

Os dados provenientes do QTOF e Ion Trap geraram listas de picos nos formatos *mascot generic format* (*.mgf) e *extensible mark-up language* (*.mzXML), respectivamente.

4.6. Identificação das proteínas

Para a identificação das proteínas, foram utilizados dois métodos. No primeiro, as listas de massas geradas pelos espectrômetros de massa foram convertidas para o formato *mzXML* e analisadas pelo software PEAKS, versão 7.0 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá). Para as listas obtidas do QTOF foi criado um projeto

apresentando uma nova amostra para os arquivos selecionados de machos e fêmeas, cujos parâmetros utilizados no PEAKS foram: digestão enzimática com tripsina, uma clivagem não específica e três clivagens perdidas por peptídeo, tolerância de erro da massa do íon precursor de 30 ppm, usando a massa monoisotópica e fragmento do íon de 0,02 Da. Para as modificações pós-traducionais (PTMs) foram utilizadas, como modificação fixa, a carbamidometilação da cisteína; e, como modificação variável, a oxidação da metionina, considerando um máximo de três PTMs variáveis por peptídeo. Os bancos de dados escolhidos para confrontar as listas de massas obtidas foram Chelicerata (carrapatos) e *Oryctolagus cuniculus* (coelhos raça Nova Zelândia, comumente utilizados como hospedeiro durante a alimentação em colônias para as etapas de muda do carrapato até a fase adulta). Após a obtenção do resultado da primeira análise realizou-se uma identificação *Workflow* com os mesmos parâmetros acima. Para as listas obtidas do Ion Trap foram utilizados os mesmos parâmetros, sendo as modificações realizadas para a tolerância de erro da massa do íon precursor de 0,2 Da usando a massa monoisotópica e fragmento do íon de 0,2 Da.

Para os resultados gerados, foram consideradas proteínas identificadas aquelas que apresentaram *False Discovery Rate* (FDR) menor que 1% com, pelo menos, dois peptídeos únicos e os mesmos presentes em, pelo menos, duas réplicas biológicas. Estes parâmetros foram utilizados para obtermos dados mais robustos e com maior cobertura das proteínas, as quais foram organizadas em planilhas conforme os seguintes dados: nome e identificação (ID) da proteína, sequência dos peptídeos trípticos e se estavam presentes em machos e/ou fêmeas.

No segundo método, as listas de massas geradas pelos espectrômetros de massa foram convertidas para o formato *mgf* e analisadas pelo aplicativo MASCOT, versão 2.4.0 (Matrix Science, Londres, Reino Unido). Os parâmetros e os bancos de dados utilizados foram os mesmos apresentados utilizando o PEAKS para QTOF e Ion Trap. Os resultados obtidos pelo MASCOT tiveram sua validação realizada pelo aplicativo SCAFFOLD, versão 3.6.4 (Proteome Software INc., Portland, EUA).

Pelos resultados gerados, foram validadas as proteínas que apresentaram a probabilidade de identificação de peptídeos e proteínas maior que 90%, com pelo menos dois peptídeos únicos por proteína e a presença do mesmo em pelo menos duas réplicas biológicas, para eliminar detecções de baixa confiança. O critério de validação foi atribuído pelos aplicativos Peptide Prophet e Protein Prophet (KELLER *et al.*, 2002; NESVIZHSHKII *et al.*, 2003).

Para as proteínas identificadas como não caracterizadas (*Uncharacterized protein*), foram realizados alinhamentos de sequências através do algoritmo BLASTp contra o banco de dados de proteínas depositadas no NCBI nr (www.ncbi.nlm.nih.gov).

4.7. Classificação funcional das proteínas identificadas

As proteínas identificadas na comparação com os bancos de dados Chelicerata e *Oryctolagus* foram funcionalmente classificadas usando o software RPS-BLAST (Reverse Position Specific BLAST) (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2002; SCHÄFFER *et al.*, 1999). Nessa análise, um grupo funcional foi atribuído a cada proteína cujo perfil de aminoácidos alinhou significativamente, considerando um valor de E-value $< 1E-4$, com os perfis do banco de dados *EuKaryotic Orthologous Groups* (KOG) (TATUSOV *et al.*, 2003).

5. Resultados e Discussão

5.1. Quantificação e separação das proteínas totais do intestino

A concentração das proteínas totais extraídas do intestino dos carrapatos machos e fêmeas foi aferida pelo método de BRADFORD (1976). A média da concentração proteica no *pool* de intestinos dos carrapatos *A. sculptum* machos e fêmeas foi de 7,19 µg/µL e 10,76 µg/µL, respectivamente.

O gel de eletroforese monodimensional foi escolhido para a separação das proteínas devido à quantidade de amostra disponível para aplicação e pela dificuldade na padronização da metodologia envolvendo o gel de eletroforese bidimensional.

No gel de eletroforese monodimensional (8,0 cm x 7,5 cm), cujas canaletas apresentavam 0,5 cm de largura e 1,2 cm de profundidade, foram colocadas aproximadamente 50 µg de proteínas para padronização da quantidade aplicada. Na estratégia IF as proteínas foram separadas em 23 frações por canaleta do gel (Figura 4) e na estratégia INF as proteínas apresentaram somente 1 fração (Figura 5).

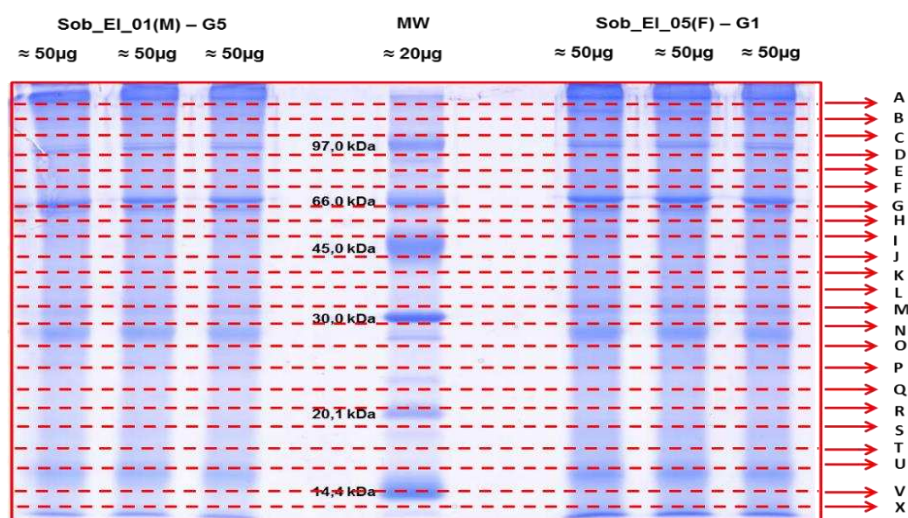


Figura 4: Separação do extrato de proteínas totais do intestino dos carrapatos machos (M) e fêmeas (F), em triplicatas, divididas em 23 frações (A a X) pela estratégia IF, coradas com azul de Coomassie Brilhante G-250.

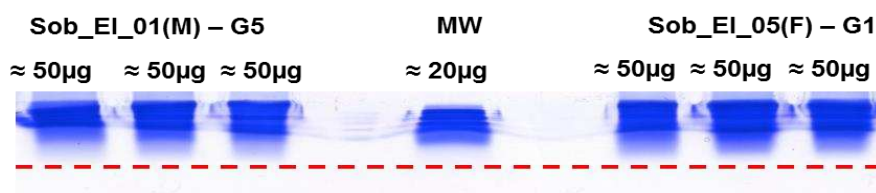


Figura 5: Separação do extrato de proteínas totais do intestino dos carrapatos machos (M) e fêmeas (F), em triplicatas, divididas em uma única fração pela estratégia INF, coradas com azul de Coomassie Brilhante G-250.

5.2. Identificação das proteínas do intestino de carrapatos pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD na estratégia IF

Para os resultados gerados, as proteínas com, pelo menos, 2 peptídeos tripticos foram selecionadas, e as sequências que estavam presentes em, pelo menos, duas réplicas biológicas foram organizadas em planilhas de acordo com as abordagens utilizadas (ANEXOS 15, 16, 17 e 18).

Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando o algoritmo PEAKS e o banco de dados Chelicerata (UNIPROT), foram identificadas 71 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, dentre as quais 42 foram encontradas em machos e fêmeas, 13 somente em machos e 16 somente em fêmeas (Figura 6A). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 21 proteínas, dentre as quais 11 foram encontradas tanto em machos, quanto em fêmeas; 4 somente em machos; e 6 somente em fêmeas (Figura 6B). Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata, foram identificadas 47 proteínas, das quais 37 foram encontradas em machos e fêmeas, 4 somente em machos e 6 somente em fêmeas (Figura 6C). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 15 proteínas, das quais 11 foram encontradas em machos e fêmeas, nenhuma somente em machos e 4 somente em fêmeas (Figura 6D).

Na comparação dos dois métodos, embora o QTOF normalmente apresente maior especificidade e resolução (HELLER *et al.*, 2003), resultando em baixas taxas de falso-positivo (FDR), o analisador Ion Trap forneceu maior número de peptídeos, indicando maior sensibilidade aos componentes presentes na amostra de intestino de carrapatos machos e fêmeas (Figuras 6E e 6F).

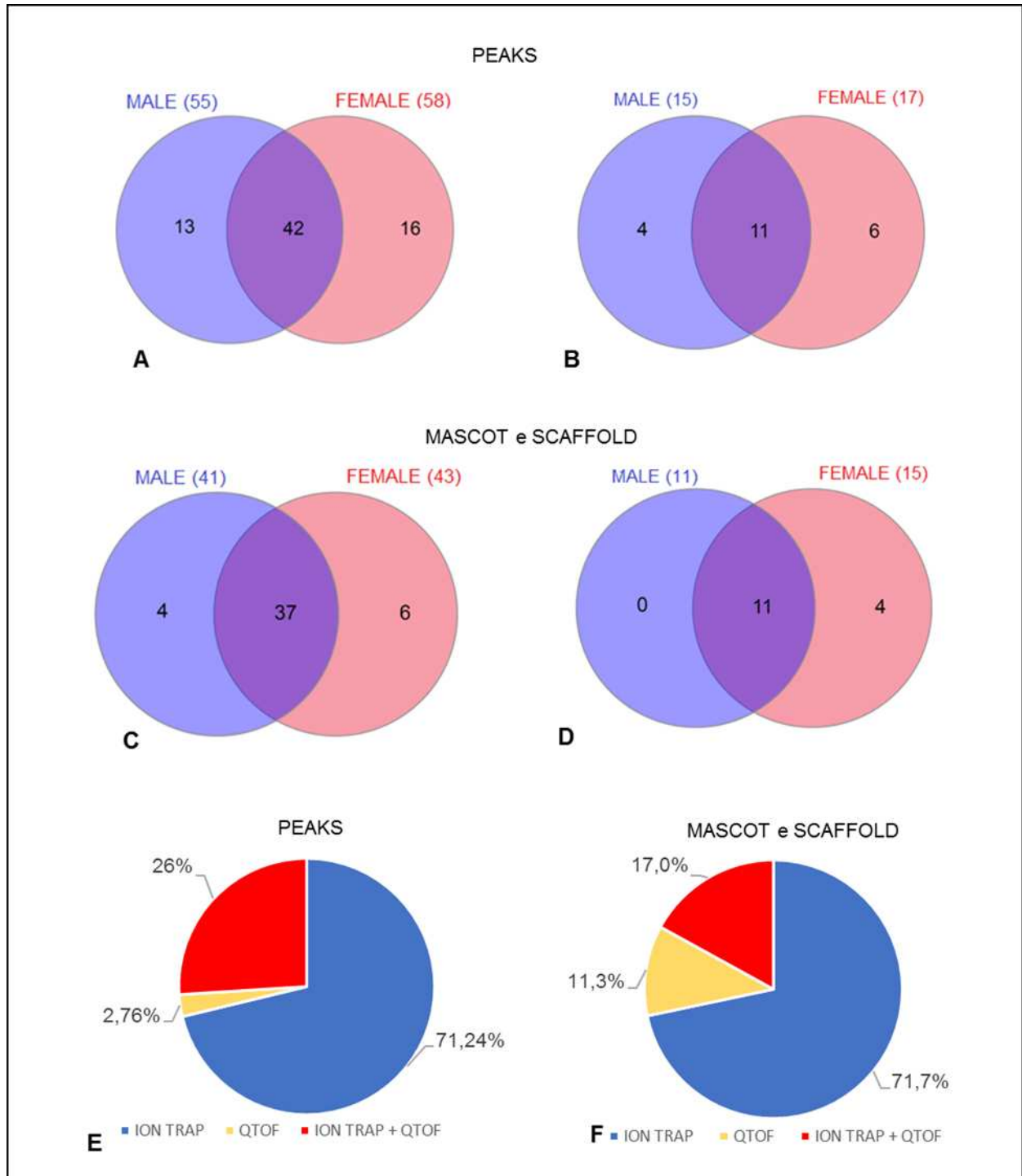


Figura 6: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (A) e QTOF (B), para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata; proteínas identificadas pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (C) e QTOF (D) para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata. Proteínas identificadas somente no Ion Trap (azul), QTOF (amarelo) e em ambos (vermelho) no PEAKS (E) e, MASCOT e SCAFFOLD (F).

Diagrama de Venn: Aplicativo InteractiviVenn (Heberle *et al.*, 2015).

As proteínas identificadas pelas abordagens Ion Trap e QTOF utilizando o algoritmo PEAKS estão inseridas nos seguintes processos: (a) modificação e processamento do RNA (ribonucleoproteínas); (b) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (c) conversão e produção de energia (ATP sintase, aldeído desidrogenase e oxidoredutase); (d) controle do ciclo celular; (e) metabolismo e transporte de aminoácidos, nucleotídeos (inosina-5-monofosfato desidrogenase), carboidratos (transcetolase, enolase e frutose bifosfato aldolase), lipídeos (vitelogenina e lipoproteínas) e íons inorgânicos (catalase, ferritina e proteínas ligadoras de cálcio); (f) tradução (ubiquitina e proteínas ribossomais) e transcrição (polimerase); (g) estrutura extracelular (nidogen); (h) modificações pós-traducionais (chaperonas, alfa cristalinas, glutathione S-transferase, proteína *heat shock*, catepsina e tioredoxina); (i) biossíntese de metabólitos secundários (desidrogenases); (j) mecanismo de transdução de sinais (GTPases), (l) tráfico intracelular (translocon); (m) citoesqueleto (actina e calponina); (n) estruturas extracelulares (adesão célula-matriz); (o) somente predição funcional geral (proteinase); e (p) proteínas NO HIT (proteínas ricas em glicina) (Tabela 1, ANEXO 1).

Proteínas não caracterizadas, “*Uncharacterized protein*”, foram identificadas realizando-se um alinhamento de sequências através do algoritmo BLASTp (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 2, ANEXO 2).

As proteínas identificadas pelas abordagens Ion Trap e QTOF utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD estão inseridas nos seguintes processos: (a) modificação e processamento do RNA (ribonucleoproteínas); (b) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (c) conversão e produção de energia (ATP sintase e aldeído desidrogenase); (d) metabolismo e transporte de carboidratos (frutose bifosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase), lipídeos (vitelogenina e proteínas ligadoras de ácido graxo) e íons inorgânicos (catalase, superóxido dismutase); (e) tradução (proteínas ribossomais) e transcrição (carbinolamina desidratase); (f) estrutura extracelular (nidogen); (g) modificações pós-traducionais (alfa cristalinas, glutathione S-transferase, proteína *heat shock*, catepsina e tioredoxina); (h) biossíntese de metabólitos secundários (desidrogenase); (i) mecanismo de transdução de sinais (GTPases); (j) tráfico intracelular; (l) citoesqueleto (actina e calponina); (m) estruturas extracelulares (nidogen); (n) somente predição funcional geral (cisteína proteinase); e (o) proteínas NO HIT (proteínas ricas em glicina) (Tabela

3, ANEXO 3). As proteínas não caracterizadas, “*Uncharacterized protein*”, foram identificadas e agrupadas na Tabela 4, ANEXO 4.

Além das proteínas identificadas pelo banco de dados Chelicerata, foram analisadas proteínas obtidas decorrente da alimentação dos carrapatos em coelhos *Oryctolagus cuniculus* (Coelhos Nova Zelândia) através do banco de dados *Oryctolagus*.

Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando o algoritmo PEAKS e o banco de dados *Oryctolagus* (UNIPROT), foram identificadas 28 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, das quais 18 foram encontradas em machos e fêmeas, 2 somente em machos e 8 somente em fêmeas (Figura 7A). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 13 proteínas, dentre as quais 4 foram encontradas em machos e fêmeas, 5 somente em machos e 4 somente em fêmeas (Figura 7B). Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, foram identificadas 23 proteínas, das quais 18 foram encontradas em machos e fêmeas, 2 somente em machos e 3 somente em fêmeas (Figura 7C). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 11 proteínas, das quais 10 foram encontradas em machos e fêmeas, 1 somente em machos e nenhuma exclusiva para as fêmeas (Figura 7D). O número de proteínas identificadas somente pelo Ion Trap foi maior, demonstrando sua maior sensibilidade ao método utilizado (Figuras 7E e 7F).

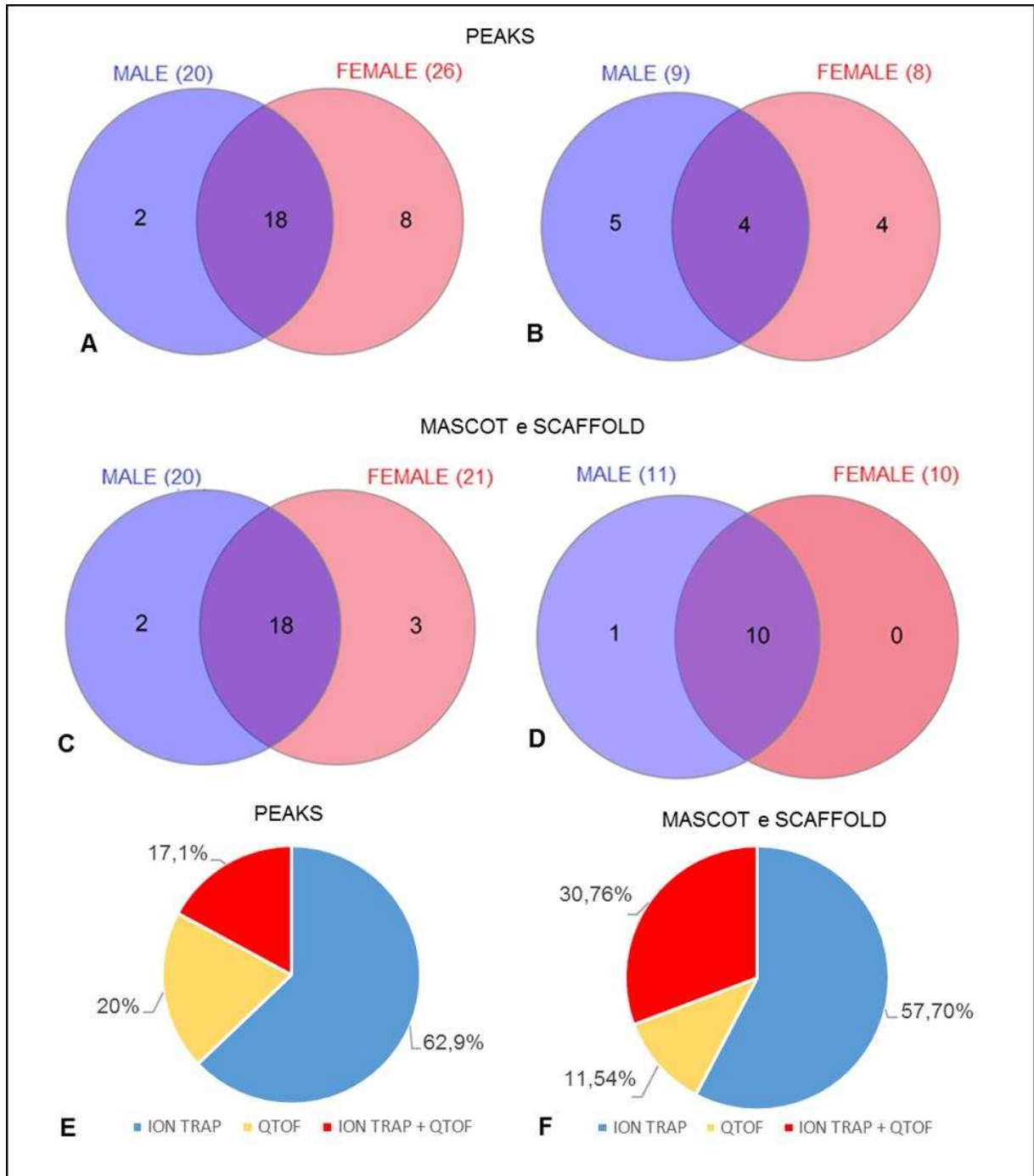


Figura 7: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (A) e QTOF (B), para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*; proteínas identificadas pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (C) e QTOF (D) para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*. Proteínas identificadas somente no Ion Trap (azul), QTOF (amarelo) e em ambos (vermelho), no PEAKS (E) e, MASCOT e SCAFFOLD (F). Diagrama de Venn: Aplicativo InteractiviVenn (Heberle *et al.*, 2015).

As proteínas identificadas pelo algoritmo PEAKS contra o banco de dados *Oryctolagus* nas abordagens Ion Trap e QTOF estão envolvidas nos seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (b) conversão e produção de energia (alfa globina e malato desidrogenase); (c) controle do ciclo celular; (d) metabolismo e transporte de aminoácidos (haptoglobina) e carboidratos (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); (e) tradução (ubiquitina); (f) modificações pós-traducionais; (g) mecanismo de defesa (alfa-1-antiproteínase); (h) citoesqueleto (beta actina); e (i) proteínas NO HIT (hemoglobina) (Tabela 5, ANEXO 5). As proteínas dos coelhos não caracterizadas (*Uncharacterized protein*) foram identificadas e agrupadas na Tabela 6, ANEXO 6.

As proteínas identificadas pelos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*, nas abordagens Ion Trap e QTOF, estão relacionadas com os seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (b) conversão e produção de energia (malato desidrogenase, alfa-hemoglobina e ATP sintase); (c) controle do ciclo celular; (d) metabolismo e transporte de aminoácidos (haptoglobina) e carboidratos (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase); (e) modificações pós-traducionais; (f) citoesqueleto (actina); e (g) proteínas NO HIT (hemoglobina) (Tabela 7, Anexo 7). As proteínas dos coelhos não caracterizadas (*Uncharacterized protein*) foram identificadas e agrupadas na Tabela 8, ANEXO 8.

5.3. Identificação das proteínas do intestino de carrapatos pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap e QTOF utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD na estratégia INF

Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando o algoritmo PEAKS e o banco de dados Chelicerata (UNIPROT) para as amostras não fracionadas, foram identificadas 20 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, das quais 15 estavam presentes em machos e fêmeas, 3 somente em machos e 2 somente em fêmeas (Figura 8A). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 7 proteínas, dentre as quais 2 foram encontradas em machos e fêmeas, nenhuma proteína exclusiva em machos e 5 somente em fêmeas (Figura 8B). Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata (UNIPROT) para as amostras não fracionadas, foram identificadas 12 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, das quais 4 estavam presentes em machos e fêmeas, 4 somente em machos e 4 somente em fêmeas (Figura 8C). Na abordagem LC-MS/MS

QTOF foram identificadas 4 proteínas, dentre as quais 3 foram encontradas em machos e fêmeas, nenhuma proteína exclusiva em machos e 1 somente em fêmeas (Figura 8D). Observamos que o número de proteínas identificadas somente pelo Ion Trap foi maior do que pelo QTOF, demonstrando sua maior sensibilidade ao método utilizado (Figuras 8E e 8F).

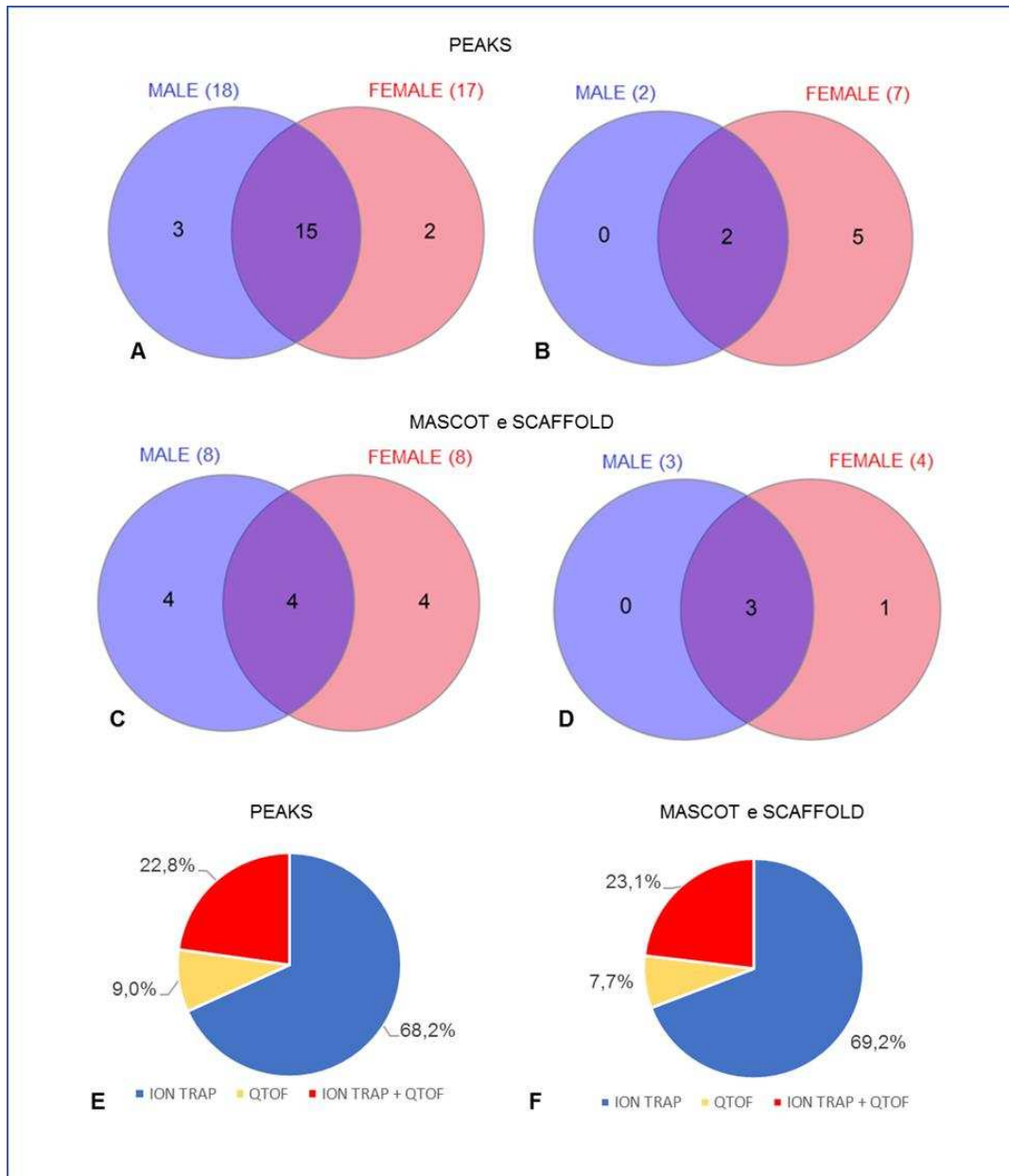


Figura 8: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (A) e QTOF (B), para amostras INF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata; proteínas identificadas nas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (C) e QTOF (D) para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata. Proteínas identificadas somente no Ion Trap (azul), QTOF (amarelo) e em ambos (vermelho), no PEAKS (E) e, MASCOT e SCAFFOLD (F). Diagrama de Venn: Aplicativo InteractiviVenn (Heberle *et al.*, 2015).

As proteínas identificadas utilizando o algoritmo PEAKS nas abordagens Ion Trap e QTOF das amostras não fracionadas estão inseridas nos seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (b) conversão e produção de energia (aldeído desidrogenase e ATP sintase); (c) metabolismo e transporte de nucleotídeos (inosina-5-monofosfato desidrogenase), carboidratos (enolase), lipídeos (vitelogenina) e íons inorgânicos (catalase); (d) tradução e modificações pós-traducionais; (e) somente predição funcional geral; e (f) proteínas NO HIT (proteínas ricas em glicina) (Tabela 9, ANEXO 9). As proteínas não caracterizadas (*Uncharacterized protein*), foram identificadas e agrupadas na Tabela 10, ANEXO 10.

As proteínas identificadas utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD nas abordagens Ion Trap e QTOF das amostras não fracionadas estão relacionadas com os seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); (b) conversão e produção de energia (aldeído desidrogenase, ATP sintase e formiltetrahidrofolato desidrogenase); (c) metabolismo de carboidratos (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase), lipídeos (vitelogenina) e íons inorgânicos (catalase); (d) citoesqueleto (actina); e (e) proteínas NO HIT (proteínas ricas em glicina) (Tabela 11, ANEXO 11).

Nesta estratégia, as proteínas pertencentes ao hospedeiro *Oryctolagus cuniculus* obtidas pelos carrapatos quando da alimentação também foram analisadas através do banco de dados *Oryctolagus*. Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando o algoritmo PEAKS, foram identificadas 9 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, das quais 7 foram encontradas em machos e fêmeas, nenhuma proteína exclusiva em machos e 2 somente em fêmeas (Figura 9A). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 5 proteínas, dentre as quais 4 foram encontradas em machos e fêmeas, nenhuma exclusiva em machos e 1 somente em fêmeas (Figura 9B). Na abordagem LC-MS/MS Ion Trap utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus* para as amostras não fracionadas, foram identificadas 5 proteínas extraídas do intestino dos carrapatos, das quais 4 estavam presentes em machos e fêmeas, 1 somente em machos e nenhuma proteína exclusiva em fêmeas (Figura 9C). Na abordagem LC-MS/MS QTOF foram identificadas 7 proteínas, todas tanto em machos, quanto em fêmeas (Figura 9D). Utilizando o algoritmo PEAKS, 45% das proteínas foram identificadas somente pelo Ion Trap. Com o auxílio dos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD identificamos 71,4%

das proteínas cujas sequências de peptídeos foram detectadas pelo Ion Trap e QTOF (Figuras 9E e 9F).

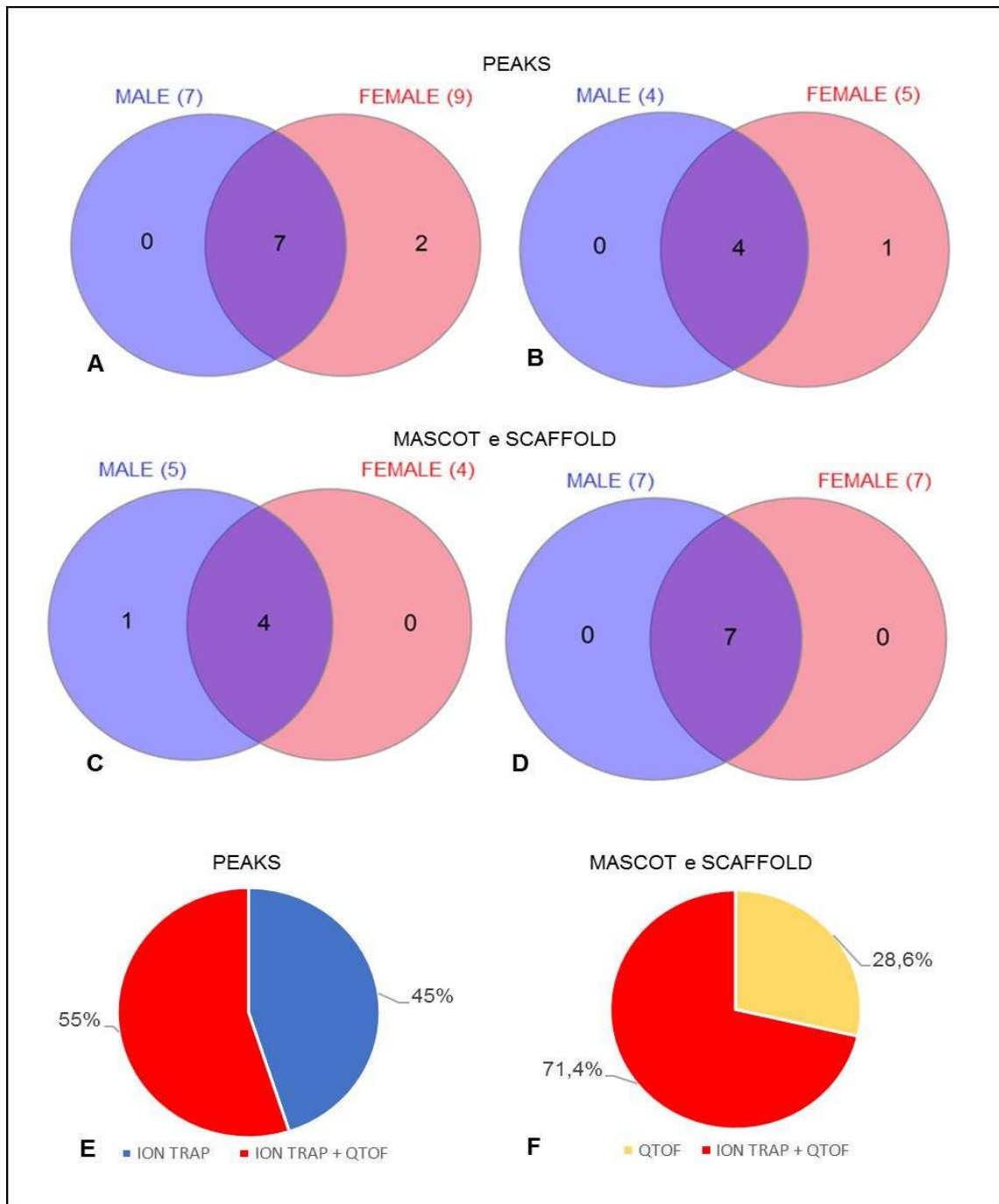


Figura 9: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (A) e QTOF (B), para amostras INF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*; proteínas identificadas pelas abordagens LC-MS/MS Ion Trap (C) e QTOF (D) para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*. Proteínas identificadas somente no Ion Trap (azul), QTOF (amarelo) e em ambos (vermelho), no PEAKS (E) e, MASCOT e SCAFFOLD (F).

Diagrama de Venn: Aplicativo InteractiviVenn (Heberle *et al.*, 2015).

Observamos que as proteínas identificadas nas amostras não fracionadas pelo PEAKS contra o banco de dados *Oryctolagus*, nas abordagens Ion Trap e QTOF, estão inseridas na dinâmica e estrutura da cromatina (histonas); produção e conversão de energia (alfa globina e ATP sintase); modificações pós-traducionais; e proteínas NO HIT (hemoglobina) (Tabela 12, ANEXO 12). As proteínas não caracterizadas dos carrapatos (*Uncharacterized protein*), foram identificadas e agrupadas na Tabela 13, ANEXO 13.

As proteínas identificadas nas amostras não fracionadas pelos algoritmos MASCOT/SCAFFOLD contra o banco de dados *Oryctolagus*, nas abordagens Ion Trap e QTOF, estão relacionadas com a dinâmica e estrutura da cromatina (histona); conversão e produção de energia (alfa hemoglobina e ATP sintase); citoesqueleto (actina); e proteínas NO HIT (hemoglobina) (Tabela 14, ANEXO 14).

5.4. Comparação entre os dados obtidos pelos algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD

A utilização dos algoritmos PEAKS e MASCOT para a identificação das proteínas nas abordagens QTOF e Ion Trap das amostras de intestino de carrapatos machos e fêmeas *A. sculptum* IF e INF forneceu-nos um repertório envolvendo a presença de diversas proteínas em determinado sexo.

Com o auxílio do algoritmo PEAKS, uma maior quantidade de proteínas foi identificada, com o ajuste da curva do falso positivo (FDR) menor que 1%, possibilitando maior acurácia e sensibilidade do método em relação ao MASCOT, o qual permite identificar o mesmo espectro de massas de um peptídeo em diferentes proteínas, gerando maior FDR. Na validação do resultado do MASCOT pelo SCAFFOLD, um menor número de proteínas foi identificado, demonstrando menor sensibilidade.

O algoritmo PEAKS, com a utilização do PEAKS *Database Search* (DB), pode identificar significativamente e com alta taxa de confiança, maior número de proteínas com PTMs do que o MASCOT (ZHANG *et al.*, 2012). A limitação do MASCOT na pesquisa baseada na massa do peptídeo com PTMs, resultou na diminuição de sua sensibilidade e no número de peptídeos identificados em nossas análises. Conclui-se que o PEAKS apresentou maior sensibilidade e abrangência do proteoma do intestino dos carrapatos *A. sculptum*, para um mesmo nível de confiabilidade probabilística (Figura 10).

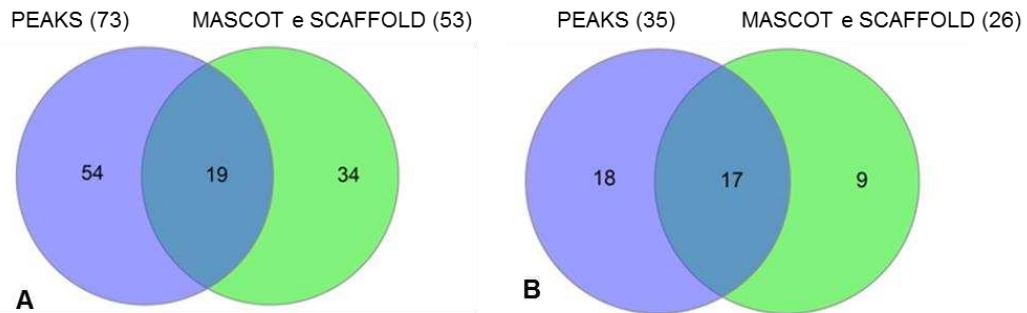


Figura 10: Número de proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pela estratégia IF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata (A) e *Oryctolagus* (B).

A utilização da estratégia INF, cuja total separação das proteínas no gel não foi realizada, apresentou menor número de proteínas identificadas (Figura 11) devido à grande complexidade da amostra, a qual excede a capacidade analítica do espectrômetro de massas, tornando-se um grande desafio a identificação das proteínas de baixa abundância (MALMSTROM *et al.*, 2007). Além disso, a reprodutibilidade entre o conjunto de dados obtidos das réplicas biológicas INF foi baixa, cujos requisitos estabelecidos envolviam a presença de dois peptídeos identificados em pelo menos duas réplicas. O aparecimento de uma determinada proteína em machos e fêmeas na estratégia IF, sendo a mesma encontrada somente em machos ou fêmeas na estratégia INF, corrobora com a necessidade da utilização de um método de separação das amostras para diminuir a complexidade e possíveis erros de instrumentação.

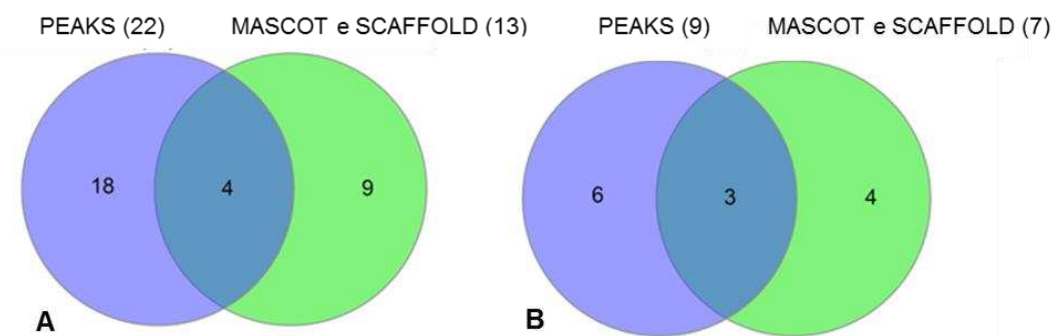


Figura 11: Número de proteínas identificadas no intestino dos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentado pela estratégia INF, utilizando os algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata (A) e *Oryctolagus* (B).

5.5. Análise da classificação funcional das proteínas do intestino dos carrapatos identificadas pelos algoritmos PEAKS e MASCOT

As proteínas identificadas no intestino de machos e fêmeas *A. sculptum* foram agrupadas e classificadas funcionalmente confrontando a sequência das mesmas contra um conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no banco de dados KOG. Em machos as classes predominantes foram: (a) dinâmica e estrutura da cromatina; (b) tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (c) modificações pós-traducionais; (d) citoesqueleto; (e) conversão e produção de energia; (f) metabolismo e transporte de carboidratos, lipídeos e íons inorgânicos; (g) somente predição funcional geral; e (h) NO HIT. Nas fêmeas predominaram as classes relacionadas com os seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina; (b) tradução, estrutura ribossomal e biogênese; (c) modificações pós-traducionais; (d) citoesqueleto; (e) conversão e produção de energia; (f) metabolismo e transporte de carboidratos, lipídeos e íons inorgânicos; (g) somente predição funcional geral; e (h) NO HIT (Figura 12).

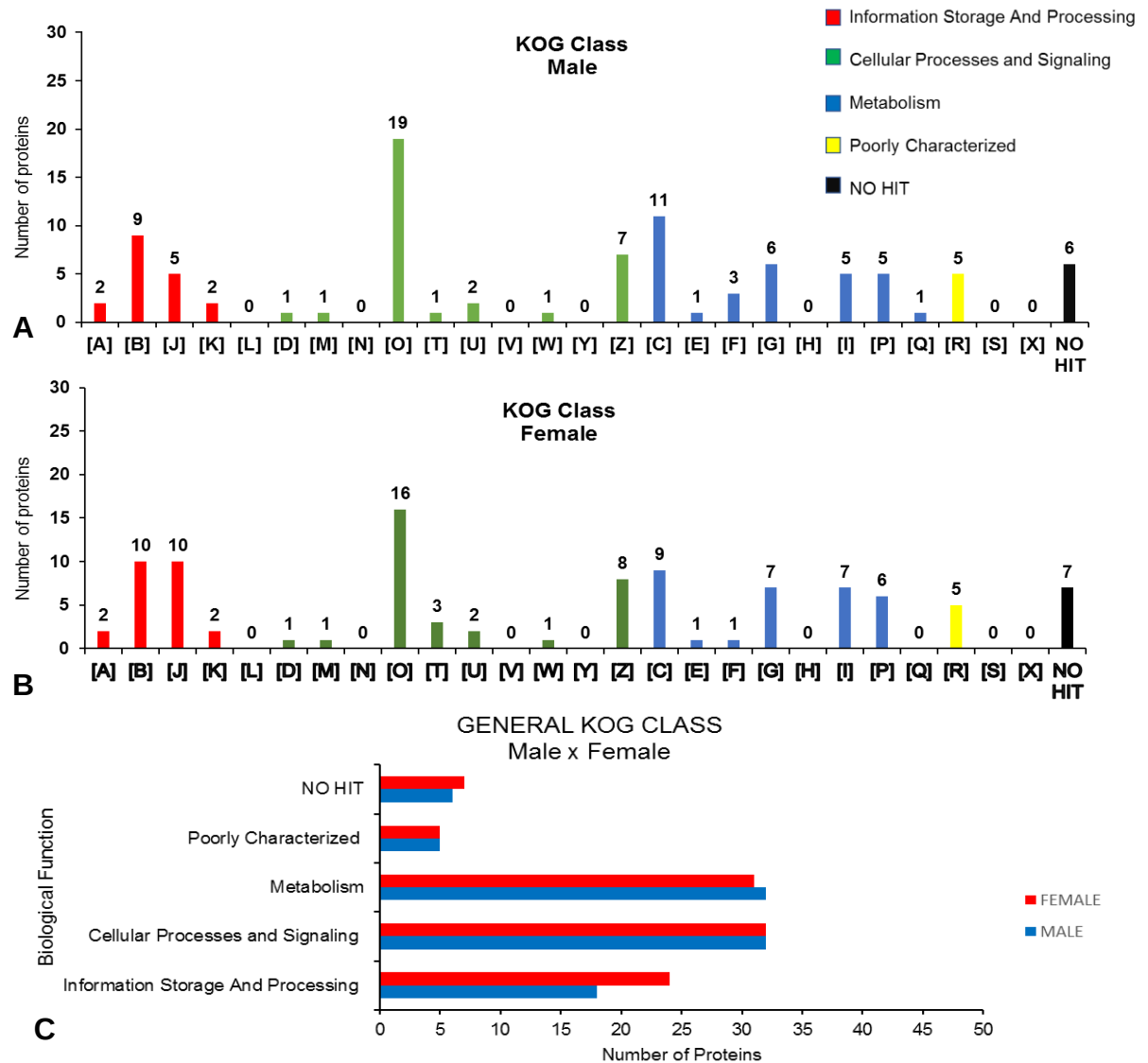


Figura 12: Classificação funcional das proteínas identificadas no intestino dos carrapatos *A. sculptum* machos (A) e fêmeas (B), anotadas no KOG. Funções biológicas gerais do KOG (C). Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho): [A] Modificação e processamento do RNA; [B] Dinâmica e estrutura da cromatina; [J] Tradução, estrutura ribossomal e biogênese; [K] Transcrição e [L] Replicação, recombinação e reparo. Sinalização e Processo Celular (verde): [D] Controle do ciclo celular, divisão celular, partição do cromossomo; [M] Parede celular/Membrana/Biogênese do envelope; [N] Motilidade Celular; [O] Modificação pós-traducional, proteína *turnover*, chaperonas; [T] Mecanismo de transdução de sinal; [U] Tráfego intracelular, secreção e transporte vesicular; [V] Mecanismo de defesa; [W] Estrutura extracelular; [Y] Estrutura nuclear e [Z] Citoesqueleto. Metabolismo (azul): [C] Conversão e produção de energia; [E] Metabolismo e transporte de aminoácidos; [F] Metabolismo e transporte de nucleotídeos; [G] Metabolismo e transporte de carboidratos; [H] Metabolismo e transporte de coenzimas; [I] Metabolismo e transporte de lipídeos; [P] Metabolismo e transporte de íons inorgânicos e [Q] Biossíntese de metabólitos secundários, transporte e catabolismo. Pobremente caracterizadas (amarelo): [R] Somente predição geral funcional; [S] Função desconhecida; [X] Proteína não nomeada; e NO HIT (preto).

5.5.1 Dinâmica e estrutura da cromatina

A presença de proteínas envolvidas na dinâmica e estrutura da cromatina, identificadas no intestino, tanto em carrapatos machos, quanto em carrapatos fêmeas *A. sculptum*, indica a participação destas nos processos que envolvem o material genético, tais como: replicação, reparo, recombinação e transcrição.

Segundo Morales *et al.* (2001), as proteínas deste grupo também são necessárias nos processos envolvendo a acomodação do DNA no núcleo e proteção de sua estrutura e sequência. Os mecanismos relacionados à dinâmica da cromatina são complexos, cujas modificações pós-traducionais em histonas além de regular a transcrição do gene, permitem que haja iniciação dos processos de regeneração e o remodelamento das células do intestino de machos e fêmeas, os quais são importantes para a manutenção deste órgão, visto o desgaste gerado pela alimentação no estágio ninfal (NARASIMHAN *et al.*, 2014).

5.5.2 Tradução, biogênese e estrutura ribossomal

A identificação de várias ribonucleoproteínas e proteínas ribossomais no intestino de carrapatos *A. sculptum* fêmeas não alimentados, aponta para uma alta atividade da maquinaria de síntese proteica, as quais seriam utilizadas ou estocadas para a execução dos diversos processos considerados vitais aos carrapatos, garantindo-lhes eficiência na continuidade do seu desenvolvimento e de outras células indispensáveis ao intestino, assegurando a execução dos processos metabólicos durante a restrição alimentar.

O papel que o intestino exerce nestes artrópodes, cujas funções biológicas estão relacionadas desde o crescimento celular, metabolismo e mecanismo de digestão da hemoglobina durante a alimentação, justifica a presença das proteínas desta classe associadas à maquinaria proteica, em ambos os sexos (ANDERSON *et al.*, 2008). De acordo com Rachinsky *et al.* (2008), várias proteínas ribossomais de carrapatos podem estar envolvidas na resposta ao estresse celular, além de fornecer componentes estruturais dos ribossomos.

O estoque de proteínas em carrapatos machos e fêmeas é de grande importância devido ao longo período de tempo que estes artrópodes passam sem se alimentarem, cujos aminoácidos serão utilizados durante a diapausa. A diferença morfológica do intestino também contribui para o número de organelas presentes neste órgão, cujas fêmeas possuem grande quantidade de grânulos proteicos e

células digestivas que contém ribossomos e polirribossomos, características que corroboram com o número de proteínas identificadas nesta classe, em comparação com os machos (SONENSHINE & ROE, 2013).

5.5.3 Modificação pós-traducional, *turnover* proteico, chaperonas

A presença de chaperonas no intestino de carrapatos machos e fêmeas está diretamente ligada à estrutura tridimensional das proteínas através do processo de enovelamento assistido, indicando a necessidade de manutenção e estabilidade das proteínas utilizadas em vários processos, para evitar e reverter o enovelamento incorreto, agregação e consequentemente perda de função durante condições adversas (diapausa) e favoráveis (alimentação). Segundo Ramos *et al.* (2008), proteínas recém-sintetizadas necessitam de uma maquinaria de chaperonas para alcançarem seus estados nativos (mais estáveis) eficientemente. Portanto, a sua presença no intestino pode estar relacionada com a necessidade de enovelamento de novas proteínas sintetizadas, corroborando com as diversas proteínas ribossomais encontradas, responsáveis pela síntese proteica.

As proteínas envolvidas no *turnover* no intestino de machos e fêmeas, estão ligadas à renovação e degradação proteica para a regulação das reações enzimáticas e fornecimento de aminoácidos às células. Este processo é importante para a manutenção de energia durante o estado não alimentado e controle das proteínas degradadas ou enoveladas incorretamente, indicando um ponto de regulação para as proteínas sintetizadas neste órgão. De acordo com Cabral *et al.* (2012), o *turnover* proteico também auxilia no reestabelecimento das proteínas desnaturadas, não sendo um processo exclusivo para proteínas recém-sintetizadas.

Embora as proteínas glutathione S-transferase, glutathione peroxidase, alfa cristalina, *heat shock 70 kDa*, tioredoxina e catepsina estejam presentes nesta classe no alinhamento realizado pelo KOG, estas também estão inseridas nos processos de estresse oxidativo, detoxificação e oxidase relacionada à atividade antimicrobiana durante a aquisição de sangue pela alimentação no estágio de ninfa. Estas proteínas são capazes de detoxificar toxinas endógenas, prevenir e reparar danos causados pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) geradas a partir da degradação da hemoglobina. O grupo prostético Heme liberado é potencialmente tóxico na sua forma livre devido à sua ligação em macromoléculas, o qual pode desestabilizar membranas celulares (CHOU & FITCH, 1981; SHINAR & RACHMILEWITZ, 1990); modular a

síntese proteica e controlar outros processos como desenvolvimento celular, transdução de sinais e apoptose (YE & ZHANG, 2004); e degradar lipídeos e moléculas de DNA (TAPPEL, 1955; AFT & MUELLER, 1983); sendo extremamente necessária a sua rápida detoxificação para a sobrevivência dos carrapatos.

As proteínas encontradas nesta classe também foram identificadas no intestino de outras espécies de carrapatos como descrito por Oleaga *et al.* (2015) em um trabalho realizado com argasídeos fêmeas não alimentadas e ingurgitadas da espécie *Ornithodoros erraticus*; Kongsuwan *et al.* (2009) com as proteínas encontradas no intestino de carrapatos fêmeas parcialmente ingurgitadas da espécie *Rhiphicephalus (Boophilus) microplus*, o que reforça sua importância no estresse oxidativo.

5.5.4 Citoesqueleto

As proteínas desta classe estão envolvidas na adesão célula-célula, expansão e contração periódica da fina camada externa de células musculares lisas, dos epitélios digestivo e indiferenciado que recobrem a parede do intestino (SONENSHINE & ROE, 2013). A calponina, identificada em nossas análises, está envolvida na regulação de íons cálcio dependente da interação entre os filamentos miosina-actina e consequentemente, na contração do músculo liso (ABE *et al.*, 1990; KANG, 1996).

As proteínas identificadas associadas com o citoesqueleto, incluindo as actinas, sugerem que há uma preparação do órgão para o recebimento de alimento que será ingerido durante a fase adulta dos carrapatos.

5.5.5 Conversão e produção de energia

A conversão e produção de energia são fundamentais para a realização dos processos considerados vitais para os eucariotos.

A presença das proteínas desta classe, em ambos os sexos, indica a necessidade de conversão e produção energética para dar continuidade às reações enzimáticas e processos biológicos durante a restrição alimentar. A identificação da enzima multimérica ATP sintase, pelos algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, confirma a produção de energia em machos e fêmeas *A. sculptum*, diante da restrição alimentar. Segundo Martinez-Cruz *et al.* (2012), estas proteínas são capazes de responder às mudanças no metabolismo, para a manutenção da homeostase celular dos carrapatos.

Outras proteínas, como a putative formiltetrahidrofolato desidrogenase, estão relacionadas com a transferência de elétrons pela família das desidrogenases, à aceptores NAD^+ , NADP^+ e FAD, requeridos na síntese de ATP, cuja informação corrobora com a condição de estresse alimentar os quais foram submetidos. Além disso, a putative aldeído desidrogenase, encontrada em ambos os sexos, também pode estar envolvida na desintoxificação dos aldeídos, subprodutos tóxicos resultantes da peroxidação dos lipídeos para produção de energia (ANDERSON *et al.*, 2008), sugerindo que há produção de energia a partir de outras vias e moléculas.

5.5.6 Metabolismo e transporte de carboidratos

A presença de enzimas no intestino de carrapatos machos e fêmeas envolvidas na glicólise, tais como enolase (catalisa a reação de 2-fosfoglicerato para fosfoenolpiruvato) e frutose bifosfato aldolase (catalisa a clivagem de frutose 1,6 bifosfato para formação de dihidroxiacetona e gliceraldeído 3-fosfato), intensificam a necessidade de degradação da molécula de glicose para gerar produtos energéticos, como o ATP, cujo controle deste é de suma importância para os carrapatos durante o longo período sem alimentação. A ocorrência da enzima transcetolase (presente na via das pentoses fosfato para a transferência de dois carbonos de uma cetose para uma aldose) evidencia a utilização de uma via alternativa (etapa não oxidativa) para a geração de intermediários da via glicolítica a partir da reciclagem das pentoses fosfato sintetizadas anteriormente, enquanto não havia restrição da alimentação.

Nas células digestivas do intestino, são encontrados grânulos de carboidratos e lipídeos assimilados a partir da alimentação de sangue dos hospedeiros (SONENSHINE & ROE, 2013), cujos processos relacionados ao metabolismo geram produtos que serão utilizados para suprirem a demanda energética, mantendo ativas as vias consideradas vitais ao organismo (MORAES *et al.*, 2012), justificando a identificação de diversas enzimas envolvidas na glicólise em reposta à necessidade energética durante a não alimentação.

5.5.7 Metabolismo e transporte de lipídeos

A presença de apoproteínas e lipoproteínas, identificadas no intestino de machos e fêmeas, indica uma via intracelular para a detoxificação e geração de energia através da fosforilação oxidativa (LUDWIG *et al.*, 2001), a partir da ligação e transporte do grupo heme adquirido no intestino, direcionando-o para a hemolinfa e outros tecidos dos carrapatos (HAJDUSEK *et al.*, 2016).

Em nossas análises, a vitelogenina (descrita como uma lipoproteína) foi identificada tanto em carrapatos fêmeas quanto em machos. Referente a este resultado, tem-se que os carrapatos ixodídeos não possuem todas as enzimas necessárias para uma via funcional de síntese do grupo heme, o qual é adquirido através da digestão do sangue obtido dos hospedeiros para posterior utilização em vários processos (PERNER *et al.*, 2016). A vitelogenina, considerada proteína de armazenamento, se liga ao grupo Heme, obtido a partir da degradação da hemoglobina, transferido-o para hemolinfa, processo que previne o estresse oxidativo e a ocorrência de lesão tecidual no intestino de machos e fêmeas. Esta proteína, também pode estocar o grupo Heme para posterior utilização nos processos de vitelogênese e desenvolvimento dos oócitos nas fêmeas (SONENSHINE & ROE, 2013). A vitelogenina é sintetizada principalmente no corpo gorduroso (CHINZEI & YANO, 1985), entretanto, o intestino serve como sítio de síntese secundária (COONS *et al.*, 1986), o que reforça o seu aparecimento tanto em fêmeas, quanto em machos, nas abordagens utilizadas.

A presença de proteínas lisossomais ácidas e enzimas hidrolíticas identificadas no intestino de carrapatos machos e fêmeas, indicam a formação de estruturas especializadas na digestão intracelular do sangue, obtido no estágio de ninfa. Dentro das células digestivas do intestino, o alimento é incorporado pelas pequenas vesículas endocíticas que posteriormente fusionam-se para formar um endossomo. Os lisossomos, compostos por várias enzimas hidrolíticas e proteínas ácidas, tais como a fosfatase ácida lisossomal, fusionam com os endossomos formando o vacúolo digestivo (GOUGH & KEMP, 1995), o qual possui importante papel proteolítico na gradual digestão intracelular do sangue.

As proteínas identificadas e classificadas funcionalmente pelo KOG para o metabolismo e transporte de lipídeos, possuem diversas aplicações de grande importância no processo digestivo, além de direcionar o movimento de colesterol, fosfolipídeos e ácidos graxos livres dentro e fora ou entre as células (TIRLONI *et al.*, 2015).

5.5.8 Metabolismo e transporte de íons inorgânicos

Dentre as proteínas que identificamos com o auxílio dos algoritmos PEAKS, MASCOT e SCAFFOLD, verificamos elevado número daquelas relacionadas com o metabolismo e transporte de íons inorgânicos. Dentre elas, temos a presença da

ferritina, a qual é requerida como um reservatório de armazenamento, transporte e proteção contra danos oxidativos e sobrecarga de íons ferro (componente do grupo heme e da transferrina), indispensável como doador e aceitor de elétrons em vários processos metabólicos, transporte de oxigênio e síntese de DNA (GALAY et al., 2013). No entanto, o ferro também participa de reações que originam produtos tóxicos, como os radicais livres e as espécies reativas de oxigênio (ROS), que causam danos às proteínas, lipídeos e DNA, os quais precisam ser regulados (HAJDUSEK et al., 2009). A enzima superóxido dismutase (SOD), também identificada no intestino de machos e fêmeas, participa desta regulação e tem um importante papel na resposta ao estresse oxidativo, a qual converte os radicais superóxido em moléculas de oxigênio (ANDERSON et al., 2008).

O peróxido de hidrogênio sozinho (H_2O_2) é pouco reativo, possui baixa atividade oxidativa e está inserido no grupo das ROS, entretanto, sua habilidade de reagir com o ferro provavelmente torna-o mais nocivo através da formação de radicais hidroxila altamente reativos (HALLIWEEL & GUTERRIDGE, 1999). De acordo com Citelli et al. (2007), a presença da catalase no intestino de carrapatos *R. (B.) microplus* indica a atividade de degradação de H_2O_2 em H_2O e O_2 , a qual possui importante papel na regulação e controle do balanço redox, o que afeta a formação e estabilidade dos hemossomos (vesículas digestivas de agregação do grupo heme).

O número de proteínas que identificamos em fêmeas em comparação com os machos, relacionadas com o metabolismo e transporte de íons inorgânicos, pode indicar que possivelmente durante o estágio ninfal dos carrapatos, os quais alimentaram-se de sangue, há uma preparação para o posterior estágio de desenvolvimento da fêmea, com esta começando o processo de ingurgitamento e, consequente, aumento do acúmulo de ferro na fase adulta (GARCIA et al., 2014).

5.6. Análise da classificação funcional das proteínas do hospedeiro vertebrado no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* identificadas pelos algoritmos PEAKS e MASCOT

As proteínas do hospedeiro vertebrado identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* foram agrupadas e classificadas funcionalmente pelo KOG. Em machos, as classes predominantes foram: (a) dinâmica e estrutura da cromatina; (b) conversão e produção de energia; e (c) NO HIT (proteínas que não apresentaram alinhamento com as sequências anotadas no KOG). Nas fêmeas,

predominaram as classes relacionadas com os seguintes processos: (a) dinâmica e estrutura da cromatina; (b) conversão e produção de energia; além daquelas (c) NO HIT (Figura 13).

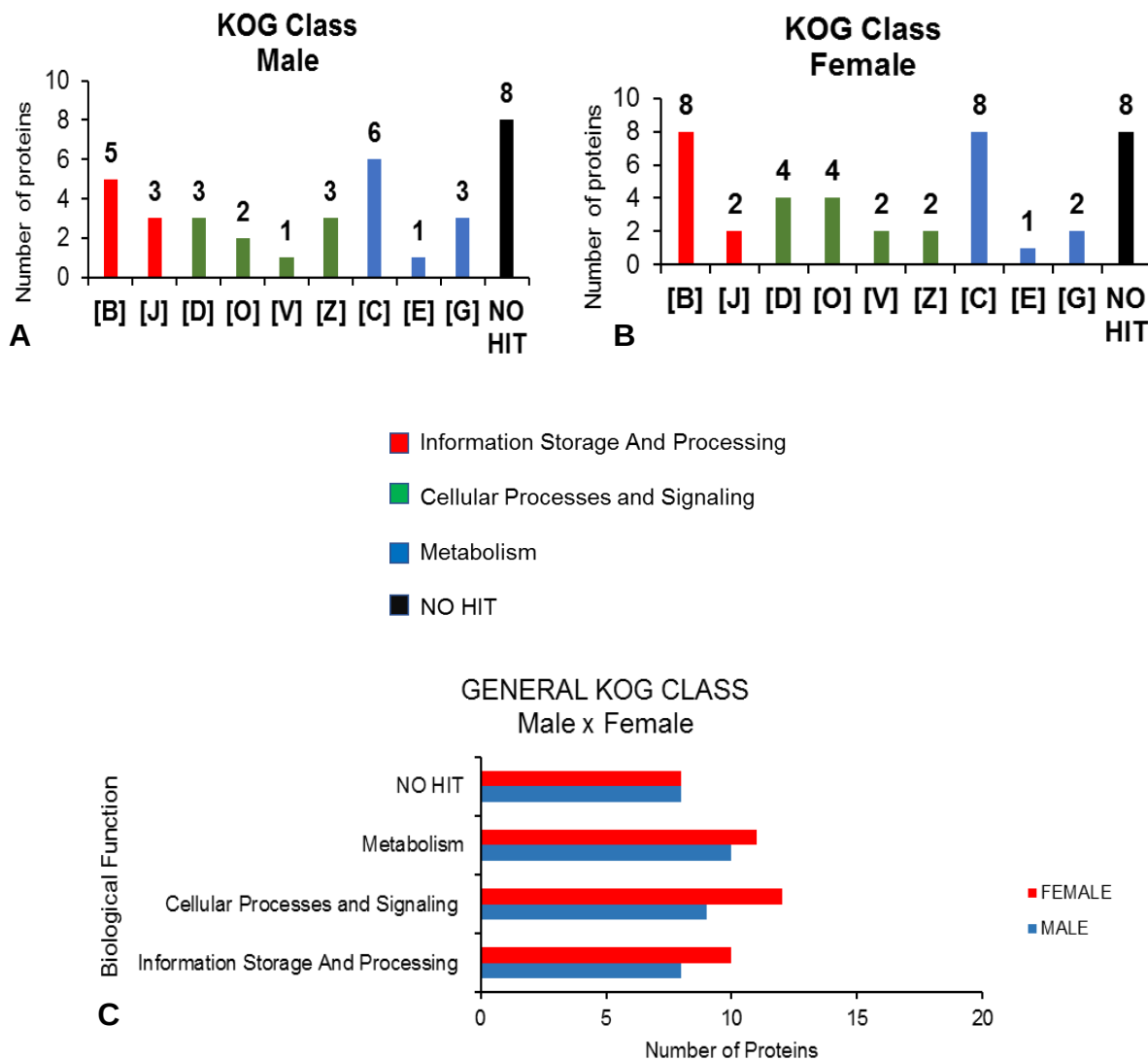


Figura 13: Classificação funcional das proteínas do hospedeiro identificadas no intestino dos carrapatos *A. sculptum* machos (A) e fêmeas (B), anotadas no KOG. Funções biológicas gerais do KOG (C). Armazenamento de Informação e Processamento (vermelho): [B] Dinâmica e estrutura da cromatina; e [J] Tradução, estrutura ribossomal e biogênese. Sinalização e Processo Celular (verde): [D] Controle do ciclo celular, divisão celular, partição do cromossomo; [O] Modificação pós-traducional, proteína turnover, chaperonas; [V] Mecanismo de defesa; e [Z] Citoesqueleto. Metabolismo (azul): [C] Conversão e produção de energia; [E] Metabolismo e transporte de aminoácidos; e [G] Metabolismo e transporte de carboidratos; e NO HIT (preto).

O padrão de distribuição das proteínas dos hospedeiros foi homogêneo no intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum*, sendo sua maioria componentes estruturais da hemoglobina, albumina, imunoglobulinas, inibidores de proteinase, transferrina e queratina. Esta última, presente nas partes bucais dos carrapatos, pode ter alcançado o intestino durante a coleta e dissecação, mesmo com a limpeza de cada indivíduo realizada previamente ao processo de dissecação destes artrópodes.

6. Conclusão

Este estudo nos permitiu identificar as proteínas presentes no intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, utilizando-se diferentes abordagens proteômicas desde a separação das amostras, até os algoritmos de identificação.

A identificação pelo algoritmo PEAKS permitiu um trabalho descritivo, evidenciando a presença das proteínas em machos e fêmeas, sendo possível também realizar uma comparação entre os equipamentos de espectrometria de massas utilizados, quais sejam os analisadores, Ion Trap e QTOF.

Foi possível verificar que a complexidade da amostra e a sua não separação na estratégia não fracionada limitou a identificação das proteínas, cujo número de proteínas obtidas foi bem inferior em relação ao adquirido na estratégia fracionada.

A utilização do algoritmo MASCOT para identificação, e do SCAFFOLD para a validação das proteínas, complementaram os dados adquiridos pelo algoritmo PEAKS. Embora os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD tenham identificado um menor número de proteínas, ambos permitiram um maior grau de confiabilidade ao utilizarmos parâmetros restritivos quando da avaliação das sequências de peptídeos.

Observamos que as proteínas identificadas estão distribuídas em diferentes classes funcionais, conforme classificadas pelo KOG, as quais também foram reportadas em estudos realizados com outras espécies de carrapatos.

Em suma, este trabalho contribuiu para um melhor entendimento sobre a biologia e as moléculas fundamentais envolvidas na fisiologia dos carrapatos *A. sculptum* não alimentados, fornecendo uma base qualitativa para a escolha de diversas proteínas como alvos moleculares, visando avanço nas estratégias de controle destes artrópodes.

7. Referências Bibliográficas

- ABE, M., TAKAHASHI, K., HIWADA, K. 1990. Effect of calponin on actin-activated myosin ATPase activity. *J. Biochem.*, 108:835–838.
- AFT, R.L., MUELLER, G.C. 1983. Hemin-mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.*, 258:2069-2072.
- ANATRIELLO, E., RIBEIRO, J.M.C., MIRANDA-SANTOS, I.K.F., BRANDÃO, L.G., ANDERSON, J.M., VALENZUELA, J.G., MARUYAMA, S.R., SILVA, J.S., FERREIRA, B.R. 2010. An insight into the sialotranscriptome of the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. *BMC Genomics*, 11(450):1-17.
- ANDERSON, J.F., MAGNARELLI, L.A. 2008. Biology of ticks. *Infect. Dis. Clin. North. Am.*, 22: 195-215.
- ANDERSON, J.M., SONENSHINE, D.E., VALENZUELA, J.G. 2008. Exploring the mialome of ticks: an annotated catalogue of midgut transcripts from the hard tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). *BMC Genomics* 9:552.
- BALASHOV, YU. S. 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea): Vectors of disease of man and animals. CSIRO Translation 500, Medical Zoology Department, United States Naval Medical Research Unit Number Three, Cairo, Egypt. *Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America* 8: 159-376.
- BARROS-BATTESTI, D.M., ARZUA, M., BECHARA, G.H. 2006. Carrapatos de importância médico-veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 223 p.
- BECHARA, G.H., SZABÓ, M.P.J., FERREIRA, B.R., GARCIA, M.V. 1995. *Rhipicephalus sanguineus* tick in Brazil: feeding and reproductive aspects under laboratorial conditions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 4(2):61-66.
- BELOZEROV, V. N. 1982. Diapause and biological rhythms in ticks, In: OBENCHAIN, F. D.; GALUN, R. Physiology of ticks. New York: Pergamon, p. 469- 500.
- BERGMAN, J. 1999. ATP: The Perfect Energy Currency for the Cell. Vol. 36, No. 1 of the Creation Research Society Quarterly.
- BRADFORD, M.M. 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.
- CABRAL, C. H. A., ALMEIDA, D. M., MARTINS, L. S., & MENDES, R. K. V. 2012. Mecanismos Fisiológicos e Bioquímicos Envolvidos no Turnover Protéico:

- Deposição e Degradação de Proteína Muscular. *Enciclopédia Biosfera*, 8(15), 1185–1203.
- CAPERUCCI, D., CAMARGO MATHIAS, M. I., & BECHARA, G. H. 2009. Histopathology and ultrastructure features of the midgut of adult females of the tick *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in various feeding stages and submitted to three infestations. *Ultrast. Pathology*, 33(6), 249–59.
- CAPERUCCI, D., BECHARA, G.H., CAMARGO, M. M.I. 2010. Ultrastructure features of the midgut of the female adult *Amblyomma cajennense* ticks Fabricius, 1787 (Acari: Ixodidae) in several feeding stages and subjected to three infestations. *Micron*, v. 41, n. 7, p. 710-721.
- CHINZEI, Y., YANO, I. 1985. Vitellin Is the Nutrient Reserve During Starvation in the Nymphal Stage of a Tick. *Experientia*. 41: 948-950.
- CHOU, A.C., FITCH, C.D. 1981. Mechanism of hemolysis induced by ferriprotoporphyrin IX. *J. Clin. Invest.*, 68:672-677
- CITELLI, M., LARA, F. A., da SILVA VAZ, I., Jr. and OLIVEIRA, P. L. 2007. Oxidative stress impairs heme detoxification in the midgut of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 151(1): 81-8.
- COONS, L.B., ROSELL-DAVIS, R., and TARNOWSKI, B.I. 1986. Blood meal digestion in ticks. In J.R. Sauer and J.A. Hair (Eds.), *Morphology, Physiology and Behavioral Biology of Ticks*. Chichester, UK: Ellis Horwood, 248–279.
- DIAS E., MARTINS, A.V. 1939. Spotted fever in Brazil. A summary. *Am J Trop Med.*;19(1):103–8.
- ESTRADA-PEÑA, A., GUGLIELMONE, A., MANGOLD, A. J. 2004. The distribution and ecological “preferences” of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae), an ectoparasite of humans and other mammals in the Americas. *Annals of Tropic Medicine and Parasitology*, v.98, p. 183-292.
- GALAY, R. L., AUNG, K. M., UMEMIYA-SHIRAFUJI, R., MAEDA, H., MATSUO, T., KAWAGUCHI, H., et al. 2013. Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*. *The Journal of Experimental Biology*, 216 (Pt 10), 1905–1915.
- GARCIA, G. R., GARDINASSI, L. G., RIBEIRO, J. M., ANATRIELLO, E., FERREIRA, B. R., MOREIRA, H. N. S., et al. 2014. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. *Parasites & Vectors*, 7, 430.

- GE Healthcare. Handbooks. 2-D electrophoresis: Principles and Methods. 2004.162p.
- GOUGH, J. M., & KEMP, D. H. 1995. Acid phosphatase in midgut digestive cells in partially fed females of the cattle tick *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.*, 81(3), 341–349.
- GUGLIELMONE, A. A., ROBBINS, R. G., APANASKEVICH, D. A., PETNEY, T. N., ESTRADA-PEÑA, A., HORAK, I. G., SHAO, R., BARKER, S. C. 2010. Zootaxa, The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa* 2528, 1–28.
- 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.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, J.M.C. 1999. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford Science Publications, Oxford University Press;
- 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.
- KANG, H.M. 1996. Structure-Function Relations of Smooth Muscle Calponin. *Journal of Biological Chemistry*, 271(15), 8605–8611.
- KELLER, A., NESVIZHSHKII, A.I., 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.
- KONGSUWAN, K., JOSH, P., ZHU, Y., PEARSON, R., GOUGH, J., & COLGRAVE, M. L. (2010). Exploring the midgut proteome of partially fed female cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*). *Journal of Insect Physiology*, 56(2), 212–226.
- LABRUNA, M.B., KERBER, C.E., FERREIRA, F., FACCINI, J.L.H., DE WAAL, D.T., GENNARI, S.M. 2001. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.*,97(1):1-14.

- LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. 2003. Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in southeast Brazil. *J. of Med Ent.* v. 40, n. 2, p. 170-178.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227:680-685
- LUDWIG, B., BENDER, E., ARNOLD, S., HÜTTEMAN, M., LEE, I., KADENBACH, B. 2001. Cytochrome c Oxidase and regulation of oxidative phosphorylation. *Chem. Biochem.*, 2:392-403.
- MALMSTROM, J.; LEE, H.; AEBERSOLD, R. 2007. Advances in proteomic workflows for systems biology. *Curr. Opin. Biotechnol*, 18(4), 378–84.
- MARCELINO, I., DE ALMEIDA, A. M., VENTOSA, M., PRUNEAU, L., MEYER, D. F., MARTINEZ, D., LEFRANÇOIS, T., VACHIÉRY, N., COELHO, A. V. 2012. Tick-borne diseases in cattle: Applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J. of Prot.*, 75(14), 4232–4250.
- MARCHLER-BAUER, A., LU S., ANDERSON, J.B., CHITSAZ, F., DERBYSHIRE, M.K., DEWEESE-SCOTT C, et al. 2011. CDD: a conversed Domain Database for the functional annotation of proteins. *Nucleic Acids Res.*, 39: D225-9.
- MARTINEZ-CRUZ, O.; SANCHEZ-PAZ, J.A., GARCIA-CARREÑO, F.L., JIMENEZ-GUTIERREZ, L.R., NAVARRETE DEL TORO, M.A. AND MUHLIA-ALMAZAN, A. 2012. Invertebrates Mitochondrial Function and Energetic Challenges. En: Bioenergetics. Capítulo 8. Clark, K. (ed). INTECH, Rijeka, Croacia. ISBN: 979-953-307-383-4.
- MASUDA, A. 2007. Modulação da resposta imune do hospedeiro pelos carrapatos. Modulation of the host Immune system by ticks, 35 (August), 285–294.
- MORAES, J., CAMPOS, E., LOGULLO, C. 2012. Metabolismo Energético durante a Embriogênese do Carrapato Bovino *Rhipicephalus microplus*. Tópicos Avançados em Entomologia Molecular. INCT-EM. Capítulo 3. p 1-25.
- MORALES, V., GIAMARCHI, C., CHAILLEUX, C., MORO, F., MARSAUD, V., LE RICOUSSE, S., & RICHARD-FOY, H. 2001. Chromatin structure and dynamics: functional implications. *Biochimie*, 83(11-12), 1029–39.
- NAHNSEN, S., BIELOW, C., REINERT, K., & KOHLBACHER, O. 2013. Tools for label-free peptide quantification. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 12(3), 549–56.

- NARASIMHAN, S., FIKRIG, E. 2015. Tick microbiome: The force within. *Trends in Parasitology*, 31(7), 315–323.
- NARASIMHAN, S., RAJEEVAN, N., LIU, L., ZHAO, Y. O., HEISIG, J., PAN, EPPLER-EPSTEIN, R., DEPONTE, K., FISH, D., FIKRIG, E. 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host and Microbe*, 15(1), 58–71.
- NAVA, S., BEATI, L., LABRUNA, M.B., CÁCERES, A.G., MANGOLD, A.J. and GUGLIELMONE, A.A. 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.
- NESVIZHSHKII, A.I., KELLER, A., KOLKER, E., AEBERSOLD, R. 2003. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 75: 4646–4658.
- OLEAGA, A., OBOLO-MVOULOUGA, P., MANZANO-ROMÁN, R., & PÉREZ-SÁNCHEZ, R. 2015. Midgut proteome of an argasid tick, *Ornithodoros erraticus*: a comparison between unfed and engorged females. *Parasites & Vectors*, 8(525), 1–16.
- 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.
- OLIVER, Jr J.H. 1989. Biology and systematics of ticks (Acari: Ixodida). *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 20:397-430.
- OLIVIERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M.S. (1984a). Estádio larval do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v.7, n.2, p.139-147.

- OLIVIERI, J.A.; SERRA-FREIRE, N.M.S. (1984b). Estádio ninfal do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. *Arquivos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro*, v.7, n.2, p.149-148.
- PAROLA, P; PADDOCK, C.D.; RAOULT, D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the World: Emerging diseases challenging old concepts. *Clin. Microbiol. Rev.*, 18(4):719-756.
- PERNER, J., SOBOTKA, R., SIMA, R., KONVICKOVA, J., SOJKA, D., OLIVEIRA, P.L., HAJDUSEK, O., KOPACEK, P. 2016. Acquisition of exogenous haem is essential for tick reproduction. *eLIFE*, 5:e12318.
- RACHINSKY, A., GUERRERO, F.D., SCOLES, G.A. 2008. Proteomic profiling of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* midgut responses to infection with *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, 152:294-313.
- RAMOS, P., MATIAS, A., & MARQUES, A. 2008. Chaperonas Moleculares- Os mestres do origami. *Chem. Bio. Chem.*, 9(18).
- RENESTO, P., SAMSON, L., OGATA, H., AZZA, S., FOURQUET, P., GORVEL, J.P., HEINZEN, R.A., RAOULT, D. 2006. Identification of two putative rickettsial adhesins by proteomic analysis. *Res. Microbiol.*, 157:605-612.
- RIBEIRO, J.M.C., ANDERSON, J.M., MANOUKIS, N.C., MENG, Z., FRANCISCHETTI, I.M.B. 2011. A further insight into the sialome of the tropical bont tick, *Amblyomma variegatum*. *BMC Genomics*, 12(136):1-11.
- RUDOLPH, D., KNULLE, W. 1974 Site and mechanism of water vapour uptake from the atmosphere in ixodid ticks. *Nature*, London, v. 249, n. 5452, p. 84 –85.
- SCHÄFFER, A.A., WOLF, Y.I., PONTING, C.P., KOONIN, E.V., ARAVIND, L., ALTSCHUL, S.F. 1999. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLASTconstructed position-specific score matrices. *Bioinformatics*, 15(12):1000-1011.
- SHEVCHENKO, A., TOMAS, H., HAVLIS, J., OLSEN, J.V., MANN, M. 2006. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6)2856-2860.
- SHINAR, E., RACHMILEWITZ, E.A. 1990. Oxidative denaturation of red-blood-cells in thalassemia. *Semin. Hematol.*, 27:70-82.
- SONENSHINE, D.E. 1991. 1 st ed. Biology of ticks, vol 1. Oxford University Press, New York.

- SONENSHINE, D.E., ROE, R.M. 2013. Biology of ticks – 2nd edition. Oxford University Press, NY, USA. 540p.
- SPONCHIADO, J., MELO, G.L., MARTINS, T.F., KRAWCZAK, F.S., LABRUNA, M.B., CÁCERES, N.C. 2015. Association patterns of ticks (Acari: Ixodida: Ixodidae, Argasidae) of small mammals in Cerrado fragments, western Brazil. *Experimental and Applied Acarology*; 65(3):389-401.
- TAPPEL A.L. 1955. Unsaturated lipide oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.*, 217:721-733. 29.
- TARNOWSKI, B. I. AND COONS, L. B. (1989). Ultrastructure of the midgut and blood meal digestion in the adult tick *Dermacentor variabilis*. *Exp. Appl. Acarol.* 6, 263-289.
- TATUSOV, R.L., FEDOROVA, N.D., JACKSON, J.D., JACOBS, A.R., KIRYUTIN, B., KOONIN, E.V., KRYLOV, D.M., MAZUMDER, R., MEKHEDOV, S.L., NIKOLSKAYA, A.N., RAO, B.S., SMIRNOV, S., SVERDLOV, A.V., VASUDEVAN, S., WOLF, Y.I., YIN, J.J., NATALE, D.A. 2003. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, 4:1-14.
- TEGLAS, M., MATERN, E., LEIN, S., FOLEY, P., MAHAN, S. M., & FOLEY, J. 2005. *Ticks and tick-borne disease in Guatemalan cattle and horses*. *Vet. Parasitol.*, 131, 119-127.
- TIRLONI, L., ISLAM, M.S., KIM, T.K., DIEDRICH, J.K., YATES, III J.R., PINTO, A.F.M., MULENGA, A., YOU, M.J., VAZ, Jr I.S. 2015. Saliva from nymph and adult females of *Haemaphysalis longicornis*: a proteomic study. *Parasites & Vectors*, 8(338):1-23.
- TUTAR, L., TUTAR, Y. 2010. Heat shock proteins; an overview. *Current Pharmaceutical Biotechnology*; 11(2):216–222.
- ZHANG, J., XIN, L., SHAN, B., CHEN, W., XIE, M., YUEN, D., MA, B. 2012. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. *Molecular & Cellular Proteomics*, 11(4).
- YATES, III J.R., RUSE, C.I., NAKORCHEVSKY, A. 2009. Proteomics by mass spectrometry: Approaches, advances, and applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, 11:49-79.
- YE, W., ZHANG, L. 2004. Heme controls the expression of cell cycle regulators and cell growth in HeLa cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 315:546-554.

ANEXO 1

Tabela 1: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	Ion Trap	QTOF
RNA processing and modification [A]								
A0A023FJS1	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG4205	9	12	Ion Trap	
Chromatin structure and dynamics [B]								
A0A023FTG4	Histone H4 (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG3467	39	4	Ion Trap	QTOF
A0A023FUB7	Histone H2A OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1756	37	4	Ion Trap	
T1K5R4	Histone H2B OS=Tetranychus urticae PE=3 SV=1	Female	Male	KOG1744	33	5	Ion Trap	
Energy production and conversion [C]								
A0A023FV99	Putative quinone oxidoreductase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1		Male	KOG1197	14	6	Ion Trap	
A0A023FKR0	ATP synthase subunit alpha OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG3320	10	4	Ion Trap	
G3MHD3	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Stegodyphus mimosarum GN=X975_27194 PE=3 SV=1		Male	KOG1350	4	2		QTOF
G3MHD3	ATP synthase subunit beta OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1350	32	12	Ion Trap	
A0A023FZV7	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2453	9	4	Ion Trap	
A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2450	39	10	Ion Trap	QTOF
A0A023FDX7	Putative cytochrome b5 ixodes scapularis cytochrome b5 ixodes pacificus cytochrome b5 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0537	30	3	Ion Trap	

TABLE 1 (CONTINUED)**Cell cycle control: cell division: chromosome partitioning: Nuclear structure [D]**

L7M562	Putative lamin OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0977	9	5	Ion Trap
--------	--	--------	------	---------	---	---	----------

Amino acid transport and metabolism [E]

G3MRF2	Putative uncharacterized protein OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1*	Female	Male	KOG3627	12	3	Ion Trap
--------	---	--------	------	---------	----	---	----------

Nucleotide transport and metabolism [F]

A0A023GNL8	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1		Male	KOG2555	9	3	Ion Trap
------------	---	--	------	---------	---	---	----------

A0A023FMG7	Putative phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG2835	6	2	Ion Trap
------------	--	--	------	---------	---	---	----------

A0A023FWM4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2550	11	5	Ion Trap
------------	---	--------	------	---------	----	---	----------

Carbohydrate transport and metabolism [G]

A0A023GK13	Putative enolase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1		Male	KOG2670	13	4	Ion Trap
------------	--	--	------	---------	----	---	----------

A0A023FWM8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female		KOG0657	42	10	Ion Trap
------------	---	--------	--	---------	----	----	----------

A0A023GNW6	Transketolase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female		KOG0523	4	2	Ion Trap
------------	--	--------	--	---------	---	---	----------

A0A023FKN8	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	Female		KOG1557	15	3	QTOF
------------	---	--------	--	---------	----	---	------

A0A023FKN8	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1557	24	6	Ion Trap
------------	---	--------	------	---------	----	---	----------

A0A0A0QMB6	Glycosyl hydrolase 18-like SERlong isoform OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2806	8	3	Ion Trap
------------	---	--------	------	---------	---	---	----------

Lipid transport and metabolism [I]

A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG4338	3	4	QTOF
------------	---	--	------	---------	---	---	------

A0MVX0	Heme lipoprotein OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=2		Male	KOG4338	1	2	QTOF
--------	--	--	------	---------	---	---	------

B7PCV9	Lysosomal acid phosphatase, putative OS=Ixodes scapularis GN=IscW_ISCW017166 PE=4 SV=1	Female		KOG3720	5	2	Ion Trap
--------	---	--------	--	---------	---	---	----------

A0MVX0	Heme lipoprotein OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=2	Female	Male	KOG4338	5	8	Ion Trap
--------	--	--------	------	---------	---	---	----------

TABLE 1 (CONTINUED)								
A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4338	9	12	Ion Trap	QTOF
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4338	12	16	Ion Trap	
Translation: ribosomal structure and biogenesis [J]								
F0J8I9	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1		Male	KOG0052	8	3	Ion Trap	
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1*	Female	Male	KOG2317	31	4	Ion Trap	
A0A023FHK0	Putative 40s ribosomal protein s7 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG3320	13	2	Ion Trap	
H2CYP6	Ribosomal protein L40 OS=Pandinus cavimanus PE=2 SV=1	Female		KOG0003	20	2	Ion Trap	
A9Y1V1	Ribosomal protein P0 OS=Haemaphysalis longicornis PE=2 SV=1	Female		KOG0815	14	3	Ion Trap	
A0A023GEE1	Putative ubiquitin-40s ribosomal protein s27a (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0004	44	4	Ion Trap	
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	Female		KOG2317	20	3		QTOF
F0J8P3	HSP70 family member (Fragment) OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	Female		KOG0100	15	6	Ion Trap	
F0J8I9	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	Female		KOG0052	10	3		QTOF
Transcription [K]								
A0A023FRB9	Putative dna-directed rna polymerase i subunit rpa49-like protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4073	42	4	Ion Trap	
Cell wall/membrane/envelope biogenesis: Extracellular structures [M]								
A0A023G500	Putative nidogen (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1214	4	4	Ion Trap	QTOF
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]								
A0A023FGP9	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG1651	47	4	Ion Trap	
A0A023G7G1	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1		Male	KOG3591	16	4	Ion Trap	
O97117	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG1695	27	3	Ion Trap	

TABLE 1		(CONTINUED)						
A0A023FXV1	Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0100	21	11	Ion Trap	
A0A023G093	Putative heat shock protein (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1		Male	KOG0101	16	9	Ion Trap	
A0A023FJP9	Putative lethal 2 37cc OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG3083	11	2	Ion Trap	
A0A023FS31	Putative glutathione s-transferase b (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG1695	9	2		QTOF
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG3591	26	5	Ion Trap	
A0A023GGY3	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1*	Female	Male	KOG0841	21	5	Ion Trap	QTOF
O97117	Glutathione S-transferase OS=Rhipicephalus microplus PE=2 SV=1	Female		KOG1695	10	2		QTOF
A0A023FFI9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0865	40	8	Ion Trap	
A0A023FPL0	Protein disulfide-isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0190	13	5	Ion Trap	
A0A023FPU5	Putative cathepsin b endopeptidase ixodes scapularis cathepsin b endopeptidase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1543	12	4	Ion Trap	
A0A023FS31	Putative glutathione s-transferase b (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1695	13	3	Ion Trap	
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0867	31	8	Ion Trap	QTOF
A0A023FDS6	Thioredoxin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0907	51	5	Ion Trap	
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG3591	10	2		QTOF
Inorganic ion transport and metabolism [P]								
A0A023FHL0	Ferritin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG2332	36	5	Ion Trap	
Q7Z0V0	Ferritin OS=Rhipicephalus microplus PE=2 SV=1	Female		KOG2332	24	3	Ion Trap	
A0A023GBW8	Putative ca2+-binding protein regucalcin/smp30 (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4499	10	3	Ion Trap	
A0A023GNW2	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit alpha OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0203	3	2	Ion Trap	

TABLE 1 (CONTINUED)							
A0A023FN97	Catalase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG0047	21	8	QTOF
A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG0441	36	4	Ion Trap
Secondary metabolites biosynthesis: transport and catabolism [Q]							
A0A023FHX5	Putative 20-hydroxysteroid dehydrogenase ixodes scapularis 20-hydroxysteroid dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1		Male	KOG1208	22	4	Ion Trap
General function prediction only [R]							
A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG1544	4	2	QTOF
A0A023GP85	Putative conserved secreted protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1520	6	2	Ion Trap
A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1544	26	9	Ion Trap
A0A023FMF5	Putative phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG3346	12	2	Ion Trap
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	Female	Male	KOG2501	34	4	Ion Trap QTOF
Signal transduction mechanisms: Intracellular trafficking: secretion: and vesicular transport [T]							
A0A023GJ75	Putative gtpase rab1/ypt1 small g protein superfamily OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female		KOG0084	13	2	Ion Trap
A0A023FLK6	Putative neural cell adhesion molecule l1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG3513	3	4	Ion Trap
A0A023GIU7	Putative acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4389	5	2	Ion Trap
Intracellular trafficking: secretion: and vesicular transport [U]							
A0A023GP94	Putative translocon-associated protein (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4088	14	2	Ion Trap
Cytoskeleton [Z]							
A0A023FGX4	Calponin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG2046	18	2	Ion Trap
F0JAB8	Actin depolymerizing factor OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1735	48	5	Ion Trap
A0A023FWJ2	Profilin OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1755	36	4	Ion Trap

ANEXO 2

Tabela 2: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (*Uncharacterized Protein*) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1		Male	Putative translation initiation inhibitor [<i>Amblyomma sculptum</i>]	296	100%	9,00E-102	95%	JAU03219.1
G3MRF2	Putative uncharacterized protein OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1	Female	Male	Putative serine protease-like protein precursor, partial [<i>Amblyomma sculptum</i>]	536	99%	0.0	92%	JAU02472.1
A0A023GGY3	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	Putative 14-3-3 protein zeta multifunctional 14-3-3 family chaperone [<i>Amblyomma sculptum</i>]	484	99%	6,00E-173	98%	JAT99361.1
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	TPA_exp: thioredoxin [<i>Amblyomma variegatum</i>]	237	80%	6,00E-79	96%	DAA34100.1

ANEXO 3

Tabela 3: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	MW	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	ION TRAP	QTOF
RNA processing and modification [A]									
A0A023FI60	Putative grp-3 321 glycine rich family (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	28 kDa	Female	Male	KOG4205	11	2	ION TRAP	
A0A023FJS1	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	33 kDa	Female	Male	KOG4205	6	2	ION TRAP	
Chromatin structure and dynamics [B]									
D0VSM5	Histone H3 (Fragment) OS=Selenops insularis GN=H3a PE=3 SV=1	11 kDa	Female		KOG1745	21	2	ION TRAP	
A0A023FWA6	Histone H2B OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	14 kDa	Female	Male	KOG1744	27	3	ION TRAP	
A0A023FGQ4	Histone H2A OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13 kDa	Female	Male	KOG1756	26	2	ION TRAP	
A0A023FF59	Histone H2B OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	14 kDa	Female	Male	KOG1744	19	2		QTOF
V5IK85	Histone H4 (Fragment) OS=Ixodes ricinus PE=2 SV=1	11 kDa	Female	Male	KOG3467	21	2	ION TRAP	
A0A023FHA6	Histone H4 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11 kDa	Female	Male	KOG3467	21	2		QTOF
Energy production and conversion [C]									
A0A023FIN3	Putative oligomycin sensitivity-conferring protein (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	19 kDa		Male	KOG1662	13	2	ION TRAP	
A0A023FZX4	ATP synthase subunit alpha (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	60 kDa	Female		KOG1353	5	2	ION TRAP	
A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	32 kDa	Female	Male	KOG2450	38	9	ION TRAP	
A0A023FXL8	Putative aldehyde dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	54 kDa	Female	Male	KOG2450	15	7		QTOF
A0A023FND3	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	56 kDa	Female	Male	KOG1350	18	7	ION TRAP	QTOF
L7M097	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1	54 kDa	Female	Male	KOG2450	22	2	ION TRAP	
Carbohydrate transport and metabolism [G]									
A0A023FND8	Putative chitinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	49 kDa	Female	Male	KOG2806	4	2	ION TRAP	
A0A023FIE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	36 kDa	Female	Male	KOG0657	30	6	ION TRAP	

TABLE 3 (CONTINUED)									
A0A023FKN8	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	40 kDa	Female	Male	KOG1557	10	3	ION TRAP	
Lipid transport and metabolism [I]									
A0A023GME3	Putative vitellogenin-1 (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	154 kDa	Female		KOG4338	4	2		QTOF
A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	177 kDa	Female	Male	KOG4338	4	5	ION TRAP	QTOF
A0A023FPJ3	Putative tpa exp: fatty acid-binding protein fabp (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	18 kDa	Female	Male	KOG4015	38	7	ION TRAP	
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	177 kDa	Female	Male	KOG4338	2	2	ION TRAP	QTOF
Translation: ribosomal structure and biogenesis [J]									
A0A023FEG2	Putative 40s ribosomal protein s10 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	18 kDa	Female		KOG3344	15	2	ION TRAP	
A0A023FHK0	Putative 40s ribosomal protein s7 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	21 kDa	Female		KOG3320	13	2	ION TRAP	
A0A023FNA5	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	17 kDa	Female		KOG2317	23	3		QTOF
A0A023FNA5	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	17 kDa	Female	Male	KOG2317	23	3	ION TRAP	
A0A023FI21	Putative 60s acidic ribosomal protein p0 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	24 kDa	Female	Male	KOG0815	10	2	ION TRAP	
Transcription [K]									
A0A023FG19	Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	17 kDa	Female	Male	KOG4073	36	4	ION TRAP	
Cell wall/membrane/envelope biogenesis: Extracellular structures [M]									
A0A023G500	Putative nidogen (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	124 kDa	Female	Male	KOG1214	2	2		QTOF
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]									
A0A023GGH2	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	26 kDa		Male	KOG1695	7	2	ION TRAP	
A0A023FIS9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	28 kDa	Female		KOG0841	9	2	ION TRAP	
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	27 kDa	Female		KOG0867	12	2		QTOF
A0A023FFI9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	22 kDa	Female	Male	KOG0865	26	4	ION TRAP	
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	20 kDa	Female	Male	KOG3591	21	3	ION TRAP	
A0A023FI97	Putative cathepsin I-like cysteine proteinase a (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	24 kDa	Female	Male	KOG1543	21	3	ION TRAP	
A0A023FM70	Putative heat shock protein (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	72 kDa	Female	Male	KOG0101	9	5	ION TRAP	

TABLE 3 (CONTINUED)								
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	27 kDa	Female	Male	KOG0867	12	2	ION TRAP
A0A023FDS6	Thioredoxin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12 kDa	Female	Male	KOG0907	38	4	ION TRAP
A0A023FPU5	Putative cathepsin b endopeptidase ixodes scapularis cathepsin b endopeptidase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	37 kDa	Female	Male	KOG1543	9	2	ION TRAP
A0A023GGH2	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	26 kDa	Female	Male	KOG1695	7	2	QTOF
A0A023FIC2	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26 kDa	Female	Male	KOG1695	19	4	ION TRAP
A0A023FNL5	Putative heat shock 70 kDa protein 5 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	73 kDa	Female	Male	KOG0100	7	2	ION TRAP
Inorganic ion transport and metabolism [P]								
A0A023FMF6	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit alpha OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	115 kDa		Male	KOG0203	3	2	ION TRAP
A0A023FN97	Catalase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	57 kDa	Female	Male	KOG0047	13	5	ION TRAP QTOF
A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	16 kDa	Female	Male	KOG0441	27	3	ION TRAP
General function prediction only [R]								
A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	48 kDa	Female	Male	KOG1544	13	4	ION TRAP
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	16 kDa	Female	Male	KOG2501	34	4	ION TRAP
A0A023FV27	Uncharacterized protein OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1*	19 kDa	Female	Male	KOG2764	16	2	ION TRAP
Intracellular trafficking: secretion: and vesicular transport [U]								
A0A023FC75	Annexin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	40 kDa	Female	Male	KOG0819	20	6	ION TRAP
Cytoskeleton [Z]								
A0A023FGF9	Profilin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	14 kDa		Male	KOG1755	22	2	ION TRAP
A0A023FPQ2	Putative tpa exp: actin depolymerizing factor (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	21 kDa	Female		KOG1735	12	2	ION TRAP
A0A023FJE7	Putative tropomyosin tropomyosin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	33 kDa	Female	Male	KOG1003	12	3	ION TRAP
A0A023FIL9	Putative actin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	42 kDa	Female	Male	KOG0676	20	5	ION TRAP
A0A023FEL7	Putative actin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	45 kDa	Female	Male	KOG0676	11	3	QTOF
NO HIT								
A0A023FHA1	Putative intracellular cystatin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11 kDa	Female			19	2	QTOF

TABLE 3 (CONTINUED)									
A0A023FQW8	Putative secreted protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	23 kDa	Female	Male		38	7	ION TRAP	QTOF
A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	37 kDa	Female	Male		29	6	ION TRAP	
A0A023FHA1	Putative intracellular cystatin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11 kDa	Female	Male		22	2	ION TRAP	

* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas

ANEXO 4

Tabela 4: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (*Uncharacterized Protein*) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
A0A023FNA5	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma cajennense</i> PE=2 SV=1	Female		Putative translation initiation inhibitor [<i>Amblyomma sculptum</i>]	298	92%	4,00E-102	97%	JAU03219.1
A0A023FIS9	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma cajennense</i> PE=2 SV=1*	Female		Putative 14-3-3 protein zeta multifunctional 14-3-3 family chaperone [<i>Amblyomma aureolatum</i>]	502	100%	4,00E-180	100%	JAT98214.1
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma cajennense</i> PE=2 SV=1	Female	Male	TPA_exp: thioredoxin [<i>Amblyomma variegatum</i>]	237	80%	6,00E-79	96%	DAA34100.1
A0A023FV27	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma parvum</i> PE=2 SV=1*	Female	Male	Putative transcriptional regulator dj-1 [<i>Amblyomma aureolatum</i>]	358	98%	6,00E-125	98%	JAT92846.1

ANEXO 5

Tabela 5: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage%	Peptides Number	Ion Trap	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]								
G1TD51	Histone H4		Male	KOG3467	48	5		QTOF
G1SJS1	Histone H2B	Female		KOG1744	25	3	Ion Trap	
G1TNB7	Histone H3	Female		KOG1745	10	2	Ion Trap	
G1T8N1	Histone H2B	Female		KOG1744	19	3	Ion Trap	
G1TN68	Histone H4	Female	Male	KOG3467	41	5	Ion Trap	
G1U2G1	Histone H2A	Female	Male	KOG1756	18	3	Ion Trap	
G1TD51	Histone H4	Female	Male	KOG3467	40	4	Ion Trap	
Energy production and conversion [C]								
G1T765	Malate dehydrogenase	Female	Male	KOG1494	17	4	Ion Trap	
G8ZF10	Alpha-globin 1		Male	KOG3378	63	10		QTOF
G8ZF33	Alpha-globin 1		Male	KOG3378	18	2		QTOF
G1SKT4	ATP synthase subunit alpha	Female		KOG1353	3	2	Ion Trap	
P01948	Hemoglobin subunit alpha-1/2	Female		KOG3378	15	2		QTOF
G1SQA8	ATP synthase subunit beta	Female	Male	KOG1350	9	4	Ion Trap	
B8K132	Alpha-hemoglobin	Female	Male	KOG3378	64	12		QTOF
Cell cycle control: cell division: chromosome partitioning: Nuclear structure [D]								
G1U9I8	Uncharacterized protein*		Male	KOG0977	6	4		QTOF
G1T4R6	Uncharacterized protein*	Female		KOG0977	9	4	Ion Trap	
G1U9I8	Uncharacterized protein*	Female	Male	KOG0977	9	6	Ion Trap	
G1T1V0	Uncharacterized protein*	Female	Male	KOG0977	14	9	Ion Trap	
Amino acid transport and metabolism [E]								
G1SWF6	Haptoglobin	Female		KOG3627	31	8		QTOF
G1SWF6	Haptoglobin	Female	Male	KOG3627	30	7	Ion Trap	
Carbohydrate transport and metabolism [G]								
G1TUD0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Female	Male	KOG0657	11	4	Ion Trap	

TABLE 5	(CONTINUED)						
P46406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase		Male	KOG0657	14	3	Ion Trap
Translation: ribosomal structure and biogenesis [J]							
Q71V39	Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2) (Eukaryotic elongation factor 1 A-2) (eEF1A-2) (Statin-S1)		Male	KOG0052	5	2	Ion Trap
P62975	Ubiquitin	Female	Male	KOG0004	41	3	Ion Trap
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]							
G1SQ70	Uncharacterized protein*	Female		KOG1366	2	2	Ion Trap
G1U7L4	Uncharacterized protein*	Female	Male	KOG0100	9	5	Ion Trap
G1T9M9	Uncharacterized protein*	Female	Male	KOG0101	7	4	Ion Trap
Defense mechanisms [V]							
Q07298	Alpha-1-antiproteinase S-1	Female		KOG2392	16	5	Ion Trap
P23035	Alpha-1-antiproteinase F	Female	Male	KOG2392	16	4	Ion Trap
Cytoskeleton [Z]							
Q9BGH4	Beta-actin		Male	KOG0676	18	2	QTOF
G1SPU6	Actin, cytoplasmic 1	Female		KOG0676	33	7	QTOF
NO HIT							
P01870	Ig gamma chain C region	Female			29	9	Ion Trap
G1U9S2	Serum albumin	Female			47	24	QTOF
B8K174	Hemoglobin, beta	Female	Male		92	22	Ion Trap
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	Female	Male		92	21	Ion Trap
G1U9S2	Serum albumin	Female	Male		61	39	Ion Trap
G1STF7	Serotransferrin	Female	Male		15	9	Ion Trap
G1THZ6	Actin, cytoplasmic 1	Female	Male		14	8	Ion Trap
P49065	Serum albumin	Female	Male		26	11	QTOF
* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas							

ANEXO 6

Tabela 6: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (Uncharacterized protein) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
G1T4R6	Uncharacterized protein	Female		PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 16 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	889	100%	0.0	94%	XP_002719203.1
G1SQ70	Uncharacterized protein	Female		PREDICTED: alpha-2-macroglobulin isoform X1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	3024	100%	0.0	99%	XP_008258028.1
G1U9I8	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	694	81%	0.0	80%	XP_008254715.1
G1T1V0	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10 isoform X1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	1032	100%	0.0	97%	XP_002719410.1
G1U7L4	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: 78 kDa glucose-regulated protein [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	1317	99%	0.0	99%	XP_017205553.1
G1T9M9	Uncharacterized protein	Female	Male	Heat shock cognate 71 kDa protein [<i>Fukomys damarensis</i>]	1334	100%	0.0	99%	KFO35963.1

Tabela 7: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras IF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	MW	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	ION TRAP	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]									
G1TD51	Histone H4	11 kDa	Female	Male	KOG3467	19	2	ION TRAP	QTOF
G1T8H6	Histone H3	15 kDa	Female	Male	KOG1745	10	2	ION TRAP	
Energy production and conversion [C]									
G1T765	Malate dehydrogenase	35 kDa		Male	KOG1494	9	2	ION TRAP	QTOF
B8K132	Alpha-hemoglobin	16 kDa	Female	Male	KOG3378	47	5	ION TRAP	
G1SQA8	ATP synthase subunit beta	61 kDa	Female	Male	KOG1350	5	2	ION TRAP	
G8ZF33	Alpha-globin 1	16 kDa	Female	Male	KOG3378	20	3		
Cell cycle control: cell division: chromosome partitioning: Nuclear structure [D]									
G1U9I8	Uncharacterized protein [*]	64 kDa	Female	Male	KOG0977	9	5	ION TRAP	QTOF
G1T1V0	Uncharacterized protein [*]	58 kDa	Female	Male	KOG0977	16	9	ION TRAP	QTOF
G1SHY2	Uncharacterized protein [*]	61 kDa	Female	Male	KOG0977	5	2	ION TRAP	
Amino acid transport and metabolism [E]									
G1SWF6	Haptoglobin	39 kDa	Female	Male	KOG3627	15	4	ION TRAP	
Carbohydrate transport and metabolism [G]									
G1TJG6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	36 kDa	Female	Male	KOG0657	12	3	ION TRAP	
Translation, ribosomal structure and biogenesis [J]									
G1SF46	Uncharacterized protein [*]	26 kDa	Female	Male	KOG0004	11	2	ION TRAP	
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]									
G1T9M9	Uncharacterized protein [*]	71 kDa	Female	Male	KOG0101	7	4	ION TRAP	
G1TZP0	Uncharacterized protein [*]	28 kDa	Female		KOG0841	8	2	ION TRAP	
G1SQ70	Uncharacterized protein [*]	162 kDa	Female		KOG1366	2	2	ION TRAP	
General function prediction only [R]									

ANEXO 8

Tabela 8: BLASTp das proteínas não caracterizadas* (*Uncharacterized Protein*) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelos algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
G1TZP0	Uncharacterized protein	Female		PREDICTED: 14-3-3 protein gamma [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	509	100%	0.0	100%	XP_002711950.1
G1SQ70	Uncharacterized protein	Female		PREDICTED: alpha-2-macroglobulin isoform X1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	3024	100%	0.0	99%	XP_008258028.1
G1TKX3	Uncharacterized protein		Male	PREDICTED: fibrinogen gamma chain isoform X2 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	919	100%	0.0	100%	XP_008265528.1
G1U9I8	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	724	62%	0.0	97%	XP_002711050.1
G1T1V0	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: keratin, type I cytoskeletal 10 isoform X1 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	1032	100%	0.0	97%	XP_002719410.1
G1T9M9	Uncharacterized protein	Female	Male	Heat shock cognate 71 kDa protein [<i>Fukomys damarensis</i>]	1334	100%	0.0	99%	KFO35963.1
G1THZ6	Uncharacterized protein	Female	Male	Ig gamma H-chain [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	644	74%	0.0	84%	AAA64252.1
G1SHY2	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: keratin, type II cytoskeletal 75 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	1110	97%	0.0	100%	XP_008254711.1
G1SF46	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: polyubiquitin-B [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	758	100%	3,00E-161	99%	XP_002723083.3
G1TBT6	Uncharacterized protein	Female	Male	PREDICTED: LOW QUALITY PROTEIN: plexin-B3 [<i>Oryctolagus cuniculus</i>]	3833	99%	0.0	99%	XP_017194059.1

ANEXO 9

Tabela 9: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, com auxílio do algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	Ion Trap	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]								
A0A023FUB7	Histone H2A OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1756	31	3	Ion Trap	
G3MMX0	Histone H4 OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG3467	14	2	Ion Trap	
Energy production and conversion [C]								
A0A023FZV7	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2453	5	2	Ion Trap	
G3MHD3	ATP synthase subunit beta OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	Female	Male	KOG1350	16	6	Ion Trap	
A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG2450	11	3		QTOF
A0A023FKQ1	ATP synthase subunit beta	Female	Male	KOG1350	22	5	Ion Trap	
Nucleotide transport and metabolism [F]								
A0A023FWM4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2550	5	2	Ion Trap	
Carbohydrate transport and metabolism [G]								
A0A023FWA3	Putative enolase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	Female	Male	KOG2670	6	2	Ion Trap	
Lipid transport and metabolism [I]								
A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female		KOG4338	2	2		QTOF
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	Female	Male	KOG4338	4	5	Ion Trap	
A0A023GMC7	Putative vitellogenin-1	Female	Male	KOG4338	2	2	Ion Trap	
Translation: ribosomal structure and biogenesis [J]								
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*		Male	KOG2317	13	2	Ion Trap	
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	Female		KOG2317	33	5		QTOF
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]								
A0A023GGY3	Putative uncharacterized protein OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1*	Female	Male	KOG0841	9	2	Ion Trap	QTOF

ANEXO 10

Tabela 10: BLASTp das proteínas INF e não caracterizadas* (*Uncharacterized protein*) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma cajennense</i> PE=2 SV=1	Female	Male	Putative translation initiation inhibitor [<i>Amblyomma sculptum</i>]	298	92%	4,00E-102	97%	JAU03219.1
A0A023GGY3	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma triste</i> PE=2 SV=1	Female	Male	Putative 14-3-3 protein zeta multifunctional 14-3-3 family chaperone [<i>Amblyomma sculptum</i>]	484	99%	6,00E-173	98%	JAT99361.1
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS= <i>Amblyomma cajennense</i> PE=2 SV=1		Male	TPA_exp: thioredoxin [<i>Amblyomma variegatum</i>]	237	80%	6,00E-79	96%	DAA34100.1

ANEXO 11

Tabela 11: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	MW	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	ION TRAP	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]									
A0A023FGQ4	Histone H2A OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13 kDa		Male	KOG1756	26	2	ION TRAP	
A0A023FHA6	Histone H4 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11 kDa	Female		KOG3467	17	2	ION TRAP	QTOF
Energy production and conversion [C]									
L7M097	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1	54 kDa	Female	Male	KOG2450	13	5	ION TRAP	
A0A023FND3	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	56 kDa	Female		KOG1350	8	3	ION TRAP	
A0A023FXL8	Putative aldehyde dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	54 kDa	Female	Male	KOG2453	15	7		QTOF
Carbohydrate transport and metabolism [G]									
A0A023FIE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	36 kDa	Female	Male	KOG0657	9	2	ION TRAP	
Lipid transport and metabolism [I]									
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	177 kDa		Male	KOG4338	2	3	ION TRAP	
Inorganic ion transport and metabolism [P]									
A0A023FN97	Catalase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	57 kDa	Female	Male	KOG0047	15	6	ION TRAP	QTOF
Cytoskeleton [Z]									
A0A023FEL7	Putative actin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	45 kDa	Female		KOG0676	7	2	ION TRAP	
A0A076KTV1	BLTX369 OS=Nephila pilipes PE=2 SV=1	36 kDa		Male	KOG0676	10	2	ION TRAP	
NO HIT									
A0A023FRF0	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	31 kDa		Male		13	2	ION TRAP	
A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	37 kDa	Female			34	7	ION TRAP	
A0A023FQW8	Putative secreted protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	23 kDa	Female	Male		32	5	ION TRAP	QTOF

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	Ion Trap	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]								
G1TD51	Histone H4	Female	Male	KOG3467	29	3	Ion Trap	
G1SGC2	Histone H2A	Female	Male	KOG3468	13	2	Ion Trap	
Energy production and conversion [C]								
G8ZF10	Alpha-globin 1	Female	Male	KOG3378	58	6	Ion Trap	QTOF
Q0QEN9	ATP synthase subunit beta	Female	Male	KOG1350	6	2	Ion Trap	QTOF
Posttranslational modification: protein turnover: chaperones [O]								
G1T9M9	Uncharacterized protein*	Female		KOG0101	4	2	Ion Trap	
G1TZP0	Uncharacterized protein*	Female		KOG0841	9	2	Ion Trap	
NO HIT								
G1U9S2	Serum albumin	Female	Male		27	16	Ion Trap	QTOF
P02057	Hemoglobin subunit beta-1/2	Female	Male		78	9	Ion Trap	QTOF
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	Female	Male		78	10	Ion Trap	
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	Female			44	5		QTOF
* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas								

ANEXO 13

Tabela 13: BLASTp das proteínas INF e não caracterizadas* (*Uncharacterized protein*) no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados, identificadas pelo algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*.

ID	Protein Name	Gender (F)	Gender (M)	Description	Total score	Query Cover	E value	Ident	Acession
G1T9M9	Uncharacterized protein	Female	Male	Heat shock cognate 71 kDa protein [Fukomys damarensis]	1334	100%	0.0	99%	KFO35963.1
G1TZP0	Uncharacterized protein	Female		PREDICTED: 14-3-3 protein gamma [Oryctolagus cuniculus]	509	100%	0.0	100%	XP_002711950.1

ANEXO 14

Tabela 14: Proteínas identificadas no intestino dos carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, para amostras INF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*, caracterizadas funcionalmente pelo KOG.

ID	Protein Name	MW	Gender (F)	Gender (M)	KOG ID	Coverage (%)	Peptides Number	ION TRAP	QTOF
Chromatin structure and dynamics [B]									
G1TD51	Histone H4	11 kDa	Female	Male	KOG3467	17	2		QTOF
Energy production and conversion [C]									
B8K132	Alpha-hemoglobin	16 kDa	Female	Male	KOG3378	52	5	ION TRAP	QTOF
G1SQA8	ATP synthase subunit beta	61 kDa	Female	Male	KOG1350	6	3		QTOF
Cytoskeleton [Z]									
G1SPU6	Actin, cytoplasmic 1	36 kDa	Female	Male	KOG0676	9	2	ION TRAP	QTOF
NO HIT									
G1U9S2	Serum albumin	69 kDa	Female	Male		23	12	ION TRAP	QTOF
B8K174	Hemoglobin, beta	16 kDa	Female	Male		61	8	ION TRAP	QTOF
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	16 kDa		Male		69	3	ION TRAP	QTOF
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	16 kDa	Female			52	2		QTOF

ANEXO 15

Tabela 15: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados Chelicerata.

ID	Protein Name	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence
				ION TRAP			
A0A023FJS1	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	9	12	LCGLCGDYNLDR FSGDQLYIQAAR GVLSLFQLDLVK YDFGSMTSSELIR EVSDAIIHAISDSCK LTLSMFGK FTHTDEDEEQLAAAAAGK TDLATFYTGdHVDak WLTLYSNSYGIR VQFFYDR FEVGKEYVYK LTSTFLHVLANK			QTOF
A0A023FTG4	Histone H4 (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	39	4	ISGLIYEETR TVTAMDVVYALK VFLENVIR DNIQGITKPAIR	14	2	TLYGFGG VFLENVIR
A0A023FUB7	Histone H2A OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	37	4	LLSGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK AGLQFPVGR HLQLAIR AAVLEYLAAEVLELAGNAAR			
T1K5R4	Histone H2B OS=Tetranychus urticae PE=3 SV=1	33	5	AMSIMNSFVNDIFER			

TABLE 15 (CONTINUED)

				ESFSIYIK KESFSIYIK EIQTAVR LLLPGELAK			
A0A023FV99	Putative quinone oxidoreductase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	14	6	AIVLTGFGGLK ACGLNFLDLMVR HLLYQQGMHDYVK ALLFDIGNLR VISGFNLR SFFSFAK			
A0A023FKR0	ATP synthase subunit alpha OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	10	4	TGAIVDVPVGPPELLGR SIVTSFIANFSA GIRPAINVGLSVSR AAAGSAEVSTILEER			
G3MHD3	ATP synthase subunit beta OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	32	12	FTQAGSEVSALLGR LVLEVAQHLGENTVR VALTGLSVAEYFR TVLIMELINNVAK FLSQPFQVAEVFTGQAGK GIAELGIYPAVDPLDSTSR FVPIADTISGFK VVDLLAPYSK IGLFGGAGVGK IMNVIGEPIDER IMDPNVVGQEHYDIAR AHGGYSVFAGVGER	4	2	VVDLLAPYSK IGLFGGAGVGK
A0A023FZV7	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	9	4	ETFAPIVYLLK LLSFTGSTQVGR AVEEFLEAVAEATK AALFACVGTAGQR			

TABLE 15 (CONTINUED)							
A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	39	10	ISFTGSTEVGK LFVHEDIYDQFVAK VNLELGK SPLVIFPDADLDEAAR ANDTTYGLAAGVVT ECNEDGILNYIETK EEIFGPVQQILK IAHIGLFFNMGCCVAASR LIQEAAGR VNLELGK	36	7	IAKEEIFGPVQQILK LFVHEDIYDQFVAK IGTEGYFVEPTVFTNVTDDMR SPLVIFPDADLDEAAR IAHIGLFFNMGCCVAASR ANDTTYGLAAGVVT VNLELGK
A0A023FDX7	Putative cytochrome b5 ixodes scapularis cytochrome b5 ixodes pacificus cytochrome b5 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	30	3	LFLSYGAHQ HATEAFEDVGHSTDAR IGDLCEEDQKK			
L7M562	Putative lamin OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1	9	5	LTKQIETSQETR IAELESNLQSLSSR NELANLNDR ATTLESQVVDLQGR LAAYIDR			
G3MRF2	Putative uncharacterized protein OS=Amblyomma maculatum PE=2 SV=1*	12	3	GGHVNNIAILR SVFCTVYDHGSPCK SPVSGLSQAR			
A0A023GNL8	Putative aicar transformylase/imp cyclohydrolase/methylglyoxal synthase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	9	3	DVSEVTGAPEMLGGR TLFGLTLEQR YGTNPHQVPAQLCTNLPK			

TABLE 15 (CONTINUED)							
A0A023FMG7	Putative phosphoribosylamidoimidazole-succinocarboxamide synthase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	6	2	IVYELPDQPGNVVLVSK TVFEILER			
A0A023FWM4	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	11	5	VTLAEANSLQK VAQGVGTIVDK FGLQDIGAR YVPYITGVR NLIDAGVDGLR			
A0A023GK13	Putative enolase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	13	4	VNQIGSVTESIR GNPTVEVDLLTEK IEEQLGGNAVYAGK AVNNVNQVIGPQLIGK			
A0A023FWM8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	42	10	GVEVVAINDPFIDVK VPTPDVSVVDLTCR VGAEFVVESTGVFTTIEK IVSNASCTTNCLAPLAK GAAQNIIPASTGAAK EATYDEIK VINDNFGIVEGLMSTVHATTATQK LISWYDNEYGYNSR LTGMAFR AGISLNK			
A0A023GNW6	Transketolase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	4	2	TVPFASTFAAFFTR LDNLVAIFDINR			
A0A023FKN8	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	24	6	GILAADESTATMGK VTEEVLAAYK ATAEAIVAPGK ALQASALK		15	3 IRPHCPSPLSILENANVLAR VTEEVLAAYK ANHLACQGLYTPGSIQSLASDR

TABLE 15 (CONTINUED)

				ANHLACQGLYTPGSIQSLASDR IRPHCPSPLSILENANVLAR			
A0A0A0QMB6	Glycosyl hydrolase 18-like SERlong isoform OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=1	8	3	VVMGIAFFGR ALFIESVLR GFTLLDPAQHGLHALVNR			
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1				3	4	HIAQEVITDPSDQVAVFTSAFR HYLYEIR ADELLQFDR LCGLCGDYNLDR
A0MVX0	Heme lipoprotein OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=2				1	2	VNNLATFYQGR LSLSVFGK
B7PCV9	Lysosomal acid phosphatase, putative OS=Ixodes scapularis GN=IscW_ISCW017166 PE=4 SV=1	5	2	DLLDTLTIER LEIPGCEGFR			
A0MVX0	Heme lipoprotein OS=Amblyomma americanum PE=2 SV=2	5	8	GVLSLFQLDLVK VQFFYDR VNNLATFYQGR HYVCDLQGHSLR LAASALVGSK YVLPLWDNIPK LSLSVFGK FEVGKEYVYK			
A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	9	12	LCGLCGDYNLDR FSGDQLYQAAR GVLSLFQLDLVK YDFGSMTSSELIR	6	8	SSSHLEISSSYYPK VDVDPATPYSHTEQDSELFK SNEHLVGALEHPFAAK GVLSLFQLDLVK

TABLE 15 (CONTINUED)

				EVSDAIHAI SD SCK LTLSMFGK FTHTDEDEEQLAAAAAGK TDLATFYTG DHVDAK WLTLYSNSYGIR VQFFYDR FEVGKEYVYK LTSTFLHVLANK			VQFFYDR YSFNHDLFNHK NMYIMLR FDEGKIEEFGK
A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12	16	LAASALVGSK GVLSLFQLDLVK CDHDHYAFFGR LCGLCGDYNLDR ADELLQFDR VNNLATFYQGR PSDQVVAFTSAFR SHLVLSGYNPK HYLYEIR CDAQETHPHSATSEVYYELK GKLCGLCGDYNLDR VQFFYDR LEILSVSPDSGLIVR LAHLEFTDEDIKEIGEEK YSFNHDLFNHK FDDGKLEEFAGK			
A0A023G9M9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1*	31	4	AGDTMYVSGQIGVDPK LVEGGITAETR ALGPYSQAIR VYTEFFTEK	20	3	LVEGGITAETR ALGPYSQAIR VYTEFFTEK

TABLE 15 (CONTINUED)

A0A023FHK0	Putative 40s ribosomal protein s7 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	2	AILIYVPVPQLK EVTFEFREPPF		
H2CYP6	Ribosomal protein L40 OS=Pandinus cavimanus PE=2 SV=1	20	2	TITLEVEPSDTIENVK TLDYNIQK		
A9Y1V1	Ribosomal protein P0 OS=Haemaphysalis longicornis PE=2 SV=1	14	3	TSFFQALQIPTK LVQLLDEFPK AGALAPLDVMIPAQNTGLGPEK		
A0A023GEE1	Putative ubiquitin-40s ribosomal protein s27a (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	44	4	TITLEVEPSDTIENVK TLDYNIQK ESTLHLVLR LIFAGK		
F0J8P3	HSP70 family member (Fragment) OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	15	6	IINEPTAAAIAYGLDK TTPSYVAFTDTER DAGTIAGLNVLR VEIIANDQGNR FEELNADLFR STAGDTHLGGEDFDNR		
F0J8I9	Elongation factor 1-alpha (Fragment) OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	8	3	IGGIGTVPVGR EHALLAYTLGVK STTTGHLIYK	10	3 IGGIGTVPVGR LPLQDVYK TLLQALDAMEPPTRPTDKPLR
A0A023FRB9	Putative dna-directed rna polymerase i subunit rpa49-like protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	42	4	TSLTPLLDAGWTTVK NFNQSFGFMTR LANFIETAAK VQITLSTHDVGGLSTNDVK		

TABLE 15 (CONTINUED)							
A0A023G500	Putative nidogen (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	4	4	YPIIAPLYSDVDTR VSPTSLGSDLR LPEATCASLR SPEGIALDWASR	2	2	LPEATCASLR VSPTSLGSDLR
A0A023FGP9	Glutathione peroxidase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	47	4	YAPTTDPADIEPDLLK ILAFPCNQFGGQEPGNEAAIK YINVQFDMFSK NYTQLVELHEK			
A0A023G7G1	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	16	4	YVIPEDVDPESIK FYIQPR RYVIPEDVDPESIK TRDNCVVIHGK			
O97117	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	27	3	LCYNPDFEK IEALPHVAAYLK APVLGYWDIR			
A0A023FXV1	Putative heat shock 70 kDa protein 5 (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	21	11	IINEPTAAAIAYGLDK NQLTSNPENTVFDAK ITPSYVAFTAEGER VFAPEEISAMVLSK VEIIANDQGMR VTHAVVTVPAYFNDAQR DAGTIAGLNVMR NELESYAYSLK IVISNDQNR			

TABLE 15 (CONTINUED)

				IINEPTAAAIAYGLDKK FDLTGIPPAPR			
A0A023G093	Putative heat shock protein (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	16	9	IINEPTAAAIAYGLDK TTPSYVAFTDTER FEELNADLFR TFFPEEISSMVLK VEIANDQGNR FELTGIPPAPR TVVNAVTVPAYFNDSQR NSLESYSFNIK IINEPTAAAIAYGLDKK			
A0A023FJP9	Putative lethal 2 37cc OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11	2	MYTTLGVDYDER ILFRPVQEQLPR			
A0A023FS31	Putative glutathione s-transferase b (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	9	2	VCYDPAYTDEK GYPPLVEYCER			YLLNHLGVFPEDKR VAALPGLK
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26	5	GFGCPSDLAR YVLPEDVDPETVK FAINVDTR NFAPEEITVK YYLQPR			
A0A023GGY3	Uncharacterized protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1*	21	5	YLAEVATGEQR AYQEAFDISK QVTETGVELSNEER NLLSVAYK VISSIEQK	9	2	QVTETGVELSNEER NLLSVAYK
O97117	Glutathione S-transferase OS=Rhipicephalus microplus PE=2 SV=1				10	2	IEALPHVAAYLK APVLGYWDIR

TABLE 15		(CONTINUED)					
A0A023FFI9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	40	8	VFFDVTADGSPLGR HVVFGSVVEGMDVVK HVVFGSVVEGMDVVK VIPNFMCGGDFTK GFGYSGSTFHR LVVQSSGQLS SIYGEKFEDENFILK KLVVQSSGQLS			
A0A023FPL0	Protein disulfide-isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	5	FESEVVDGAADK TLADEDVEIVK MTNEFSVENLEK YGVSGYPTLK IFKGGEFSSEYNGPR			
A0A023FPU5	Putative cathepsin b endopeptidase ixodes scapularis cathepsin b endopeptidase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12	4	GNDECGIEDDINAGIPKE VYSIVGDETQIK KVYSIVGDETQIK DLPESFDAR			
A0A023FS31	Putative glutathione s-transferase b (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	3	GYPPLVEYCER YSFGDGPEPSR VCYDPAYTDEK			
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	31	8	AAMPEYEEVASEALR LNPQHTVPTINDNGFVLWESR LIFFESGTFLPAQMAYFR LIFFESGTFLPAQMAY LIFFESGTFLPAQMA LIFFESGTFLPAQMAYFRPK EQLNPEFVK YAPDSQLYPK	16	3	LNPQHTVPTINDNGFVLWESR YAPDSQLYPK EQLNPEFVK

TABLE 15 (CONTINUED)							
A0A023FDS6	Thioredoxin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	51	5	YEISCMPTFLFIK VDVDENEEIASR VDEISGANQDMIK VIEIVENTEDFDTR EKVDEISGANQDMIK			
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26	5	NFAPEEITVK FAINVDTR GFGCPSDLAR YYLQPR YVLPEDVDPETVK	10	2	FAINVDTR NFAPEEITVK
A0A023FHL0	Ferritin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	36	5	VGPGLGEYMFDKETLSD TVNQSLLDLHK LATDHNDACLDFLESEYLAEQVK AIKELSDYVTNLKR ELSDYVTNLK			
Q7Z0V0	Ferritin OS=Rhipicephalus microplus PE=2 SV=1	24	3	VGPGLGEYMFDKETLSD AIKELSDYVTNLKR TVNQSLLDLHK			
A0A023GBW8	Putative ca ²⁺ -binding protein regucalcin/smp30 (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	10	3	TLLYVDAPVGDLCR SDPNLNVITLDR VINIDPDTGK			
A0A023GNW2	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit alpha OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	3	2	LNVPVEEVNPR ADIGVAMGIAGSDVSK			
A0A023FN97	Catalase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1				21	8	LGPNFMQIPVNCYPK DPFFFPSFIHTQK

TABLE 15 (CONTINUED)

									EQGGAPNYFPNSFSGPVDNPK VWPHSEFPLIPVGK LTSNIANHLKDAQDFIR GAGAFGYFEVTHDITK DAQDFIR ANIFSQIGK
A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	36	4	DSVISLTGEHNIIGR LACGVVGITK SVVVHADPDDL GK HVGDLGNVIAGDDGVAK					
A0A023FHX5	Putative 20-hydroxysteroid dehydrogenase ixodes scapularis 20-hydroxysteroid dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	22	4	VNVSSMCGMLQR VGVTVLSFIQQR TNFFSTLNVCK STYGGLDVLVNNAGIAYK					
A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26	9	FLVNYGGVSEDCYPYEGAR YPVGSTVNVD CNR LSESLPSQFR VPANEEDIMQEIFASGPVQALMLVK VPTEDAQCPTGR ILGWGVDR EDLFLYR LDCEVDGR SYASYR	4	2	LSESLPSQFR ILGWGVDR		
A0A023GP85	Putative conserved secreted protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	6	2	LLYLLGSALK IVYSILEHEN					

TABLE 15 (CONTINUED)							
A0A023FMF5	Putative phosphatidylethanolamine-binding protein 1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12	2	VSDGETLSQYVGSGPPK YVFVVYK			
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	34	4	YGISGIPTLIIVK FGDPFQQELK MFTPVLAEAYK DGSECQAEDALGSTK	16	2	YGISGIPTLIIVK FGDPFQQELK
A0A023GJ75	Putative gtpase rab1/ypt1 small g protein superfamily OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	13	2	LLLIGDSGVGK EFADQLGIPFLETSK			
A0A023FLK6	Putative neural cell adhesion molecule l1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	3	4	AVLLVDGLDQK VAPSDSGIYICR GISVTDAGR ILQQNPYAVR			
A0A023GIU7	Putative acetylcholinesterase/butrylcholinesterase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	5	2	GDAVATVVGAGGDR SITKGDAVATVVGAGGDR			
A0A023GP94	Putative translocon-associated protein (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	14	2	VYDEEGYGALR ENVQNVPLYADV			
A0A023FGX4	Calponin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	18	2	AGEGIINLQYGSNK NIPQVAQCLMAVGR			
F0JAB8	Actin depolymerizing factor OS=Amblyomma variegatum PE=2 SV=1	48	5	VIDVETGDR SATYADFLEQLQNFK YCVFDFPASIR			

TABLE 15 (CONTINUED)

				LVLMTWCPEQAK YVQGCDFEVVSQEAIEAAFQSSR		
A0A023FWJ2	Profilin OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	36	4	TNPSAFNETGIHLGGQK YFCLSAENNLVR DSNSTITQQELK LGDYLK		
B2YGB6	Actin (Fragment) OS=Pirata piraticus PE=3 SV=1				35	7 SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPVLLTEAPLNPK GYSFTTTAER EITALAPSTMK DLTDYLMK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR IWHHTFYNELR
A0A023FQI7	Putative cell-matrix adhesion (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11	5	EGMIGAADFKPTFVAIATWR YTINMEMYR YYEFIPYSQEPR LPAIYR DAMFYGR		
A0A023FR78	Putative glycine-rich cell wall structural protein (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	7	2	VGLDLGIR LPNLDLPFK		
A0A023G2W2	Putative cuticular protein OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	14	2	PGPPAPYSFVYGSSAK IALADGR		
A0A023FU51	Putative sulfotransferase ixodes scapularis sulfotransferase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	14	2	SNVQGQLTGLLYGGFR ALPQDANNFVDIVLR		

TABLE 15 (CONTINUED)

A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	29	6	GLSPFGGLGGYGPFGFR GLYGLGGLSGLGGLGGFGR VITDPSTGLPIAQAVYIGVVR LGGLYGLGGLSGLGGYGR GLYGLGGLSGLGGYGR LGGLGGYGPFGGLGGYGPFGFR			
A0A023FHA1	Putative intracellular cystatin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	55	5	ALEDPIEHFQ DADATVQEICEK TFDEFTPLK PLCGGLAEEVK VHVGGGQHIHVR	20	2	DADATVQEICEK VHVGGGQHIHVR
A0A023FQW8	Putative secreted protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	42	9	AVAWAIGESAGK KIDPLTIPAFSFHIR FQPSTLTGLSTIQR WGYYEVFR SGDCASYTR PLTIPAFSFHIR ILKDELPSVAK LYVSVGAWK DVVAVAIER	31	7	AVAWAIGESAGK KIDPLTIPAFSFHIR PLTIPAFSFHIR LYVSVGAWK WGYYEVFR DVVAVAIER ILKDELPSVAK

* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas

ANEXO 16

Tabela 16: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados Chelicerata.

ID	Protein Name	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence
				ION TRAP			
					QTOF		
A0A023FI60	Putative grp-3 321 glycine rich family (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	11	2	GFGFVTFNAK IFVGGLESDPEADIK			
A0A023FJS1	Putative heteroproteinous nuclear ribonucleoprotein at 87f OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	6	2	LFIGGLDYK GFGFITFR			
D0VSM5	Histone H3 (Fragment) OS=Selenops insularis GN=H3a PE=3 SV=1	21	2	STELLIR YRPGTVALREVER			
A0A023FWA6	Histone H2B OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	27	3	ASIMNSFVNDIFER LLLPGELAK ESFSIYIK	15	2	ESFSIYIK LLLPGELAK
A0A023FGQ4	Histone H2A OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26	2	AGLQFPVGR LLSGVTIAQGGVLPNIQAVLLPK			
A0A023FF59	Histone H2B OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1				19	2	ASINSFVNDIFER LLLPGELAK

TABLE 16 (CONTINUED)							
V5IK85	Histone H4 (Fragment) OS=Ixodes ricinus PE=2 SV=1	21	2	ISGLIYEETR TVTADVYALK			
A0A023FHA6	Histone H4 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1				21	2	DNIQGITKPAIR ISGLIYEETR
A0A023FIN3	Putative oligomycin sensitivity-conferring protein (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	2	LSQFVQNPLVNK YVLPVIGAFSR			
A0A023FZX4	ATP synthase subunit alpha (Fragment) OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1	5	2	VLGQATTANLEETGR GIRPAINVGLSVSR			
A0A023FIH9	Putative aldehyde dehydrogenase (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	38	9	RVNLELGGK ILGLIESGKK LIQEAAGR SPLVIFPDADLDEAAR IAHIGLFFNGQVAASR EEIFGPVQQILK ANDTTYGLAAGVGTK ENEDGILNYIETK ISFTGSTEVGK			
A0A023FXL8	Putative aldehyde dehydrogenase OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1				15	7	TFPVYNPSTGK ALYLLK ISFTGSTEVGK VNLELGGK

TABLE 16 (CONTINUED)

							ILGLIESGKK IAKEEIFGPVQQILK ENEDGILNYIETK
A0A023FND3	ATP synthase subunit beta (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	18	7	LVLEVAQHLGENTVR VVDLLAPYSK TVLIMELINNVAK VALTGLSVAEYFR FTQAGSEVSALLGR IDPNVVGQEHYDIAR FVPIADTISGFK	5	2	LVLEVAQHLGENTVR VVDLLAPYSK
L7M097	Putative formyltetrahydrofolate dehydrogenase OS=Rhipicephalus pulchellus PE=2 SV=1	22	2	FTQIFINNEFVNSVSGK TIPADGSYFTYTR			
A0A023FND8	Putative chitinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	4	2	ALFIESVLR VVGIAFFGR			
A0A023FIE8	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	30	6	IVSNASTTNLAPLAK GAAQNIIPASTGAAK GVEVVAINDPFIDVK EATYDEIK IVSNASTTNLAPLAK VINDNFGIVEGLSTVHATTATQK			
A0A023FKN8	Fructose-bisphosphate aldolase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	10	3	VTEEVLAAYK GILAADESTATGK			

TABLE 16 (CONTINUED)

				ATAEAIVAPGK			
A0A023GME3	Putative vitellogenin-1 (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1				4	2	EPTEILFDEFYR VPVTPDEPFR
A0A023FS61	Putative vitellogenin-2 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	4	5	EIETALPIADR GVLSLFQLDLVK VDVDPATPYSHTEQDSELFK FSGDQLYIQAAR VDVDPATPYSHTEQDSELFK	9	12	SNEHLVGALEHPFAAK EVSDAIIHAISDSK SSSHLEISSSYYPK LTLSFGK YSFNHDLFNHK VQFFYDR TDLATFYTGdhVDAK FTHTDEDEEQAAAAAGK FLVLAR VDVDPATPYSHTEQDSELFK GKLGLGDYNLDR
A0A023FPJ3	Putative tpa exp: fatty acid-binding protein fabp (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	38	7	LSESENFDEFLK QLGVGLAWR AEGDDWSIK SLVTLDDGK SLVTLDDGKLVQK DGQLHVTSLEGVTALR DGQLHVTSLEGVTALRK			

TABLE 16 (CONTINUED)

A0A023FUV2	Putative vitellogenin-2 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	2	2	ADELLQFDR VNNLATFYQGR	9	8	GTLHVANPEQPLQSTGFGYR FDDGKLEEF AIGK DHDHYAFFGR LAHLEFTDEDIKEIGEEK LSLSVFGK ADELLQFDR FLILAR SYVVPSPDHAPEH
A0A023FEG2	Putative 40s ribosomal protein s10 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	15	2	VAIYEYLFK DFLHLPPEIVPATLK			
A0A023FHK0	Putative 40s ribosomal protein s7 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	2	AILIYVPVPQLK EVTFEFREPPF			
A0A023FNA5	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	23	3	ALGPYSQAIR AGDTYVSGQIGVDPK LVEGGITAETR	13	2	ALGPYSQAIR LVEGGITAETR
A0A023FI21	Putative 60s acidic ribosomal protein p0 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	10	2	LVQLLDEFK TSFFQALQIPTK			
A0A023FG19	Putative pterin carbinolamine dehydratase pcbd/dimerization cofactor of hnf1 (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	36	4	TSLTPLLDAGWTTVK NFNQSFGFTR VQITLSTHDVGGLSTNDVK			

TABLE 16 (CONTINUED)

				LANFIETAAK			
A0A023G500	Putative nidogen (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1				2	2	VSPTSLGSDLR LPEATASLR
A0A023GGH2	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	7	2	ALAQFIR ITQSLAILR	14	4	ALAQFIR ITQSLAILR FTLGLK YPILGPFR
A0A023FIS9	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	9	2	YLAEVATGEQR AYQEAFDISK	9	2	YLAEVATGEQR AYQEAFDISK
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	12	2	YAPDSQLYPK LIFFESGTFLPAQAYFRPK	12	2	EQLNPEFVK LNPQHTVPTINDNGFVLWESR
A0A023FFI9	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	26	4	VFFDVTADGSPLGR HVVFGSVVEGDVVK VIPNFQGGDFTK LVVQSSGQLS			
A0A023FHI8	Putative alpha crystallins OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	21	3	FAINVDTR VPAQQGGTVATPEK RYVLPEDVDPETVK			

TABLE 16 (CONTINUED)

A0A023FI97	Putative cathepsin I-like cysteine proteinase a (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	21	3	ENGGIDTEESYPYEAR EDVGATDTGFVDIK DKDNQGIASSASYPLV			
A0A023FM70	Putative heat shock protein (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	9	5	DAGTIAGLNVLR TFFPEEISSVLIK FEELNADLFR VEIANDQGNR TTPSYVAFTDTER			
A0A023G5I8	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase (Fragment) OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	12	2	YAPDSQLYPK LIFFESGTFLPAQAYFRPK	12	2	EQLNPEFVK LNPQHTVPTINDNGFVLWESR
A0A023FDS6	Thioredoxin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	38	4	VDVDENEEIASR YEISPTFLFIK EKVDEISGANQDIK VDEISGANQDIK			
A0A023FPU5	Putative cathepsin b endopeptidase ixodes scapularis cathepsin b endopeptidase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	9	2	VYSIVGDETQIK GNDEGIEDDINAGIPKE			
A0A023GGH2	Putative glutathione s-transferase ixodes scapularis glutathione s-transferase OS=Amblyomma triste PE=2 SV=1	7	2	ALAQFIR ITQSLAILR	14	4	ALAQFIR FTLGLK

TABLE 16 (CONTINUED)

							ITQSLAILR YPILGPFR
A0A023FIC2	Putative glutathione s-transferase mu class rhipicephalus annulatus glutathione s-transferase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	19	4	APVLGYWDIR YSGPPPDFDR VDITEQQFADFR LYNPDFEK	9	2	LYNPDFEK IEALPHVAAYLK
A0A023FNL5	Putative heat shock 70 kDa protein 5 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	7	2	ITPSYVAFTAEGER SDVDEIVLVGGSTR			
A0A023FMF6	Putative sodium/potassium-transporting atpase subunit alpha OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	3	2	LGTPNSTGLTSQQAR ADIGVAGIAGSDVSK			
A0A023FN97	Catalase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	5	VWPHSEFPLIPVGK DLYNAIANK FSTVGGESGSADTVR DPFFFPSFIHTQK ESSFAVSGDVDR	10	4	FSTVGGESGSADTVR DPFFFPSFIHTQK DLYNAIANK ESSFAVSGDVDR
A0A023FGU1	Superoxide dismutase [Cu-Zn] OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	27	3	HVGDLGNVIAGDDGVAK DSVISLTGEHNIIGR LAGVVGITK			
A0A023FLA5	Putative cysteine proteinase ixodes scapularis cysteine proteinase OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	13	4	YPVGSTVNVDNR			

TABLE 16 (CONTINUED)

				REPLPEEFDAR FLVNYGGVSEDYPYEGAR LSESLPSQFR
A0A023FH01	Uncharacterized protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1*	34	4	DGSEQAEDALGSTK FTPVLAEAYK FGDPFQQELK YGISGIPTLIVVK
A0A023FV27	Uncharacterized protein OS=Amblyomma parvum PE=2 SV=1*	16	2	AGVDVTIAGLGGASPVK LVAAIAPIALK
A0A023FC75	Annexin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	20	6	GFGTDEAAIILAK GAGTDEDLIEILTR TNAEIAIK AVISETSGDFQR ILVSLTSR SVYNTELYFAEK
A0A023FGF9	Profilin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	22	2	TNPSAFNETGIHLGGQK YFLSAENNLVR
A0A023FPQ2	Putative tpa exp: actin depolymerizing factor (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12	2	VIDVETTGDR YVFDFPASIR

TABLE 16 (CONTINUED)

A0A023FJE7	Putative tropomyosin tropomyosin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	12	3	IQLLEEDLER IVELEEEELR EEAYATQISTTAK			
A0A023FIL9	Putative actin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	20	5	SYELPDGQVITIGNER AGFAGDDAPR GYSFTTTAER VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLYANTVLSGGTTYPGIADR	10	3	VAPEEHPVLLTEAPLNPK GYSFTTTAER EITALAPSTK
A0A023FEL7	Putative actin (Fragment) OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1				11	3	VAPEEHPVLLTEAPLNPK GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER
A0A023FHA1	Putative intracellular cystatin OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	22	2	DADATVQEIEK ALEDPIEHFQ	19	2	ALEDPIEHFQ TFDEFTPLK
A0A023FQW8	Putative secreted protein OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	38	7	LYVSVGAWK WGYYEVFR DVVAVAIER AVAWAIGESAGK FQPSTLTGLSTIQR KIDPLTIPAFSFHIR ILKDELPSVAK	38	7	ILKDELPSVAK KIDPLTIPAFSFHIR FQPSTLTGLSTIQR LYVSVGAWK WGYYEVFR DVVAVAIER AVAWAIGESAGK

TABLE 16 (CONTINUED)

A0A023FUP5	Putative glycine-rich cell wall structural protein 1 OS=Amblyomma cajennense PE=2 SV=1	29	6	GLYGLGGLSGLGGYGR
				LGGLYGLGGLSGLGGYGR
				LGGLYGLGGLSGLGGLGGFGR
				LGGLGGYGPFGLGGYGPFGR
				GLSPFGGLGGYGPFGR
				VITDPSTGLPIAQAVYIGVVR

* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas

ANEXO 17

Tabela 17: Sequência dos peptídeos trípticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando o algoritmo PEAKS, contra o banco de dados *Oryctolagus*.

ID	Protein Name	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence
ION TRAP				QTOF			
G1TD51	Histone H4	40	4	ISGLIYEETR TVTAMDVVYALK VFLENVIR DNIQGITKPAIR	48	5	DNIQGITKPAIR TLYGFEGG TVTAMDVVYALKR ISGLIYEETR VFLENVIR
G1SJS1	Histone H2B	25	3	AMGIMNSFVNDIFER EIQTAVR LLLPGELAK			
G1TNB7	Histone H3	10	2	STELLIR EIAQDFK			
G1T8N1	Histone H2B	19	3	HAVSEGTK EIQTAVR LLLPGELAK			
G1TN68	Histone H4	41	5	ISGLIYEETR TVTAMDVVYALK VFLENVIR DNIQGITKPAIR TVTAMDVVYALKR			

TABLE 17 (CONTINUED)

G1U2G1	Histone H2A	18	3	AGLQFPVGR HLQLAIR HLQLAIRNDEELNK			
G1T765	Malate dehydrogenase	17	4	VAVLGASGGIGQPLSLLK IQEAGTEVVKAK IFGVTTLDIR AGAGSATLSMAYAGAR			
G8ZF10	Alpha-globin 1				63	10	AVGHLLDLPALSTLSDLHAHK TYFPHFDFTHGSEIK FLANVSTVLT IGSHGGEYGAEVER MFLGFPTTK MFLGFPTTK FLANVSTVLT VDPVNFK LRVDPVNFK VSEALTK AVGHLLDLPALSTL
G8ZF33	Alpha-globin 1				18	2	AVGHLLDLPALSTLSDLHAHK FLANVSTVLT
G1SKT4	ATP synthase subunit alpha	3	2	AVDSLPIGR APGIIPR			
P01948	Hemoglobin subunit alpha-1/2				15	2	AVGHLLDLPALSTLSDLHAHK FLANVSTVLT

TABLE 17 (CONTINUED)

G1SQA8	ATP synthase subunit beta	9	4	FTQAGSEVSALLGR TVLIMELINNVAK IMNVIGEPIDER IGLFGGAGVGK			
B8K132	Alpha-hemoglobin				64	12	IGSHGGEYGAEVER AVGHLLDLPALSTLSDLHAHK FLANVSTVLTSK TYFPHFDFTHGSEQIK MFLGFPTTK MFLGFPTTK LRVDPVNFK VDPVNFK KVSEALTK AVGHLLDLPALSTLSD DFTHGSEQIK EYGAEVER
G1U9I8	Uncharacterized protein*	9	6	FLEQQNQVLQTK YEELQITAGR TNAENEFVTIK DYQELMNTK LNDLEDALQQAK TNAENEFVTIKK	6	4	FLEQQNQVLQTK TNAENEFVTIK YEELQITAGR TNAENEFVTIKK
G1T4R6	Uncharacterized protein*	9	4	ALEEANTELEVK APSAYGGLSVSSSR LAADDFR LASYLDK			

TABLE 17 (CONTINUED)

G1U9I8	Uncharacterized protein*	9	6	FLEQQNQVLQTK YEELQITAGR TNAENEFVTIK DYQELMNTK LNDLEDALQQAK TNAENEFVTIKK	6	3	TNAENEFVTIKK FLEQQNQVLQTK TNAENEFVTIK
G1T1V0	Uncharacterized protein*	14	9	ALEESNYELEGK SQYEQLAEQNR LENEIQTYR VLDELTLTK IRLENEIQTYR LAADDFR QSLEASLAETEGR VTMQNLNDR LASYLDK			
G1SWF6	Haptoglobin	30	7	SCTVAEYGVYVK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK YVMLPVADQDK TVAEYGVYVK YVMLPVADQDK TFNILDWIK AVGEQLPECEAVCGKPK	31	8	SCTVAEYGVYVK TFNILDWIK YVMLPVADQDK SPVGVQPILNEHTFCAGMSK HNLVTGATLISEQWLLTTAK AVGEQLPECEAVCGKPK VMPICLPSK VMPICLPSKDYTEVGR
G1TUD0	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	11	4	VPTPDVSVVDLTCR IVSNASCTTNCLAPLAK LTGMAFR			

TABLE 17 (CONTINUED)

				YMVYMFK
P46406	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	14	3	IVSNASCTTNCLAPLAK VPTPNVSVVDLTCR GAAQNIIPASTGAAK
Q71V39	Elongation factor 1-alpha 2 (EF-1-alpha-2) (Eukaryotic elongation factor 1 A-2) (eEF1A-2) (Statin-S1)	5	2	IGGIGTVPVGR STTTGHLYK
P62975	Ubiquitin	41	3	TITLEVEPSDTIENVK TLDYNIQK LIFAGK
G1SQ70	Uncharacterized protein*	2	2	AAEVTQSSGTFSTK VEASPQSLCALR
G1U7L4	Uncharacterized protein*	9	5	IINEPTAAAIAYGLDK NELESYAYSLK VEIANDQGMR DAGTIAGLNVMR FDLTGIPPAPR
G1T9M9	Uncharacterized protein*	7	4	IINEPTAAAIAYGLDK TTPSYVAFTDTER DAGTIAGLNVLR VEIANDQGMR
Q07298	Alpha-1-antiproteinase S-1	16	5	IAPSLAEFALSLYR

TABLE 17 (CONTINUED)

				IVDLVQELDAR TLLALVNYVFFK AVLTIDER			
P23035	Alpha-1-antiproteinase F	16	4	IAPSLAEFALSLYR IVDLVQELDAR TLLALVNYVFFK LGITQVFSDNADLSGITEQEPLK AVLTIDER			
Q9BGH4	Beta-actin				18	2	SYELPDGQVITIGNER DLTDYLMK
G1SPU6	Actin, cytoplasmic 1				33	7	GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER EITALAPSTMK DLTDYLMK IWHHTFYNELR DLTDYLMK DLYANTVLSGGTTMYPGIADR
P01870	Ig gamma chain C region	29	9	APSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVK TPEVTCVVVDVSQDD PTCPPPELLGGPSVFIFPPKPK VYTMGPPREELSSR TPSSTVTLGCLVK LSVPTSEWQR DTLMISR DTLMISR			

TABLE 17 (CONTINUED)

				APSVFPLAPCCGD			
G1U9S2	Serum albumin	61	39	LPCVEDYLSVVLNR	47	24	HPYFYAPELLYYAQK
				TVVGFTALLDK			DTYGDVADCCEK
				AFFGHYLYEVAR			KVPQVSTPTLVEISR
				VPQVSTPTLVEISR			AHCIYGLHNDETPAGLPAAVEEFVEDKDVCK
				DTYGDVADCCEK			VLDEFQPLVDEPK
				VLDEFQPLVDEPK			RPCFSALGPDETYVPK
				ACVADESAANCDK			LPCVEDYLSVVLNR
				CCSAEDKEACFAVEGPK			ECCHGDLLECADDR
				SLHDIFGDKICALPSLR			VPQVSTPTLVEISR
				AILTECCEAADK			YMCEHQETISSHLK
				KVPQVSTPTLVEISR			DDKPDLPFARPEADVLCK
				CCSESLVDR			ALISAAQER
				NYEEAKDLFLGK			RHPYFYAPELLYYAQK
				RPCFSALGPDETYVPK			DLFLGK
				SLHDIFGDK			QNCELYEQLGDYNFQNALLVR
				ALISAAQER			ADICTLPETER
				HKPHATNDQLK			LPPFARPEADVLCK
				AILTECCEAADKGACLTPK			CCSAEDKEACFAVEGPK
				FLYEYSR			RHPDYSVLLLLR
				HPYFYAPELLYYAQK			KVPQVSTPTLVEISR
				RHPDYSVLLLLR			DDKPDLPFARPEADVLCK
				FNDVGEEHFIGLVLITFSQYLQK			KQTALVELVK
				ADFTDISK			AFHDDEKAFFGHYLYEVAR
				YMCEHQETISSHLK			AWALVR
				LCVLHEK			
				RHPYFYAPELLYYAQK			

TABLE 17 (CONTINUED)

				QTALVELVK			
				KQTALVELVK			
				ICALPSLR			
				EAHKSEIAHR			
				GACLTPK			
				AYEATLK			
				VHKECCHGDLLECADDR			
				FYAPELLYYAQK			
				EVTDLAK			
				TPVSEK			
				IVTDLTK			
				CCSAEDKEACFAVEGPKL			
				AYEATLKK			
B8K174	Hemoglobin, beta	92	22	FFESFGDLSSANAVMNNPK	95	19	FFESFGDLSSANAVMNNPK
				VLAASFSEGLSHLDNLK			LLGNVLVIVLSHHFGK
				FFESFGDLSSANAVMNNPK			LSELHCDKLHVDPENFR
				KVLAASFSEGLSHLDNLK			VNVEEVGGEALGR
				VVAGVANALAHKYH			KVLAASFSEGLSHLDNLK
				VNVEEVGGEALGR			VLAASFSEGLSHLDNLK
				VVAGVANALAHK			VVAGVANALAHKYH
				LLVVYPWTQR			VVAGVANALAHK
				VLAASFSEGLSHLDNLKGTFK			LLVVYPWTQR
				VLAASFSEGLSHLD			EFTPQVQAAYQK
				EFTPQVQAAYQK			LHVDPENFR
				SAVTALWGK			SAVTALWGK
				LLVVYPWTQRF			LLVVYPW
				GKVNVEEVGGEALGR			FFESF
				VLAASFSEGLSHLDNLKG			GTFK
				LSELHCDKLHVDPENFR			VVAGVANALAH

TABLE 17 (CONTINUED)

				FFESFGDLSSA			SEGLSHLDNLK
				LHVDPENFR			VHLSSEEK
				EVGGEALGR			VLAAF
				VHLSSEEK			FFESFGDLSSANAVMNNPK
				LSELHCDKLHVD			
				LSELHCDK			
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	92	21	VVAGVANALAHKYH	95	20	VLAAFSEGLNHLDNLK
				VNVEEVGGEALGR			LLGNVLVVLSHHFGK
				VVAGVANALAHK			VNVEEVGGEALGR
				LLVVYPWTQR			LSELHCDKLHVDPENFR
				EFTPQVQAAYQK			VNVEEVGGEALGR
				SAVTALWGK			VVAGVANALAHKYH
				LLVVYPWTQRF			FFESFGDLSSAHAVMSNP
				GKVNVEEVGGEALGR			FFESFGDLSSAHAVMSNP
				LSELHCDKLHVDPENFR			KVLAAFSEGLNHLDNLK
				FFESFGDLSSA			VVAGVANALAHK
				LHVDPENFR			FFESFGDLSSAH
				FFESFGDLSSAHAVMSNP			LLVVYPWTQR
				EVGGEALGR			EFTPQVQAAYQK
				VHLSSEEK			LHVDPENFR
				VLAAFSEGLNHLDNLK			SAVTALWGK
				LSELHCDKLHVD			LLVVYPW
				LSELHCDK			VVAGVANALAH
							VLAAFSEGLNHLDNLKGTF
							VHLSSEEK
							VLAAF
G1STF7	Serotransferrin	15	9	EGICPDPLQDECK			
				APEEGYLSVAVVK			

TABLE 17 (CONTINUED)

				SQTVLQNTGGR		
				TFYYAVALVK		
				KPVDEYEQCHLAR		
				YLGADYIK		
				GDVAFVK		
				SAGWNIPIGLLYCDLPEPR		
				EGICPDPLQDECK		
G1THZ6	Actin, cytoplasmic 1	14	8	APSVFPLAPCCGDTPSSTVTLGCLVK		
				TPSSTVTLGCLVK		
				LSVPTSEWQR		
				VYTMGPPR		
				APSVFPLAPCCGD		
				VVSTLPIAHQDWLR		
				DTLMISR		
				VVSTLPIAHQD		
P49065	Serum albumin		26	11	ECCHGDLLECADDR	
					HPYFYAPELLYYAQK	
					QNCELYEQLGDYNFQNALLVR	
					RPCFSALGPDETYVPK	
					DDKPDLPFFARPEADVLCK	
					TFHADICTLPETER	
					FLYEYSR	
					DLFLGK	
					EFNAETFTFHADICTLPETER	
					YLYEVAR	
					SALGPDETYVPK	

* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas

ANEXO 18

Tabela 18: Sequência dos peptídeos tripticos obtidos do intestino de carrapatos machos e fêmeas de *A. sculptum* não alimentados pelas abordagens Ion Trap e QTOF, utilizando os algoritmos MASCOT e SCAFFOLD, contra o banco de dados *Oryctolagus*.

ID	Protein Name	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence	Coverage (%)	Peptides Number	Peptides Sequence
				ION TRAP			
					QTOF		
G1TD51	Histone H4	19	2	VFLENVIR TVTADVYALK	29	3	ISGLIYEETR VFLENVIR TVTADVYALK
G1T8H6	Histone H3	10	2	STELLIR EIAQDFK			
G1T765	Malate dehydrogenase	9	2	IQEAGTEVVKAK AGAGSATLSMAYAGAR			
B8K132	Alpha-hemoglobin	47	5	IGSHGGEYGAEVER FLGFPTTK AVGHLDDLPGALSTLSDLHAHK FLANVSTVLTSK LRVDPVNFK			
G1SQA8	ATP synthase subunit beta	5	2	TVLIELINNVAK FTQAGSEVSALLGR	6	3	IPVGPETLGR IGLFGGAGVGK FTQAGSEVSALLGR
G8ZF33	Alpha-globin 1				48	5	FLGFPTTK TYFPHFDFTHGSEQIK

TABLE 18 (CONTINUED)

							AVGHLDDLPGALSTLSDLHAHK LRVDPVNFK FLANVSTVLTSK
G1U9I8	Uncharacterized protein*	9	5	FLEQQNQVLQTK TNAENEFVTIKK YEELQITAGR LNDLEDALQQAK DYQELMNTK	8	4	FLEQQNQVLQTK TNAENEFVTIKK YEELQITAGR LLRDYQELMNTK
G1T1V0	Uncharacterized protein*	16	9	VTMQNLNDR ALEESNYELEGK LAADDFR QSVEADINGLR VLDELTLTK SQYEQLAEQNR DAEAWFNEK QSLEASLAETEGR LENEIQTYR	5	3	ALEESNYELEGK VLDELTLTK DAEAWFNEK
G1SHY2	Uncharacterized protein*	5	2	VELEAKVNTLTDELNFLR SLDLDSIIAEVK			
G1SWF6	Haptoglobin	15	4	YVLPVADQDK SPVGVQPILNEHTFAGSK STVAEYGVYVK TFNILDWIK			

TABLE 18 (CONTINUED)

G1TJG6	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12	3	IVSNASTTNLAPLAK GAAQNIIPASTGAAK LTGAFR
G1SF46	Uncharacterized protein*	11	2	TITLEVEPSDTIENVK TLDYNIQK
G1T9M9	Uncharacterized protein*	7	4	VEIIANDQGNR TTPSYVAFTDTER DAGTIAGLNVLR FEELNADLFR
G1TZP0	Uncharacterized protein*	8	2	NLLSVAYK YLAEVATGEKR
G1SQ70	Uncharacterized protein*	2	2	LLIYTILPDGEVVGDSK AAEVTQSSGTFSTK
G1TKX3	Uncharacterized protein*	7	3	FLQEIYDSNNQK VTQLEAK ESGLYFLKPLR
A0A0C6G056	IgM light chain	8	2	VTQGTTSVVQSFNR VTQGTTSVVQSFNRGD
G1TBT6	Uncharacterized protein*	1	2	QVTLSPR ALEAAAPR
P29751	Actin, cytoplasmic 1	32	10	AGFAGDDAPR DSYVGDEAQS

TABLE 18 (CONTINUED)

					GILTLK LDLAGR DLTDYLK GYSFTTTAER LYVALDFEQEATAASSSSLEK DLYANTVLSGGTTYPGIADR EITALAPSTK QEYDESGPSIVHR			
G1SPU6	Actin, cytoplasmic 1					26	6	VAPEEHPVLLTEAPLNPK DLTDYLK GYSFTTTAER SYELPDGQVITIGNER DLYANTVLSGGTTYPGIADR EITALAPSTK
P01870	Ig gamma chain C region					11	2	APSVFPLAPGDTPTSSTVTLGLVK LSVPTSEWQR
G1STF7	Serotransferrin	8	5		TFYYAVALVK KPVDEYEQHLAR EGIPDPLQDEK APEEGYLSVAVVK FDEFFR	5	3	TFYYAVALVK EGYYGYTGAFR DLKEEDFELLLDGTR
B8K174	Hemoglobin, beta	86	12		SAVTALW GK VNVEEVGGEALGR LLVVYPWTQR FFESFGDLSSANAVNNPK VLA AFSEGLSHLDNLK	86	12	SAVTALW GK VNVEEVGGEALGR LLVVYPWTQR FFESFGDLSSANAVNNPK KVLA AFSEGLSHLDNLK

TABLE 18 (CONTINUED)

				LHVDPENFR			VLAAFSEGLSHLDNLK
				LLGNVLVIVLSHHFGK			LSELHDKLHVDPENFR
				EFTPQVQAAYQK			LHVDPENFR
				VVAGVANALAHK			LLGNVLVIVLSHHFGK
				VVAGVANALAHKYH			EFTPQVQAAYQK
				LSELHDKLHVDPENFR			VVAGVANALAHK
				KVLAAFSEGLSHLDNLK			VVAGVANALAHKYH
G1U9S2	Serum albumin	39	24	SLHDIFGDK	38	21	SLHDIFGDK
				IALPSLR			IALPSLR
				DTYGDVADEK			DTYGDVADEK
				AFFGHYLYEVAR			AFFGHYLYEVAR
				RHPYFYAPELLYYAQK			HPYFYAPELLYYAQK
				HPYFYAPELLYYAQK			AILTEEAADK
				AILTEEAADK			AILTEEAADKGALTPK
				AILTEEAADKGALTPK			ALISAAQER
				GALTPK			ADFTDISK
				ALISAAQER			EHGDLLEADDR
				ADFTDISK			DLFLGK
				EHGDLLEADDR			FLYEYSR
				EDKPILEK			RHPDYSVVLRL
				FLYEYSR			VLDEFQPLVDEPK
				RHPDYSVVLRL			KVPQVSTPTLVEISR
				VLDEFQPLVDEPK			VPQVSTPTLVEISR
				KVPQVSTPTLVEISR			LPVEDYLSVVLNR
				VPQVSTPTLVEISR			RPFSALGPDETYVPK
				LPVEDYLSVVLNR			EFNAETFTFHADITLPETER
				SESLVDR			QTALVELVK
				RPFSALGPDETYVPK			TVVGFTALLDK
				HKPHATNDQLK			

TABLE 18 (CONTINUED)

				TVVGEFTALLDK EAFAVEGPK			
A0A140TAV6	Hemoglobin subunit beta-1/2	86	4	FFESFGDLSSAHAVSNPK KVLA AFSEGLNHLDNLK VLA AFSEGLNHLDNLK LLGNVLVVLSHHFGK	86	3	FFESFGDLSSAHAVSNPK VLA AFSEGLNHLDNLK LLGNVLVVLSHHFGK
G1THZ6	Uncharacterized protein*	12	4	APSVFPLAPGDTPSSTVTLGLVK DTLMISR VVSTLPIAHQDWLR LSVPTSEWQR			

* Uncharacterized Protein – Proteínas não caracterizadas
