

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO” -
UNESP**

Instituto de Biociências – Campus do Litoral Paulista

LILIANE GOMES DA SILVA

**Caracterização do peptidoma na hemolinfa do camarão *Litopenaeus
vannamei* e análise *in silico* do potencial antimicrobiano**

SÃO VICENTE - SP

2022

Liliane Gomes da Silva

Caracterização do peptidoma na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e análise *in silico* do potencial antimicrobiano.

Monografia apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas com ênfase em Gerenciamento Costeiro pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Orientador: Professor Dr. Leandro Mantovani de Castro

Co-orientadora: Professora Dr^a. Alessandra da Silva Augusto

SÃO VICENTE - SP

2022

S586c

Silva, Liliane Gomes da

Caracterização do peptidoma na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e análise in silico do potencial antimicrobiano / Liliane Gomes da Silva. -- São Vicente, 2022

37 f. : il., tabs.

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, São Vicente

Orientador: Leandro Mantovani de Castro

Coorientadora: Alessandra da Silva Augusto

1. Hemolinfa. 2. Peptídeos Antimicrobianos. 3. Camarão. 4. Espectrometria De Massa. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, São Vicente. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

AGRADECIMENTOS

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus por toda força e sabedoria para que eu pudesse chegar nesse momento podendo superar todos os obstáculos.

A minha família, por sempre ter me apoiado durante os estudos, fazendo o possível e impossível para que eu pudesse permanecer nessa jornada. Em especial ao meu pai, que mesmo nos momentos de dificuldade me incentivou.

Ao Professor Dr. Leandro Mantovani de Castro, que me orientou na condução desta pesquisa. Sou grata por todas as oportunidades oferecidas e pelos momentos de aprendizado durante o estágio que resultou nesse trabalho.

A Professora Dr^a Alessandra da Silva Augusto e sua aluna de doutorado Andressa Cristina Ramaglia da Mota pelo fornecimento, manutenção e coleta da hemolinfa dos animais utilizados neste trabalho.

Aos meus amigos que estão presentes em minha vida desde o ensino médio. Em especial a Beatriz Garcia e João Máximo, os quais colaboraram de diversas maneiras para a realização deste trabalho.

Agradeço aos meus colegas de turma, Gabrielle Sividanes, Leticia Viana, Thiago Delmiro e Vitany Xavier que se tornaram verdadeiros amigos durante a graduação, gostaria de agradecer por cada conversa, cada risada e por todo apoio prestado. Sem dúvidas sem a amizade de vocês não teria chegado a esse momento. Como dizemos, praticamente fizemos essa graduação em grupo.

Por fim, gostaria de agradecer ao meu namorado Miguel, que desde o primeiro dia de aula esteve ao meu lado, e mesmo nos momentos mais difíceis nunca deixou de acreditar em mim. Gostaria de agradecer por todo amor, compreensão, cuidado e atenção que tem comigo, em especial durante a realização desse trabalho.

RESUMO

A resistência aos fármacos com ação antimicrobiana já conhecidos é um problema emergente ao longo dos últimos anos. De acordo com estimativas, até o ano de 2050 cerca de 10 milhões de óbitos poderão ocorrer por ano em decorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes. Nesse sentido se faz necessária a pesquisa e desenvolvimento de novos agentes que possam atuar como antimicrobianos de forma eficaz contra microrganismos resistentes, destacando-se os peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural (PAMs). Peptídeos são moléculas versáteis, que possuem de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos menores que 10 KDa, suas funções são diversas, podendo atuar como hormônios, fatores de crescimento, ou ainda como mecanismos de defesa, como as toxinas, venenos e antimicrobianos. Os peptídeos antimicrobianos compõem o sistema imune inato de uma ampla gama de organismos, desde bactérias até mamíferos. Os crustáceos marinhos são exemplos de organismos que possuem peptídeos antimicrobianos descritos em literatura. Este trabalho utilizou técnicas integradas de peptidômica e ferramentas de bioinformática para caracterização do peptidoma na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*), além da predição *in silico* de possíveis antimicrobianos. Foram analisadas 3 corridas no espectrômetro de massas que resultaram em 3127 sequências peptídicas das quais 555 foram sugeridas como antimicrobianos. Adicionalmente foi identificado que a maioria das sequências são fragmentos pertencentes à região interna das proteínas, enquanto uma pequena parcela corresponde a região C- e N-terminal. Além disso, muitos fragmentos foram provenientes de proteínas relacionadas à resposta imune inata. Nossos dados sugerem que a análise do peptidoma de hemolinfa pode levar à descoberta de novos PAMs.

Palavras-chave: Hemolinfa. Peptídeos Antimicrobianos. Camarão. Espectrometria De Massa.

ABSTRACT

Resistance to known antimicrobial drugs has been an emerging problem in recent years. According to estimates, by the year 2050, about 10 million deaths per year may occur due to infections caused by resistant microorganisms. In this sense it is necessary to research and develop new agents that can act as antimicrobials effectively against resistant microorganisms, highlighting the naturally occurring antimicrobial peptides (AMPs). Peptides are versatile molecules, which have from two to tens of amino acid residues smaller than 10 KDa, their functions are diverse, and can act as hormones, growth factors, or even as defense mechanisms, such as toxins, poisons and antimicrobials. Antimicrobial peptides make up the innate immune system of a wide range of organisms, from bacteria to mammals. Marine crustaceans are examples of organisms that have antimicrobial peptides described in literature. This work used integrated peptidomics techniques and bioinformatics tools to characterize the peptidome in the hemolymph of *Litopenaeus vannamei* (*L. vannamei*), as well as *in silico* prediction of possible antimicrobials. Three mass spectrometer runs were analyzed resulting in 3127 peptide sequences of which 555 were suggested as antimicrobials. Additionally, it was identified that most of the sequences are fragments belonging to the internal region of the proteins, while a small portion corresponds to the C- and N-terminal region. In addition, many fragments came from proteins related to the innate immune response. Our data reveal that hemolymph peptidome analysis may lead to the discovery of new AMPs.

Keywords: Hemolymph. Antimicrobial Peptides. Shrimp. Mass Spectrometry.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	8
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Obtenção dos animais e coleta da hemolinfa	15
3.2 Peptidoma	15
3.2.1 Preparo de extratos peptídicos de hemolinfa	15
3.2.2 Dosagem de peptídeos totais através do reagente fluorescamine	16
3.2.3 Cromatografia líquida e espectrometria de massas	16
3.2.4 Análises de Bioinformática	16
4. RESULTADOS	18
4.1 Peptidoma	18
4.1.1 Quantificação total dos extratos de peptídeos por fluorescamine	18
4.1.2 Caracterização do perfil peptídico dos extratos	18
4.2 Análise <i>in silico</i> das sequências peptídicas para sua caracterização como possíveis antimicrobianos	21
5. DISCUSSÃO	22
6. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31
ANEXOS	36
Anexo 1 - Tabela Suplementar 1	36
Anexo 2 - Tabela Suplementar 2	36

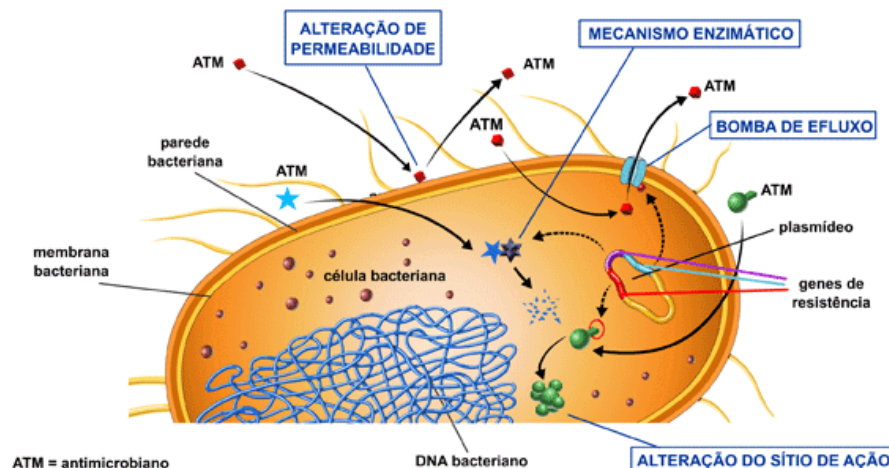
1. INTRODUÇÃO

A descoberta de agentes que atuam combatendo microrganismos representou um grande avanço para a sociedade, mas o uso descontrolado desses agentes culminou no que atualmente representa um dos grandes desafios no âmbito da saúde pública: a resistência de microrganismos a fármacos tradicionais (Waclaw, 2016; Murray et al., 2022). De acordo com a Organização Mundial de Saúde estima-se que até o ano de 2050 cerca de 10 milhões de pessoas por ano poderão vir a óbito em decorrência de infecções causadas por microrganismos resistentes (ANVISA, 2020). Murray e colaboradores (2022) estimaram que em 2019 cerca de 4,95 milhões de mortes foram causadas em decorrência da resistência antimicrobiana.

Os antimicrobianos são substâncias que atuam inibindo o crescimento ou até mesmo provocando a morte de bactérias, vírus, parasitas e fungos. Para tal, estes agentes dispõem de diversas estruturas e mecanismos distintos entre si (Elvino; Machado; Sprinz, 2013). Atualmente são conhecidas cerca de 20 classes de antimicrobianos, sendo que destas as mais relevantes no âmbito clínico são os beta-lactâmicos (que incluem as penicilinas, cefalosporinas, carbapenêmicos e monobactâmicos), macrolídeos, glicopeptídeos, aminoglicosídeos, quinolonas, tetraciclina e sulfonamidas (ANVISA, 2007; Elvino; Machado; Sprinz, 2013).

Por sua vez, o uso inadequado tanto no ambiente clínico e em outras atividades, como agricultura e criação de animais, favorece o desenvolvimento da resistência dos microrganismos contra os fármacos já conhecidos (Elvino; Machado; Sprinz, 2013). De forma geral a resistência pode ser definida como a habilidade do patógeno se desenvolver na presença da droga, e essa pode se dar por múltiplos fatores, dentre os quais se destacam: o organismo patógeno, agente antimicrobiano, interação com o ambiente e o paciente em questão (Oliveira; Silva, 2009). A resistência de microrganismos pode ser inata ou adquirida (Giedraitiene et al., 2011) sendo os principais mecanismos utilizados por parte dos agentes infecciosos: inibição enzimática, tendo como exemplo as bactérias produtoras de beta-lactamases; alteração do sítio de ação, redução da afinidade pela membrana ou efluxo ativo (ANVISA, 2007; Elvino; Machado; Sprinz, 2013; Giedraitiene et al., 2011) (Figura 1). Cabe ressaltar que estes mecanismos estão relacionados com mutações celulares e transferência de genes (Giedraitiene et al., 2011).

Figura 1 – Mecanismos de resistência por parte dos microrganismos
Mecanismos de resistência bacteriana



Fonte: ANVISA, 2007

Diante deste problema surge a necessidade do desenvolvimento de novos possíveis terapêuticos, principalmente aqueles que podem ser eficazes contra microrganismos resistentes. Nesse cenário destacam-se os peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural (PAMs) (Rosa, 2007; Wang, 2015).

Peptídeos são polímeros que possuem em sua estrutura de dois a dezenas de resíduos de aminoácidos menores que 10 KDa, os quais estão ligados entre si através das ligações peptídicas (Machado et al., 2004; Marzzoco; Torres, 2017). A nomenclatura dos peptídeos varia conforme o número de aminoácidos presentes em sua cadeia; resíduos que contêm até 30 aminoácidos são denominados oligopeptídeos, enquanto aqueles que apresentam número superior a 30 são chamados de polipeptídeos (Marzzoco; Torres, 2017).

Os peptídeos apresentam além do agrupamento R dos aminoácidos, um grupo amino livre na região denominada amino terminal e um grupamento carboxila livre na outra extremidade, denominada carboxila terminal (Marzzoco; Torres, 2017). São moléculas quimicamente versáteis, uma vez que podem apresentar modificações em suas estruturas terminais, como as amidações e esterificações na região carboxilo terminal e acetilação no grupo amino terminal (Machado et al., 2004).

As funções apresentadas pelos peptídeos são diversificadas. Podem atuar como moléculas de sinalização, por exemplo os hormônios, fatores de crescimento e neuropeptídeos, ou ainda como mecanismos de defesa, tendo por exemplo as toxinas, venenos e os peptídeos antimicrobianos (Machado et al., 2004; Fricker, 2010; Marzzoco; Torres, 2017).

Os peptídeos mais estudados pela peptidômica em trabalhos mais antigos são os denominados neuropeptídeos, os quais são sintetizados de forma clássica, ou seja, são secretados por células e atuam na comunicação celular. Durante a síntese destes peptídeos ocorre o processamento das proteínas no Complexo de Golgi, o qual é mediado por ação de enzimas (Fricker, 2010; Fricker et al., 2012).

Contudo, o avanço das técnicas peptidômicas permitiram a identificação dos chamados peptídeos intracelulares, os quais são gerados por meio da degradação de proteínas mitocondriais, nucleares ou citosólicas (Fricker, 2010; Fricker, et al., 2012; De Araújo et al., 2019). Os principais mecanismos envolvidos no processamento de peptídeos intracelulares são a via da ubiquitina-proteassoma (*ubiquitin-proteasome*) e as oligopeptidases THOP1 (Ferro et al., 2014; De Araújo et al., 2019) e Neurolisina (De Araújo et al., 2019). Atualmente já foram identificados peptídeos intracelulares em diversos organismos como plantas, peixes (*zebrafish*), células e tecidos humanos e roedores, sendo que muitas vezes estes peptídeos apresentam atividade farmacológica (De Araújo et al., 2019).

Nas últimas décadas o estudo de peptídeos com ação antimicrobiana aumentou significativamente. Os peptídeos antimicrobianos são componentes inatos do sistema imune de diversos organismos, desde os mais primitivos, como as bactérias, até os mamíferos (Wang, 2015). As estruturas e tamanhos dos peptídeos antimicrobianos variam entre os grupos, mas é importante destacar que a maioria é anfifílica, ou seja, apresentam uma região hidrofílica e outra hidrofóbica (Destoumieux et al., 2000). Ademais os AMP têm mecanismos de ação antimicrobicida que poucas vezes são capazes de induzir resistência por parte dos microrganismos, sendo que os mecanismos de ação mais descritos envolvem a formação de poros ou ação detergente (Bulet; Stocklin; Menin, 2004; Destoumieux et al., 2000; Toke, 2005).

Nos crustáceos marinhos já foram descritos diversos grupos de peptídeos antimicrobianos. Como exemplo tem-se as taquiplesinas, extraídas primariamente de caranguejos ferradura (*Tachypleus tridentatus*) (Iwanaga; Lee, 2005) e as defensinas, também isoladas de caranguejo ferradura (*Tachypleus tridentatus*) (Saito et al., 1995) e lagosta vermelha (*Panulirus argus*) (Montero-Alejo et al., 2012). Na espécie *Litopenaeus vannamei* foram descritos peptídeos capazes de atuar como agentes antimicrobianos e até mesmo atenuar células tumorais (Destoumieux et al., 2000; Liu et al., 2018; Yang et al., 2018).

O camarão branco do Pacífico (*L. vannamei*) pertence ao filo Arthropoda, e se insere ainda dentro do subfilo Crustacea, que possui como características um corpo composto por um

céfalo e um tronco pós cefálico longo, tronco dividido e dois tagmas mais ou menos bem definidos, presença de um escudo cefálico (ou carapaça), apêndices poliarticulados e larva em forma de náuplio. A ordem Decapoda, na qual se inserem, é composta por crustáceos com alto nível de organização e com ampla diversidade, compreendendo os caranguejos, camarões, lagostas e lagostins (Vieira, 2008; Brusca et al., 2018).

Os peptídeos antimicrobianos dos crustáceos, assim como de outros invertebrados, são sintetizados nos hemócitos, os quais podem ser comparados de forma análoga aos glóbulos brancos. Os hemócitos representam cerca de 99% das células circulantes na hemolinfa e se apresentam em 3 tipos celulares morfológicos distintos: hialino, granular, também chamado de grânulo grande e semi granular, também chamado de pequeno grânulo. Nos grânulos estão armazenadas diversas moléculas de defesa que apresentam papel fundamental na função imunológica desses indivíduos (Zanjani et al., 2018).

É na hemolinfa que os peptídeos são liberados quando há presença de estímulo causado geralmente por agentes infecciosos (Zanjani et al., 2018). A hemolinfa nos crustáceos é semelhante em função ao plasma sanguíneo dos seres humanos. É um fluido que apresenta como pigmento respiratório a hemocianina, o qual é responsável pelo transporte de oxigênio para os tecidos. O íon metálico encontrado na hemocianina é o cobre, o que confere uma aparência azulada a esse fluido. Além do transporte de oxigênio, é na hemolinfa que ocorre transporte de nutrientes, hormônios e excretas (Vieira, 2008; Brusca et al., 2018).

A hemolinfa também é responsável por abrigar os componentes do sistema imunológico, isto ocorre devido a sua fluidez e capacidade de atingir os tecidos. Alguns dos mecanismos de defesa conhecidos dos crustáceos são a coagulação da hemolinfa, mediada por hemócitos, atividades antibacterianas, antifúngicas e antivirais mediadas por peptídeos e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (Iwanaga; Lee, 2005; Vieira, 2008; Zanjani et al., 2018).

Os PAMs descritos até o momento em *L. vannamei* são geralmente pequenas moléculas catiônicas e anfipáticas, com cerca de 150 a 200 resíduos de aminoácidos. Devido a essas características os peptídeos são capazes de se ligarem aos microrganismos, desestruturando sua membrana por agirem como um detergente sobre ela (Destoumieux et al., 2000; Liu et al., 2018). Como supracitado, esse mecanismo de ação quando comparado ao de fármacos já conhecidos raramente induz a resistência (Liu et al., 2018). De acordo com a revisão bibliográfica existem 3 classes de peptídeos antimicrobianos em camarões peneídeos: as

peneidinas, as crustinas e os fatores anti-lipossacarídeos (Rosa, 2007; De La Vega et al., 2008; Sun et al., 2021).

As peneidinas constituem uma família de peptídeos antimicrobianos, pois possuem características em sua estrutura as quais são singulares (Destoumieux et al., 1997). A atividade foi descrita como antibacteriana e antifúngica (especialmente fungos filamentosos). Possuem de 5,28 a 6,62 kDa, sendo moléculas catiônicas que apresentam uma região amino terminal rica em resíduos de prolina (Pro) e uma região carboxi-terminal que apresenta seis resíduos de cisteína (Cys) ligados por meio de três pontes dissulfeto (Destoumieux et al., 2000). Inicialmente foram descritos na hemolinfa de *L. vannamei* e posteriormente foram descritos peptídeos pertencentes a esta família em outros camarões peneídeos.

Os subgrupos das peneidinas são codificados por genes específicos e são divididos em PEN2, PEN3 E PEN4, cada qual com suas isoformas. A ampla diversidade de isoformas presentes nos subgrupos pode ser explicada devido ao polimorfismo de cada um dos genes distintos que codificam cada subgrupo. As peneidinas são sintetizadas como moléculas precursoras, contendo um peptídeo sinal que apresenta cerca de 20 aminoácidos. O peptídeo sinal passa por uma clivagem, que é sucedida pela amidação do domínio C-terminal (Rosa, 2007).

As Crustinas são peptídeos antimicrobianos encontrados nos hemócitos. Apresentam massa molecular que varia entre 7 e 14 kDa e se caracterizam por serem moléculas catiônicas e hidrofóbicas (Zanjani et al., 2018). Na região amino terminal é encontrado um peptídeo sinal, o qual contém cerca de 16 a 24 aminoácidos (Zanjani et al., 2018), além disso essa região é rica em glicina nos camarões (*Gly*) (Rosa, 2007; Zanjani et al., 2018), arginina (*Arg*) ou prolina (*Pro*) (Zanjani et al., 2018). Já a região carboxi terminal é compactada devido as 4 ligações por pontes dissulfídicas, sendo que estas são semelhantes ao domínio WAP (*whey acidic protein*) (Zanjani et al., 2018), o que pode indicar uma atividade de inibição de proteases (Rosa, 2007). O domínio WAP é descrito na literatura como responsável pela atividade antimicrobiana pois está conservado nas subclasses desta família (Zanjani et al., 2018). Ademais, na região C terminal são encontrados resíduos de cisteína (Cys) em abundância (Rosa, 2007).

A atividade antibacteriana das Crustinas (CRUS) é maior para bactérias gram-positivas, entretanto é possível encontrar isoformas que também são capazes de atuar contra bactérias gram-negativas em camarões da espécie *Penaeus monodon* (Krusong et al., 2012; Arayamethakorn et al., 2017). Foram identificados 3 tipos de Crustinas: tipo I, II e III. Embora

a presença de um único domínio WAP na região C-terminal seja comum a todos, as diferenças que caracterizam cada tipo se encontram na região que se insere entre o domínio WAP e o peptídeo sinal. No tipo I são frequentemente encontrados resíduos de cisteína (*Cys*), enquanto no tipo II são encontrados resíduos anfipáticos de glicina (*Gly*). Já o tipo III apresenta resíduos de prolina (*Pro*) e arginina (*Arg*) (Zanjani et al., 2018).

Por fim, os Fatores Anti-lipossacarídeos (ALF) são peptídeos antimicrobianos isolados primeiramente de caranguejos ferradura (De La Vega et al., 2008). Nos camarões peneídeos como *L.vannamei* foram encontradas moléculas homólogas aos ALF presentes nos limulídeos, apresentando dois resíduos de cisteína (*Cys*) conservados (Rosa, 2007; De La Vega et al., 2008). Os ALF apresentam domínio de ligação ao lipossacarídeo (LPS), molécula encontrada na parede de bactérias, sendo que esse domínio é importante para neutralizar o LPS. Em relação ao seu espectro de ação, são mais eficazes contra bactérias gram-negativas (devido ao domínio de ligação LPS) e a fungos filamentosos (De La Vega et al., 2008; Sun et al., 2021).

Justificativas

A resistência aos antimicrobianos é um problema emergente no mundo atualmente e a descoberta de novos fármacos não acompanha tal problema. Apesar do aumento de estudos sobre os peptídeos antimicrobianos naturais, a compreensão em relação a seus mecanismos de ação e formação ainda são limitadas. Nesse sentido é necessária a exploração de técnicas de geração e produção mais eficientes desses PAMs, sendo os programas de bioinformática uma ótima ferramenta para a descoberta de novas sequências (Yang et al., 2018).

2. OBJETIVOS

O presente trabalho visa a caracterização *in silico* de possíveis peptídeos antimicrobianos naturais presentes na hemolinfa de *Litopenaeus vannamei*, uma vez que esses são pouco capazes de induzir a resistência por parte dos microrganismos tornando-se uma alternativa terapêutica futura. Neste trabalho foram utilizadas técnicas integradas, como espectrometria de massas e softwares de bioinformática, ferramentas úteis na predição de novas sequências com potencial antimicrobiano.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos animais e coleta da hemolinfa

Espécimes adultos de *L. vannamei* foram obtidos de uma fazenda de camarão localizada no estado de Santa Catarina, coletados com o auxílio de rede de tarrafas nos viveiros. Os animais foram transportados em caixas de polipropileno contendo água do local de coleta sobre aeração constante para o Laboratório de Aquicultura Sustentável/UNESP em São Vicente, SP. As variáveis da água do local de coleta como salinidade, pH e temperatura foram verificadas, respectivamente, com refratômetro, pHmetro e termômetro. Os animais foram aclimatados às condições laboratoriais em aquários contendo água com salinidade 30, pH 8,0 e temperatura 25 °C durante quatro dias antes do início da coleta de hemolinfa. Os camarões foram alimentados com ração comercial de camarão marinho (Guabi 35%), com cerca de 5% da biomassa total uma vez ao dia. Os experimentos foram realizados com um número mínimo de cinco animais (N = 5). Os camarões utilizados estavam todos em fase de intermuda.

Com o auxílio de uma seringa com agulha 24G foram coletados 50-100 µL de hemolinfa de cinco animais e imediatamente transferidos para um tubo de microcentrífuga 950 µL contendo solução anticoagulante (acrescido de 50 µl de inibidor de protease), sendo os animais e as amostras mantidos no gelo durante todo o processo.

3.2 Peptidoma

3.2.1 Preparo de extratos peptídicos de hemolinfa

As amostras de hemolinfa foram sonicadas três vezes de 20 pulsos de um segundo a 4 Hz, resfriadas a 4°C no gelo por quarenta minutos, posteriormente acidificadas com HCl para uma concentração final de 10 mM e centrifugadas a 15000 x g por 40 minutos a 4°C. Depois deste ponto, os sobrenadantes foram filtrados em membrana *Millipore* que permite a passagem de moléculas com peso molecular inferior a 10 KDa (Amicon Ultra, Millipore, EUA). Os eluatos não retidos pela membrana foram aplicados em pré-colunas C18 (OASIS – Waters, UK), lavado com água deionizada e eluído com acetonitrila 100% contendo 0,15% de ácido trifluoracético (TFA). Os volumes das amostras foram concentrados para 5 µL em uma centrífuga a vácuo e estocados a -80°C.

3.2.2 Dosagem de peptídeos totais através do reagente fluorescamine

Os peptídeos foram ressuspensos em 100µL e quantificados por um método fluorimétrico, utilizando o reagente fluorescamina (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA - C₁₇H₁₀O₄) como previamente descrito (Castro et al., 2010). Este método consiste na ligação de uma molécula de fluorescamina às aminas primárias presentes nos resíduos de lisina (K) e no N-terminal dos peptídeos. As concentrações de peptídeos nas amostras desconhecidas foram determinadas através de uma curva padrão utilizando o peptídeo 5A (LTLRTKL) como padrão. Para a realização desses experimentos, uma placa branca opaca de 96 poços (Corning Incorporated, NY, USA) foi utilizada. Em cada poço foram misturados 2,5 µL de amostra, 25 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6.8) e 12,5 µL de solução de fluorescamine 0,3 mg/mL diluída em acetona. Após a aplicação de todas as amostras, a placa foi agitada por 1 minuto e acrescentado 110 µL de água para estabilizar a reação. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda 370 nm (excitação) e 480 nm (emissão).

3.2.3 Cromatografia líquida e espectrometria de massas

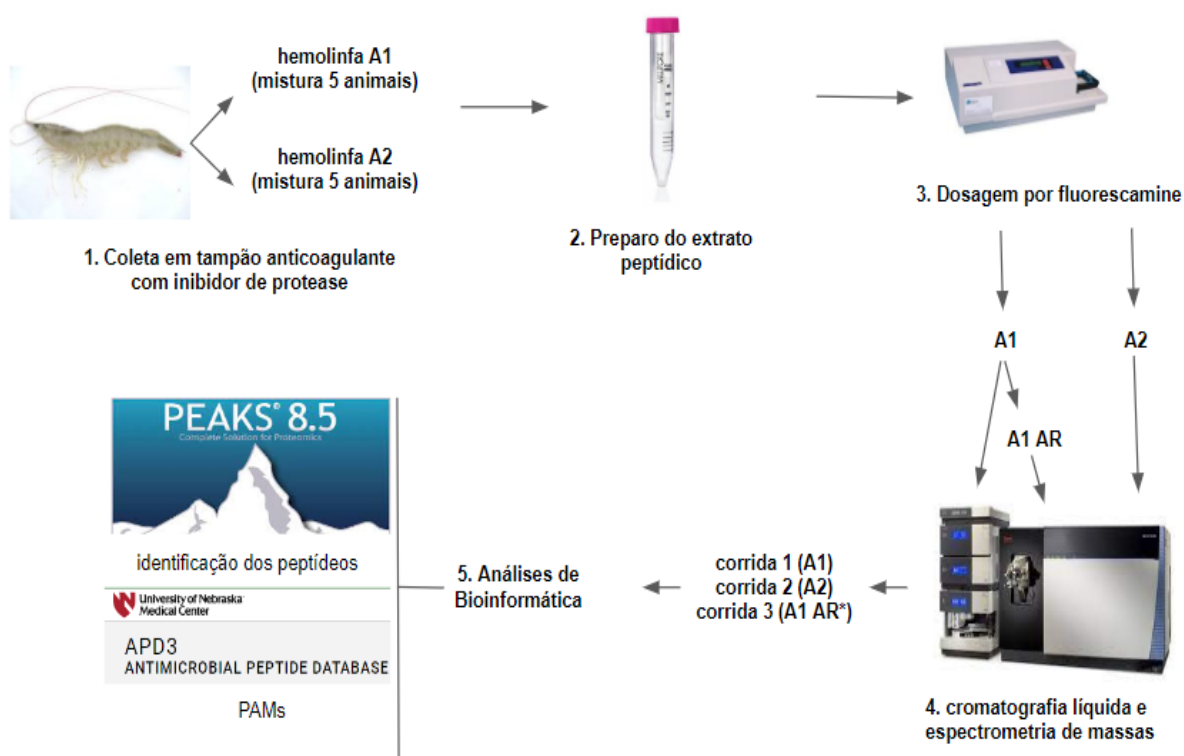
As amostras de peptídeos foram ressuspensas em volume de água apropriado e o equivalente a 5µg de cada amostra submetida à análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS/MS). As misturas peptídicas foram separadas em gradiente de eluição de 0- 85% de uma mistura água/acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico, em coluna capilar de 75 µm empacotada com sílica C-18. Os dados foram adquiridos automaticamente em modo dependente de aquisição (DDA) após geração de múltiplos peptídeos protonados por ionização em electrospray (ESI), seguido de dissociação em MS/MS por colisão com argônio em intensidade de 10 a 30 eV. Condições típicas de LC e ESI foram: fluxo de 600 nL/min, voltagem no capilar do nanofluxo de 3.5 kV, temperatura do bloco de 80°C, e voltagem do cone de 100 V.

3.2.4 Análises de Bioinformática

Os arquivos de dados brutos (.raw) gerados pelo espectrômetro de massas foram submetidos à pesquisa no banco de dados de proteínas do NCBI (palavra chave: *Penaeus vannamei*, com 60298 itens) usando o software PEAKS Studio (versão 8.5; Bioinformatics Solution, Waterloo, Canadá) (Ma et al., 2003; Zhang et al., 2012). Os parâmetros de pesquisa utilizados foram: sem especificidade enzimática; tolerância de massa do precursor ajustada para ± 30 ppm e massa dos íons de fragmentação (tolerância de $\pm 0,5$ Da); Metionina oxidada

(+15,99 Da) e acetilação (+42,01 Da) foram definidas como modificações variáveis. Os peptídeos identificados foram então classificados por sua média de confiança local para selecionar os melhores espectros para anotação e filtrados por $FDR \leq 5\%$. Adicionalmente, os peptídeos foram analisados quanto às suas características estruturais de PAMs com uma ferramenta de predição disponível na base de dados APD 3 (Wang et al., 2016). Por fim, para análise das semelhanças entre as amostras, diagramas de Venn foram construídos a partir da ferramenta RStudio (RStudio team, 2022).

Figura 2 - Fluxograma experimental das etapas do projeto.



AR*: amostra alquilada e reduzida. Fonte: Autoria própria.

4. RESULTADOS

4.1 Peptidoma

4.1.1 Quantificação total dos extratos de peptídeos por fluorescamine

Primeiramente foi realizado um procedimento para dosagem da concentração total de peptídeos com o reagente fluorescamine a fim de verificar o rendimento da extração peptídica nos extratos de hemolinfa (Tabela 1). As concentrações obtidas foram suficientes para a análise por espectrometria de massas.

Tabela 1 - Concentração total de peptídeos nas amostras

Amostras	Concentração ($\mu\text{g}/(\mu\text{L})$)	Quantidade total (μg)
A1	1,33	133
A2	2,35	235

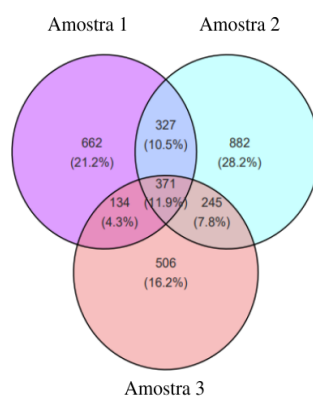
Fonte: autoria própria.

4.1.2 Caracterização do perfil peptídico dos extratos

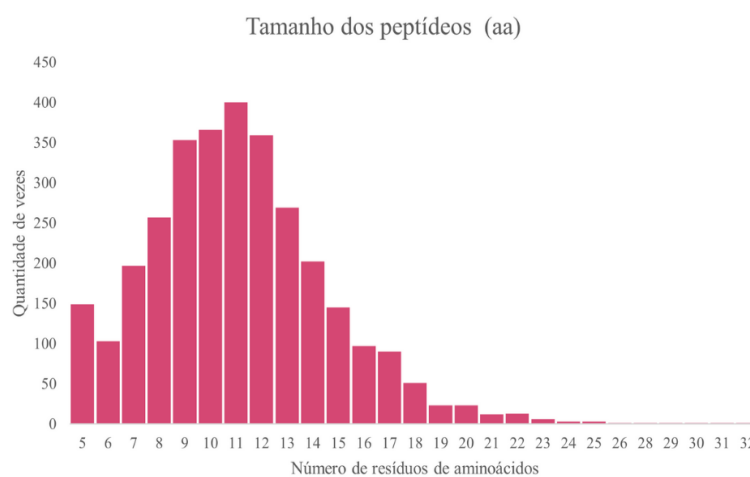
Através do programa Peaks Studio, 3127 sequências distintas de peptídeos foram identificadas quando consideradas as três corridas analisadas no espectrômetro de massas (Figura 3, item A; Anexo 1 - Tabela Suplementar 1). O tamanho dos fragmentos identificados variou de 5 a 32 resíduos de aminoácidos (Figura 3, item B), provenientes de 296 grupos de proteínas precursoras, das quais 19 proteínas ainda não estão completamente caracterizadas no banco de dados de *Litopenaeus vannamei* (Anexo 1 - Tabela Suplementar 1). A maioria das sequências identificadas (92,48%) eram fragmentos correspondentes a região interna das proteínas precursoras, enquanto apenas 4,16% e 3,36% correspondiam a região do N- e C-terminal, respectivamente (Figura 3, item C). Os aminoácidos mais frequentes no resíduo N-terminal dos peptídeos gerados foram *Asp*, *Leu*, *Glu* e *Ile*, enquanto *His*, *Met*, *Gln* e *Trp* foram os menos abundantes (Figura 4, item A). Quanto aos aminoácidos presentes nos sítios de clivagem adjacentes de cada peptídeo, tanto na posição “*upstream*” como “*downstream*” (resíduo P1), os mais abundantes foram *Arg* e *Lys*, seguido de *Leu* e *Phe* (Figura 4, item B).

Figura 3 - Perfil peptídico na hemolinfa de *L. vannamei*.

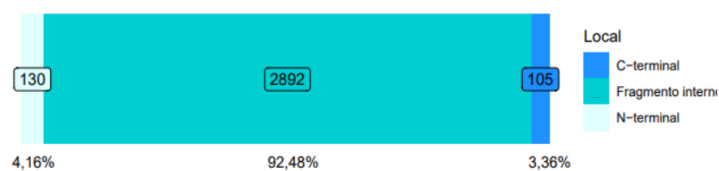
A



B



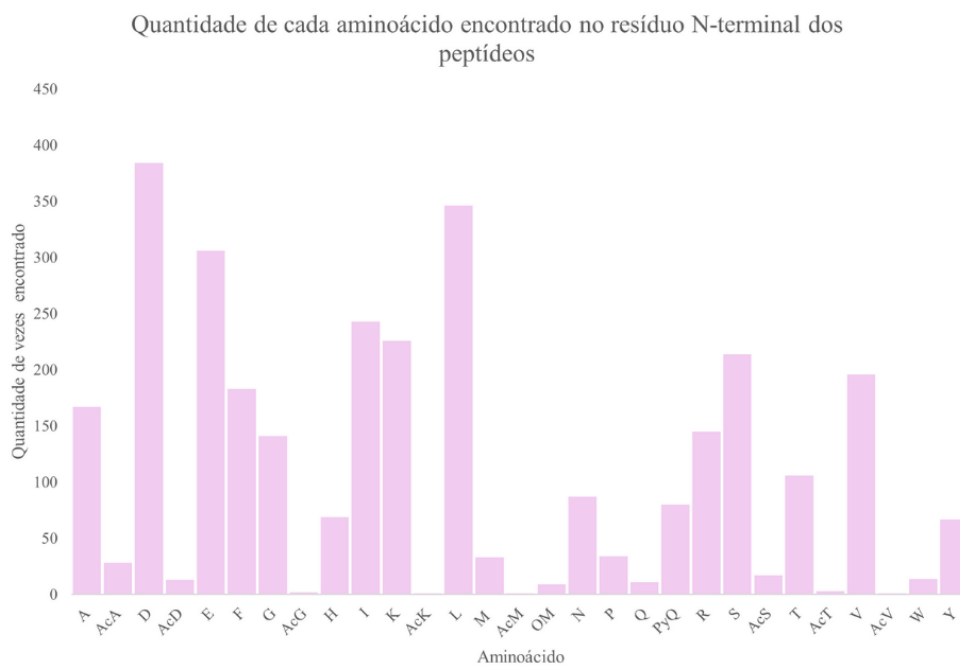
C



Em **A**, o Diagrama de Venn mostra a quantidade de peptídeos identificados nas corridas analisadas. Em **B**, a distribuição dos peptídeos identificados quanto ao tamanho do número de resíduos de aminoácidos (aa). Em **C** distribuição da localização dos peptídeos em suas proteínas precursoras. Fonte: autoria própria

Figura 4 - Análise dos sítios de clivagem para geração dos peptídeos.

A



B



No item **A**, número total de vezes que cada aminoácido estava presente no N-terminal dos peptídeos identificados. No item **B**, o número de vezes que cada aminoácido ocorreu na posição P1 do sítio de clivagem está indicado para os sítios *upstream* e *downstream* adjacentes ao peptídeo. Fonte: autoria própria.

4.2 Análise *in silico* das sequências peptídicas para sua caracterização como possíveis antimicrobianos

Para avaliar se os peptídeos identificados apresentavam possíveis características de peptídeos antimicrobianos, foi utilizada uma ferramenta de predição, o “*Antimicrobial Peptide Calculator and Predictor*”, disponível em uma base de dados, o APD3 (*Antimicrobial Peptide Database*), da Universidade de Nebraska (Wang et al., 2016). Esta ferramenta leva em consideração parâmetros como: porcentagem de resíduos de aminoácidos hidrofóbicos, tamanho das sequências, formação de estruturas secundárias como alfas hélice e folhas beta, presença de cisteínas com formação de pontes de dissulfeto, entre outros, com objetivo de sugerir se as sequências submetidas ao programa possuem um determinado conjunto de características presentes em peptídeos descritos com atividade antimicrobiana. Como existe uma diversidade estrutural entre os PAMs, o programa aponta as características presentes em cada sequência submetida, sugerindo se o peptídeo pode ser um candidato trazendo informações específicas nos resultados.

Das 3127 sequências analisadas na ferramenta, 555 peptídeos foram sugeridos como um possível peptídeo antimicrobiano por apresentar tamanho, formação de alfa hélice, % de resíduos hidrofóbicos e quantidade destes resíduos presentes na mesma superfície para interação com membranas, enquanto 1386 sequências não apresentaram estas principais características. Adicionalmente, o programa sugeriu que 16 sequências apresentaram cisteínas com formação de pontes de dissulfeto, um dos tipos de estrutura encontradas em diversas classes de peptídeos antimicrobianos. Para outras 35 sequências, o programa informou a presença de carga líquida dos aminoácidos fora da faixa esperada para os PAMs, apesar destes apresentarem uma porcentagem de resíduos hidrofóbicos suficientes e formação de alfa hélices. Neste caso, o programa sugeriu que estes peptídeos poderiam ser um novo membro de PAMs diferente daqueles presentes no APD3. Além disso, um dos fragmentos peptídicos identificados já consta na base de dados do APD3 com atividade antimicrobiana descrita. Para o restante dos peptídeos nenhuma sugestão foi apontada, pois esses peptídeos não apresentavam um ou outro parâmetro analisado. Os dados completos das análises de predição para cada peptídeo estão demonstrados no Anexo 2 - Tabela Suplementar 2.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo é o primeiro a obter dados do perfil peptídico na hemolinfa do camarão *L. vannamei*, de fragmentos gerados naturalmente durante o metabolismo proteico, considerando tanto as sequências de proteínas extracelulares bem caracterizadas na hemolinfa (Fredrick; Ravichandran, 2012; Gianazza et al., 2021), assim como os fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares provenientes dos hemócitos, principais células circulantes neste fluido.

A maioria dos estudos de peptidoma da hemolinfa de crustáceos são focados na identificação e modulação de neuropeptídeos (Behrens; Chen; Li, 2008; Chen et al., 2009; Delaney et al., 2022), ou na caracterização de algumas classes específicas de peptídeos utilizando diferentes métodos, como no caso das penaeidinas, mas sem a realização de uma abordagem global (Destoumieux et al., 2000; Muñoz et al., 2003). Contudo, nas últimas décadas tem sido demonstrado em diferentes amostras de células e tecidos, de plantas a animais, a presença de peptídeos provenientes de proteínas residentes em diferentes compartimentos celulares como citoplasma, núcleo e mitocôndria, os chamados peptídeos intracelulares (Dasgupta et al., 2016; De Araujo et al., 2019; Fesenko et al., 2015; Fricker, 2010; Tavormina et al., 2015). Algumas dezenas desses peptídeos intracelulares têm demonstrado atividade biológica. Como exemplos, podemos citar: a melhora de parâmetros metabólicos em modelo de obesidade induzida por dieta (Reckziegel et al., 2017; Silvério et al., 2022), efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelo experimental de artrite (Camargo et al., 2021), morte celular em linhagens de células cancerígenas (De Araujo et al., 2014), dentre outros. Neste sentido, identificar e compreender o processamento proteolítico destes fragmentos, podem levar à descoberta de funções diferentes de suas proteínas precursoras.

Quando analisados aspectos relacionados à proteólise a maioria dos peptídeos encontrados nas amostras foram majoritariamente fragmentos da região interna da sequência de aminoácidos das proteínas precursoras (92,5%) e apenas 7,5 % eram de regiões N- e C-terminal, sendo que os aminoácidos *Arg* e *Lys* foram os mais presentes em P1. Uma metanálise de peptidoma de fluidos humano demonstrou que pelo menos para o soro e lágrima, há uma preferência por *Arg* e *Lys* na posição P1, aminoácidos carregados positivamente (Magalhães et al., 2018). Esta abundância de fragmentos internos das proteínas precursoras e a frequência dos resíduos de aminoácidos observados no sítio de clivagem em nossas análises podem refletir o

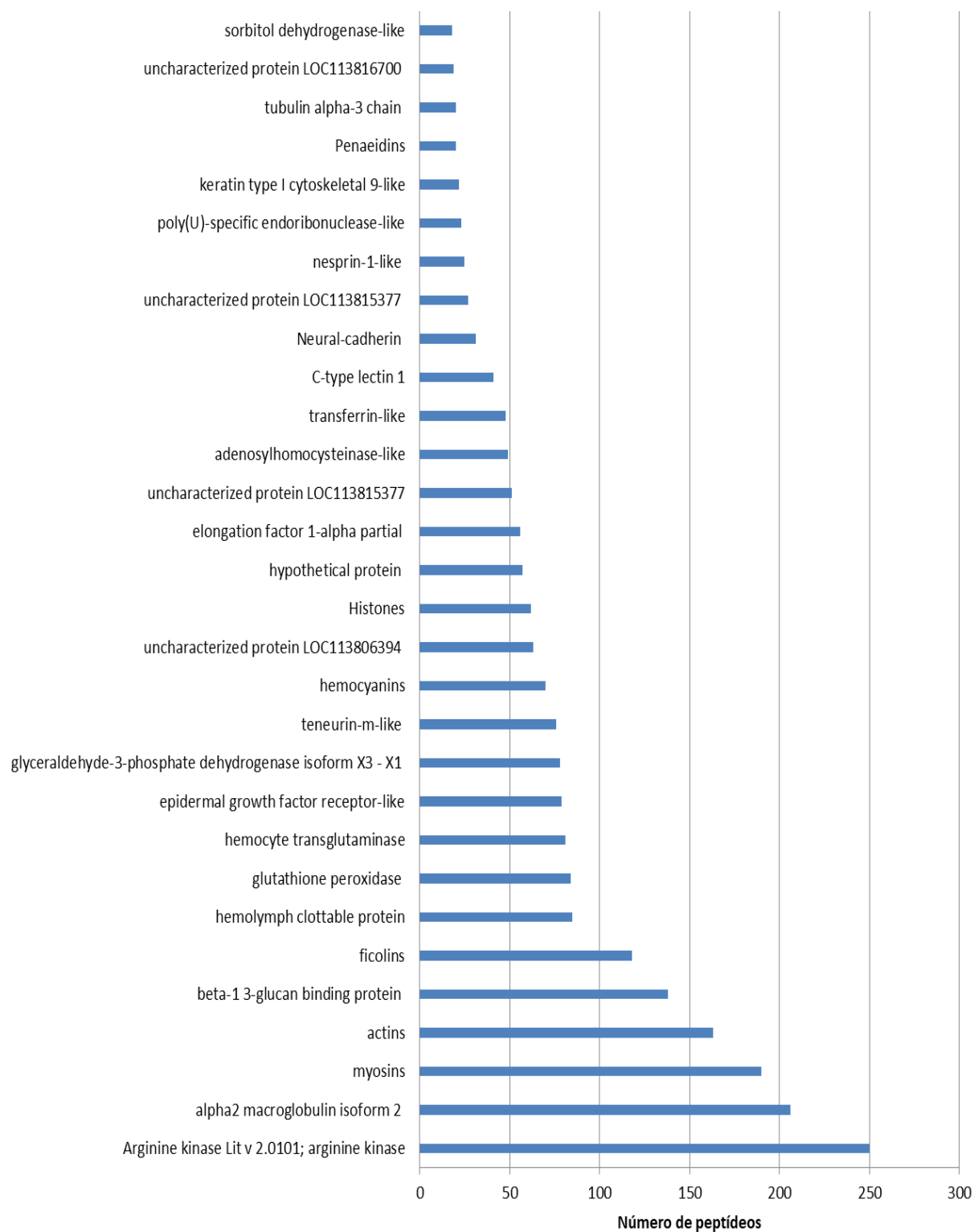
processamento que ocorre principalmente para proteínas secretadas, já que uma parte considerável dos peptídeos foram provenientes dessas proteínas (Figura 5).

Adicionalmente, os resultados também permitiram a identificação de sequências peptídicas de proteínas residentes nos mais diversos compartimentos intracelulares dos hemócitos, porém não foi possível verificar a localização subcelular exata através do número de acesso de cada proteína no site do Uniprot, pela falta deste tipo de informação para a maioria dos genes no banco de dados de *L. vannamei*. Contudo, muitos peptídeos foram de enzimas e proteínas do citosol, além de componentes do citoesqueleto, como actinas, miosinas, tubulinas e diversas proteínas acessórias. Dentre os mais abundantes também foram encontrados peptídeos de proteínas nucleares como as histonas (Figura 5). Fragmentos peptídicos de proteínas intracelulares também têm sido identificados em diferentes estudos de peptidoma, onde os resíduos de aminoácidos mais presentes na posição P1 foram *Leu* e *Phe*. No entanto, nesses estudos a percentagem de fragmentos N- e C-terminal variou de 40 a 60% (Fricker, 2010; Gelman et al., 2011; Teixeira et al., 2019). Os peptídeos encontrados em nossas amostras, também apresentaram resíduos hidrofóbicos *Leu* e *Phe* em P1, porém após os resíduos *Arg* e *Lys* como já mencionado, sugerindo também um processamento dos peptídeos intracelulares.

As proteínas alfa-2-macroglobulinas, proteína ligadora de beta 1-3 glucana, proteína coagulante de hemolinfa, hemocianinas e penaedinas, descritas na literatura como secretadas na hemolinfa (Gianazza et al., 2021), estavam dentre as proteínas com um considerável número de fragmentos identificados (Figura 5). Adicionalmente, foram observados também muitas sequências das enzimas transglutaminase e phenoloxidase presentes nos hemócitos (Figura 5). Dados da literatura mostram que estas proteínas estão relacionadas com os mecanismos de resposta imune inata, como o sistema de coagulação (Perdomo-Morales; Montero-Alejo; Perera, 2019) e o processo de melanização (Amparyup; Charoensapsri; Tassanakajon, 2013; Gianazza et al., 2021). Dentre essas proteínas, a alfa-2-macroglobulina foi a segunda com maior número de peptídeos identificados, com 206 sequências. Conforme descrito em *Penaeus monodon*, esta proteína interage com o terminal carboxil da transglutaminase tipo II, enzima chave no sistema de coagulação do camarão, aumentando o sequestro bacteriano, protegendo assim coágulos sanguíneos contra fibrinólise (Chaikerasitak; Somboonwiwat; Tassanakajon, 2012). Além disso, 138 fragmentos da proteína ligadora de beta 1-3 glucana foram observados. No caranguejo azul *Portunus pelagicus* esta proteína demonstrou ser multifuncional com papel

potencializadora de phenoloxidase, fagocitose, encapsulamento e atividade antibacteriana *in vitro* (Anjugam; Iswarya; Vaseeharan, 2016).

Figura 5 - Número de peptídeos distintos por proteína



Neste gráfico estão demonstradas apenas as proteínas com maior número de fragmentos identificados, que corresponde a 71% de todas as amostras. Fonte: autoria própria.

Levando em consideração a importância da hemolinfa nos processos de defesa contra microorganismos, os peptídeos identificados foram também analisados *in silico* quanto a possibilidade de apresentarem características de peptídeos antimicrobianos. As análises de bioinformática sugeriram que um número significativo das sequências (~ 20%) podem ser PAMs (Anexo 2 - Tabela Suplementar 2). Como o número de sequências com estas características foi alto, no intuito de apresentar as melhores sequências, foram agrupados na tabela 2, os peptídeos com um tamanho maior que 1000 Da, com alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos e formação de alfa-hélices. Esses peptídeos foram provenientes de diferentes proteínas precursoras tanto secretadas como intracelulares.

Inicialmente, nosso estudo falhou em detectar a presença de resíduos de cisteínas nas duas primeiras corridas realizadas no espectrômetro de massas, onde apenas 5 fragmentos apresentavam esse aminoácido. Este tipo de resíduo costuma ser raros nas sequências de muitas proteínas e sua detecção pode ter sido prejudicada pelo tipo de preparo amostra realizado, com a preservação das pontes de dissulfeto prejudicando a fragmentação no espectro de massas. Neste sentido, um dos pools de extratos de peptídeos foi alquilado, reduzido e novamente analisado no espectrômetro de massa. A presença da modificação causada pela alquilação e redução permitiu a identificação de 55 peptídeos com esses resíduos. Destes, 16 sequências foram indicadas pelo APD3, como possíveis antimicrobianos e eram provenientes das seguintes proteínas: ficolina, gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, chaoptina, transferrina, profilina e lectina 1 tipo C (Tabela 3). Além da presença de cisteínas essas sequências apresentaram outros resíduos frequentes em PAMs, como alta porcentagem de resíduos hidrofóbicos, carregados positivamente ou aminoácidos *Pro* e *Gly*, também presentes em PAMs.

Interessantemente duas destas proteínas também estão envolvidas em mecanismos de imunidade inata: proteína do tipo ficolina e tipo perlucina (uma lectina tipo 1 C) (Bi et al., 2020; Matsushita, 2010). As proteínas tipo ficolinas são um grupo de lectinas oligoméricas com subunidades constituída por domínios parecidos aos do colágeno e fibrinogênio (Matsushita, 2010). No soro, estas proteínas têm sido caracterizadas e atuam como moléculas de reconhecimento de carboidratos na superfície de patógenos microbianos e ativam o sistema complemento (Matsushita, 2010). Na espécie de camarão *Macrobrachium nipponense*, por exemplo, duas proteínas tipo ficolina caracterizadas apresentaram atividade de aglutinação de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e relação com a modulação da transcrição de genes

de PAMs, quando utilizado um modelo *knockdown* para estas proteínas (Li et al., 2017). Adicionalmente, uma proteína tipo perlucina caracterizada em *L. vannamei*, também apresentou atividade de aglutinação contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (Bi et al., 2020).

Tabela 2 - Seleção de peptídeos preditos com as melhores características estruturais de PAMs.

Proteína	Peptídeos/Resíduos hidrofóbicos	% RH	PM	H	RH ms
60S ribosomal protein L23a-like	L- A- P- D- Y- D- A- L- D- V-A- N- K-	46%	1404,539	S	4
6-phosphofructokinase	K- V- I- V- D- Q- L- G- F- D-T-	45%	1234,414	S	3
adenosylhomocysteinase-like	K- L- D- E- E- V- A- R- L- H-	40%	1209,367	S	4
alpha-2 macroglobulin isoform 2	G- L- P- G- E- G- V- A- D- V-F- E- A- A- P-	47%	1428,566	S	4
alpha-2 macroglobulin isoform 2	S- P- G- L- P- G- E- G- V- A- D- V- F- E- A- A- P-	41%	1612,761	S	4
alpha-2 macroglobulin isoform 2	L- S- S- A- N- L- P- I- N- E-E- H- L- V- E- P- L- P- P- P- E- H- T- V-	32%	2730,077	S	3
alpha-2 macroglobulin isoform 2	V- L- S- H- I- V- I- P- Q- G-	50%	1062,28	S	3
arginine kinase	L- T- E- F- Q- A- V- K- E- M-Q-	45%	1323,532	S	4
arginine kinase	V- I- Q- S- G- V- E- N- L- D- S- G- V- G- I- Y- A- P- D- A- E- A-	41%	2204,381	S	3
arginine quinase	A- V- N- E- I- E- K- R- I- P-	40%	1168,358	S	4
arginine quinase	D- V- I- Q- S- G- V- E- N- L-	40%	1073,171	S	5
arginine quinase	I- I- S- M- Q- M- G- G- D- L-G- Q- V-	46%	1348,611	S	3
arginine quinase	L- D- V- I- Q- S- G- V- E- N-L-	45%	1186,331	S	3
arginine quinase	L- E- E- V- A- G- K- Y- N- L-Q- V-	42%	1362,545	S	3
arginine quinase	L- I- K- I- E- K- E- M-	50%	1003,266	S	4
centrosomal protein of 290 kDa-like	K- V- N- Q- M- D- N- M- V- E-R-	36%	1363,581	S	4
chloride intracellular channel exc-4-like	F- A- D- F- E- I- P- D- E- L-E- H- L-	46%	1574,712	S	5
cofilin/actin-depolymerizing factor homolog	A- S- G- V- Q- V- A- D- A- C-T- Q-	50%	1149,249	S	3
copper/zinc superoxide dismutase isoform 4	Q- V- V- D- E- V- A- I- M- N-H- E-	50%	1383,549	S	4
copper/zinc superoxide dismutase isoform 4	S- I- V- V- H- A- G- E- D- D-L- G- L- G-	43%	1381,509	S	3
C-type lectin-like	A- I- L- E- Q- E- S- A- Q- D-I- F- N- N-	43%	1591,699	S	3
cysteine sulfinic acid decarboxylase-like	I- V- T- G- V- D- A- P- E- K-V- I- E-	46%	1369,578	S	3
cytoplasmatic actin	I- V- T- N- W- D- D- M- E- K-	40%	1250,393	S	4
DJ-1 protein	D- V- V- V- V- P- D- A- A- L-E- D- A- A- G- K- G- P- Y-	47%	1886,09	S	3
elongation factor 1-alpha	F- V- A- S- D- S- K- N- D- P-A- K- E- A- A- D- F- T- A- Q-	40%	2112,233	S	4
elongation factor 2-like isoform X2 ; X1	A- V- P- M- P- D- G- L- A- D-D- I- E- A- G- K- V- T- P-	42%	1896,15	S	3
enolase partial	D- A- L- T- L- I- Q- E- S- I-E- K- A- G-	43%	1487,67	S	6
epidermal growth factor receptor-like	I- L- S- A- E- G- I- E- L- V-E- A- D- M- H- R- V- P-	50%	1979,291	S	5
epidermal growth factor receptor-like	A- E- G- I- E- L- V- E- A- D-M- H- R- V- P-	47%	1665,893	S	3
F1-ATP synthase beta subunit	A- I- Y- V- P- A- D- D- L- T-D- P- A- P- A- T- T-	41%	1730,893	S	3
F1-ATP synthase beta subunit	I- Y- P- A- V- D- P- L- D- S-I- S-	42%	1289,451	S	3

ficolin-1-like isoform X3 [Penaeus vannamei]	L- Q- S- A- D- G- V- S- D- L- A- S- L- F- I- L- H-	53%	1786,019	S	3
ficolin-1-like isoform X3 [Penaeus vannamei]	R- L- D- V- S- A- P- T- T- S- L- A- G- D- A- L- Q-	41%	1714,897	S	8
ficolin-1-like isoform X3; X2; X1	L- D- V- S- A- P- T- T- S- L- A- G- D- A- L- Q-	44%	1558,709	S	3
gelsolin	L- D- N- E- L- N- G- K- A- V- Q- V-	42%	1299,446	S	5
glutathione peroxidase-like	K- T- D- V- N- G- V- D- E- H- P- L- F- T- Y- L- K-	29%	1976,212	S	5
glutathione S-transferase 1-like	L- L- D- L- T- A- G- E- H- M- K- P- E- F-	43%	1600,856	S	3
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A- A- L- Q- K- G- A- E- V- V- A- V- N- D- P- F- I- T- L- D-	55%	2071,36	S	8
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform X3; X2; X1	A- V- G- K- V- I- P- E- L- N- G- K- L- T- G- M- A-	47%	1698,056	S	4
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoform X3; X2; X1	G- A- E- V- V- A- V- N- D- P- F- I- T- L- D- Y- M-	53%	1854,116	S	8
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	L- Q- K- G- A- E- V- V- A- V- N- D- P- F- I- T-	50%	1700,953	S	6
heat shock cognate 70 kDa protein	A- K- A- P- A- V- G- I- D- L- G- T- T-	46%	1213,395	S	4
heat shock protein HSP 90-alpha isoform X4	A- D- L- V- N- N- L- G- T- I- A- K-	50%	1228,41	S	5
hemocyanin partial	K- E- A- L- G- G- A- D- S- G- L- K-	33%	1145,272	S	3
hemocyte protein-glutamine gamma-glutamyltransferase-like	F- G- Q- F- D- D- A- V- L- P-	50%	1108,219	S	3
hemocyte transglutaminase	E- E- Y- V- L- A- A- V- G- K-	50%	1078,229	S	3
histone H2B	F- V- N- D- I- F- E- R- I- A- A- E- A- S-	57%	1581,75	S	8
Histone H4	T- V- T- A- M- D- V- V- Y- A- L- K-	58%	1310,576	S	4
histone hb2	L- L- L- P- G- E- L- A- K- H- A- V- S- E- G- T- K-	41%	1763,063	S	3
isocitrate dehydrogenase cytoplasmic-like [NADP]	K- A- V- D- F- V- V- P- G- A- G- K- L- E-	50%	1429,675	S	3
isocitrate dehydrogenase cytoplasmic-like [NADP]	L- N- T- F- E- F- L- D- K-	44%	1126,273	S	3
isocitrate dehydrogenase cytoplasmic-like [NADP]	A- V- D- F- V- V- P- G- A- G- K- L- E-	54%	1301,505	S	3
L-lactate dehydrogenase-like isoform X1	S- A- Y- E- V- I- K- M- K- G-	40%	1125,348	S	4
L-lactate dehydrogenase-like isoform X2; X1	I- V- S- N- P- V- D- I- L- T-	50%	1070,254	S	3
methenyltetrahydrofolate*	I- V- T- P- T- E- V- F- Q- V- S- H-	42%	1356,544	S	3
methenyltetrahydrofolate*	L- A- E- L- T- E- E- Q- K- A- A- N-	42%	1316,43	S	3
mitochondrial ATP synthase subunit alpha precursor	A- I- V- D- V- P- V- G- E- A- I- L- G-	62%	1252,478	S	4
myosin heavy chain muscle-like isoform X3, X2, X1	K- K- H- N- D- A- V- A- E- M-	40%	1142,295	S	3
myosin heavy chain muscle-like	A- T- L- L- D- V- I- Q- S- G- V- E- N- L-	50%	1471,675	S	6
myosin heavy chain muscle-like	H- A- E- L- D- D- M- L- N- E- A- K-	42%	1385,517	S	6
myosin heavy chain muscle-like	K- R- Q- I- E- E- A- E- E- I- A- A- L- N- L- A-	50%	1798,028	S	4
myosin heavy chain muscle-like	K- R- Q- I- E- E- A- E- E- I- A- A- L- N- L- A- K- Y-	44%	2089,374	S	5
myosin heavy chain non-muscle-like	A- G- K- I- D- A- G- L- V- L- D- Q- L-	54%	1312,529	S	6
myosin heavy chain type 2	D- L- E- E- A- N- I- Q- H- E- S- A- L- A- N- L-	44%	1766,887	S	5
myosin heavy chain type 2	K- A- E- Q- D- V- N- A- M-	44%	1005,115	S	3
myosin heavy chain type 2	K- G- L- A- E- E- I- K- D- L-	40%	1115,287	S	4
myosin heavy chain, muscle-like	L- N- D- E- I- K- D- L- I-	44%	1072,223	S	4

nesprin-1-like isoform X1, X2		A- D- K- V- I- A- T- V- E- S- Q-	45%	1160,288	S	5
Neural-cadherin		R- I- V- V- E- D- V- N- D- N- P- P- I- F- D-	40%	1741,924	S	3
nuclease domain-containing protein 1		G- K- P- I- D- A- V- I- E- H- V-	45%	1177,365	S	4
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like		D- I- A- A- D- N- Q- P- V- G- R- I- V- M-	50%	1498,728	S	3
peptidyl-prolyl cis-trans isomerase-like		F- D- I- A- A- D- N- Q- P- V- G- R-	42%	1302,413	S	3
perlucin-like protein		L- A- E- A- V- E- V- G- R- E- S- L-	50%	1272,425	S	5
persulfide dioxxygenase mitochondrial-like	ETHE1	E- A- V- L- I- D- P- V- I- D- L- A- E- R- D- A- K-	53%	1867,132	S	6
persulfide dioxxygenase mitochondrial-like	ETHE1	A- V- L- I- D- P- V- I- D- L- A- E- R-	62%	1423,678	S	5
persulfide dioxxygenase mitochondrial-like	ETHE1	E- A- V- L- I- D- P- V- I- D- L- A- E-	62%	1396,606	S	5
phosphoglycerate kinase		D- E- E- G- A- K- I- V- D- K- L- I- A- K-	43%	1528,758	S	4
phosphoglycerate kinase		F- T- L- A- P- V- A- E- E- L- K- K-	50%	1345,597	S	3
poly(U)-specific endoribonuclease homolog		S- V- P- A- A- T- M- D- K- E- T- V-	42%	1248,418	S	3
putative transketolase-like isoform X1	protein 2	E- A- M- T- A- A- D- Q- L- A- S- E- G- I- N- L-	50%	1633,801	S	7
putative transketolase-like isoform X1	protein 2	A- E- E- V- I- S- A- I- E- G- Q- I- K-	46%	1386,565	S	6
putative transketolase-like isoform X1	protein 2	I- I- V- V- E- D- H- Y- A- E- G- G- I- G- E- A- V-	47%	1770,962	S	6
slow-type skeletal muscle actin 4		D- D- E- V- A- A- L- V- V- D- N- G- S- G- M- C- K- A- G-	47%	1851,046	S	5
sorbitol dehydrogenase-like		L- G- P- S- E- V- K- I- P- I- V- N- A-	46%	1336,594	S	4
superoxide dismutase mitochondrial-like isoform X1; X2	[Mn]	K- L- A- E- L- T- G- I- E- V- D- Q- I- K- K-	40%	1684,986	S	6
superoxide dismutase mitochondrial-like isoform X1; X2	[Mn]	L- A- E- L- T- G- I- E- V- D- Q- I- K- K-	43%	1556,816	S	6
teneurin-m-like		A- I- L- V- E- A- Q- A- V- Q- E- S- V-	62%	1356,543	S	5
teneurin-m-like		G- V- G- D- D- D- F- A- G- V- I- G- D- V- I- R- T-	41%	1705,847	S	5
teneurin-m-like		S- I- A- V- T- P- D- S- V- L- H- V- S- D- Q- A- G-	41%	1695,85	S	4
teneurin-m-like		V- L- P- T- G- Q- V- I- H- L-	50%	1076,307	S	3
teneurin-m-like		V- T- G- V- G- D- D- D- F- A- G- V- I- G- D- V- I-	47%	1648,792	S	5
transferrin-like		D- P- A- F- A- A- D- E- F- R- Y- K-	42%	1429,551	S	3
transferrin-like		I- I- G- H- S- E- S- V- A- E- I- L- G- L- P- A- S- T-	44%	1794,039	S	5
transferrin-like		A- D- V- I- A- L- D- G- G- D- V- Y- Q- V- R- Q- D-	41%	1833,978	S	5
tubulin alpha-3 chain		V- D- L- E- P- T- V- I- D- E- I- R- T- G- V-	40%	1655,871	S	4
tubulin beta chain-like isoform X4; X3; X2; X1		A- I- L- V- D- L- E- P- G- T- M- D- S- V-	50%	1459,685	S	4
uncharacterized LOC113808741	protein	Q- V- V- L- E- G- G- V- E- D- L- R- H- A-	43%	1521,698	S	4
uncharacterized LOC113810871	protein	G- P- E- A- D- I- A- L- D- H- V- S- V-	46%	1322,441	S	4
uncharacterized LOC113815377	protein	L- L- S- G- V- T- I- A- Q- G- G- V- L- P-	50%	1324,587	S	4
unnamed protein; actin-like		D- F- E- S- E- M- N- V- A- A- A- S- S- S- I- D- K-	41%	1800,917	S	6

RH:% de resíduos hidrofóbicos; PM: Peso Molecular (Da); H: Hélice; RH ms: resíduos hidrofóbicos na mesma superfície; *methenyltetrahydrofolate synthase domain-containing protein-like isoform X2; X1. Fonte: Autoria própria.

De maneira geral é possível perceber que a maioria dos peptídeos encontrados na hemolinfa são de proteínas relacionadas à resposta imune inata, porém não há dados na literatura se estruturalmente fragmentos menores dessas proteínas, naturalmente gerados, podem ser domínios de interação e ação direta sobre membranas de microrganismos podendo ter ação antimicrobiana.

Tabela 3 - Peptídeos identificados com resíduos de cisteínas.

Proteína precursora	Peptídeos/Resíduos hidrofóbicos	Carga +	% RH	PM
glyceraldehyde-3-phosphate deh. Isoform X2	V- V- S- N- A- S- C- T- T- N- C- L- A- P- I- A- K-	K: 1 R: 0 H: 0	53%	1691,9 89
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	E- I- S- R- S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F-	K: 0 R: 1 H: 1	44%	2016,3 37
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	R- S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F-	K: 0 R: 1 H: 1	47%	1686,9 83
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	R- S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H-	K: 0 R: 1 H: 1	43%	1539,8 06
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H-	K: 0 R: 0 H: 1	46%	1383,6 18
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F-	K: 0 R: 0 H: 1	50%	1530,7 95
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F- A-	K: 0 R: 0 H: 1	53%	1601,8 74
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F- A- D-	K: 0 R: 0 H: 1	50%	1716,9 63
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F- A- D- G-	K: 0 R: 0 H: 1	47%	1774,0 15
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F- A- D- G- S-	K: 0 R: 0 H: 1	44%	1861,0 93
ficolin-1-like isoformX1, X2, X3	S- V- C- L- Q- N- P- N- L- V- G- C- H- F- A- D- G- S- L- G-	K: 0 R: 0 H: 1	45%	2031,3 05
chaoptin-like	F- C- D- C- N- N- R- V- P- P-	K: 0 R: 1 H: 0	40%	1164,3 34
transferrin-like	R- I- C- V- G- P- D- V- D- C- D- N- L-	K: 0 R: 1 H: 0	46%	1418,6 19
C-type lectin 1	T- Q- C- T- D- G- F- R- L- V- A- G- K- C- V- L- L- G-	K: 1 R: 1 H: 0	50%	1881,2 51
profilin	I- S- E- E- P- G- Q- P- G- P- C- A- C- T- V- E- A-	K: 0 R: 0 H: 0	35%	1687,8 73
profilin	I- S- E- E- P- G- Q- P- G- P- C- A- C- T- V- E- A- L-	K: 0 R: 0 H: 0	39%	1801,0 33

Fonte: Autoria própria

6. CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu a caracterização do peptidoma presente na hemolinfa do camarão *L. vannamei*, onde a maioria dos fragmentos encontrados eram provenientes da região interna da sequência de aminoácidos de proteínas majoritariamente extracelulares e relacionadas principalmente à resposta imune inata. Através das análises de bioinformática, aproximadamente 20% desses fragmentos foram preditos possuir características encontradas em PAMs, o que abre novas perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas com ação antimicrobiana a partir do estudo de peptídeos intracelulares do camarão *L. vannamei*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMPARYUP, P.; CHAROENSAPSRI, W.; TASSANAKAJON, A. Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 34, n. 4, p. 990–1001, abr. 2013.

ANJUGAM, M.; ISWARYA, A.; VASEEHARAN, B. Multifunctional role of β -1, 3 glucan binding protein purified from the haemocytes of blue swimmer crab *Portunus pelagicus* and in vitro antibacterial activity of its reaction product. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 48, p. 196–205, jan. 2016.

ANVISA. **Antimicrobianos: bases teóricas e uso clínico**. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/mo_dulo1/conceitos.htm>. Acesso em: 6 set. 2021.

ANVISA. **OMS mobiliza países contra resistência microbiana**. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/oms-mobiliza-paises-contra-resistencia-microbiana>>. Acesso em: 21 fev. 2022.

ARAYAMETHAKORN, S. et al. Characterization of molecular properties and regulatory pathways of Crustin Pm 1 and Crustin Pm 7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 67, p. 18–29, fev. 2017.

BEHRENS, H. L.; CHEN, R.; LI, L. Combining Microdialysis, NanoLC-MS, and MALDI-TOF/TOF To Detect Neuropeptides Secreted in the Crab, *Cancer borealis*. **Analytical Chemistry**, v. 80, n. 18, p. 6949–6958, 15 set. 2008.

BI, J. et al. A typical C-type lectin, perlucin-like protein, is involved in the innate immune defense of whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 103, p. 293–301, ago. 2020.

BRUSCA, R.C.; MOORE, W.; SHUSTER, S.M. **Invertebrados**, 3ª edição. Rio de Janeiro: EDITORA GUANABARA KOOGAN LTDA, 2018. 9788527733458. Disponível em: <https://integrada.minhabiblioteca.com.br/#/books/9788527733458/>. Acesso em: 02 Mar 2022.

BULET, P.; STOCKLIN, R.; MENIN, L. Anti-microbial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, v. 198, n. 1, p. 169–184, abr. 2004.

CAMARGO, L. L. et al. The potential anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of rat hemopressin (PVNFKFLSH) in experimental arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 890, p. 173636, jan. 2021.

CASTRO, L. M. et al. Similar Intracellular Peptide Profile of TAP1/ β 2 Microglobulin Double-Knockout Mice and C57BL/6 Wild-Type Mice as Revealed by Peptidomic Analysis. **The AAPS Journal**, v. 12, n. 4, p. 608–616, 28 dez. 2010.

CHAIKEERATISAK, V.; SOMBOONWIWAT, K.; TASSANAKAJON, A. Shrimp Alpha-2-Macroglobulin Prevents the Bacterial Escape by Inhibiting Fibrinolysis of Blood Clots. **PLoS ONE**, v. 7, n. 10, p. e47384, 17 out. 2012.

CHEN, R. et al. Measurement of neuropeptides in crustacean hemolymph via MALDI mass spectrometry. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 20, n. 4, p. 708–718, 1 abr. 2009.

DASGUPTA, S. et al. Analysis of the Yeast Peptidome and Comparison with the Human Peptidome. **PLOS ONE**, v. 11, n. 9, p. e0163312, 29 set. 2016.

DE ARAUJO, C. B. et al. A Novel Intracellular Peptide Derived from G1/S Cyclin D2 Induces Cell Death. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 24, p. 16711–16726, jun. 2014.

DE ARAUJO et al. Intracellular Peptides in Cell Biology and Pharmacology. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 150, 16 abr. 2019.

DE LA VEGA, E. et al. Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): A broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. **Molecular Immunology**, v. 45, n. 7, p. 1916–1925, abr. 2008.

DELANEY, K. et al. Mass spectrometry profiling and quantitation of changes in circulating hormones secreted over time in *Cancer borealis* hemolymph due to feeding behavior. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 1, p. 533–543, 29 jan. 2022.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a family of antimicrobial peptides from penaeid shrimp (Crustacea, Decapoda). **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 57, n. 8–9, p. 1260–1271, 2000.

DESTOUMIEUX, D. et al. Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 45, p. 28398–28406, 1997.

ELVINO, B.; MACHADO, A.; SPRINZ, E. **Antimicrobianos [recurso eletrônico] : consulta rápida**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FERRO, E. S. et al. Intracellular peptides: From discovery to function. **EuPA Open Proteomics**, v. 3, p. 143–151, jun. 2014.

FESSENKO, I. A. et al. Specific pools of endogenous peptides are present in gametophore, protonema, and protoplast cells of the moss *Physcomitrella patens*. **BMC Plant Biology**, v. 15, n. 1, p. 87, 2015.

FREDRICK, W. S.; RAVICHANDRAN, S. Hemolymph proteins in marine crustaceans. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 6, p. 496–502, jun. 2012.

FRICKER, L. D. Analysis of mouse brain peptides using mass spectrometry-based peptidomics: implications for novel functions ranging from non-classical neuropeptides to microproteins. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 8, p. 1355, 2010.

FRICKER, L. D. et al. Peptidomic Analysis of HEK293T Cells: Effect of the Proteasome Inhibitor Epoxomicin on Intracellular Peptides. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 3, p. 1981–1990, 2 mar. 2012.

GELMAN, J. S. et al. Peptidomic Analysis of Human Cell Lines. **Journal of Proteome Research**, v. 10, n. 4, p. 1583–1592, abr. 2011.

GIANAZZA, E. et al. Hemolymph proteins: An overview across marine arthropods and molluscs. **Journal of Proteomics**, v. 245, p. 104294, ago. 2021.

GIEDRAITIENE, A. et al. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. **Medicina**, v. 47, n. 3, p. 137–146, 2011.

IWANAGA, S.; LEE, B.-L. Recent Advances in the Innate Immunity of Invertebrate Animals. **BMB Reports**, v. 38, n. 2, p. 128–150, 31 mar. 2005.

KRUSONG, K. et al. A comparative study of antimicrobial properties of crustinPm1 and crustinPm7 from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 36, n. 1, p. 208–215, jan. 2012.

LI, T. et al. Function of two ficolin-like proteins in innate immune defense of the oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense*. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 68, p. 488–499, set. 2017.

LIU, S. et al. A *Litopenaeus vannamei* Hemocyanin-Derived Antimicrobial Peptide (Peptide B11) Attenuates Cancer Cells' Proliferation. **Molecules**, v. 23, n. 12, p. 3202, 5 dez. 2018.

MACHADO, A. et al. Sínteses química e enzimática de peptídeos: princípios básicos e aplicações. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 781–789, out. 2004.

MAGALHÃES, B. et al. Reviewing Mechanistic Peptidomics in Body Fluids Focusing on Proteases. **PROTEOMICS**, v. 18, n. 18, p. 1800187, set. 2018.

MARZZOCO, A.; TORRES, B. B. **Bioquímica básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017.

MATSUSHITA, M. Ficolins: Complement-Activating Lectins Involved in Innate Immunity. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 1, p. 24–32, 2010.

MONTERO-ALEJO, V. et al. Defensin like peptide from *Panulirus argus* relates structurally with beta defensin from vertebrates. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 33, n. 4, p. 872–879, out. 2012.

MUÑOZ, M. et al. Expression of penaeidin antimicrobial peptides in early larval stages of the shrimp *Penaeus vannamei*. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 27, n. 4, p. 283–289, abr. 2003.

MURRAY, C. J. et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. **The Lancet**, v. 399, n. 10325, p. 629–655, fev. 2022.

OLIVEIRA, A. C. DE; SILVA, R. S. DA. Desafios do cuidar em saúde frente à resistência bacteriana: uma revisão. **Revista Eletrônica de Enfermagem**, v. 10, n. 1, p. 189–197, 2009.

PERDOMO-MORALES, R.; MONTERO-ALEJO, V.; PERERA, E. The clotting system in decapod crustaceans: History, current knowledge and what we need to know beyond the models. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 84, p. 204–212, jan. 2019.

RECKZIEGEL, P. et al. A novel peptide that improves metabolic parameters without adverse central nervous system effects. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14781, 1 dez. 2017.

ROSA, R. D. DA. **Identificação e caracterização de sequências codificadoras de peptídeos antimicrobianos (pam) nas células da hemolinfa de espécies nativas de peneídeos marinhos**. p. 93, 2007.

RSTUDIO TEAM (2022). **RStudio**: Integrated Development Environment for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

SAITO, T. et al. A Novel Big Defensin Identified in Horseshoe Crab Hemocytes: Isolation, Amino Acid Sequence, and Antibacterial Activity¹. **The Journal of Biochemistry**, v. 117, n. 5, p. 1131–1137, maio 1995.

SILVÉRIO, R. et al. Pep19 Has a Positive Effect on Insulin Sensitivity and Ameliorates Both Hepatic and Adipose Tissue Phenotype of Diet-Induced Obese Mice. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 8, p. 4082, 7 abr. 2022.

SUN, M. et al. A Lymphoid Organ Specific Anti-Lipopolysaccharide Factor from *Litopenaeus vannamei* Exhibits Strong Antimicrobial Activities. **Marine Drugs**, v. 19, n. 5, p. 250, 28 abr. 2021.

TAVORMINA, P. et al. The Plant Peptidome: An Expanding Repertoire of Structural Features and Biological Functions. **The Plant Cell**, v. 27, n. 8, p. 2095–2118, ago. 2015.

TEIXEIRA, C. M. M. et al. Characterization of Intracellular Peptides from Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. **Zebrafish**, v. 16, n. 3, p. 240–251, jun. 2019.

TOKE, O. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. **Biopolymers**, v. 80, n. 6, p. 717–735, 2005.

VIEIRA, C. B. **RELAÇÃO DO TEMPO DE COAGULAÇÃO COM A QUANTIDADE DE *Vibrio* NA HEMOLINFA DE CAMARÕES *Litopenaeus vannamei* ORIUNDOS DE TRÊS FAZENDAS DE CULTIVO DO ESTADO DO CEARÁ.** [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, 2008.

WACLAW, B. Edinburgh Research Explorer Evolution of Drug Resistance in Bacteria. **Advances and Medicine and Biology**, v. 915, p. 49–67, 2016.

WANG, G, LI, X. and WANG, Z.(2016) **APD3: the antimicrobial peptide database as a tool for research and education.** Nucleic Acids Research 44, D1087-D1093.

WANG, G. Improved Methods for Classification, Prediction, and Design of Antimicrobial Peptides. In: [s.l.: s.n.]. p. 43–66.

YANG, S. et al. Prediction and characterization of a novel hemocyanin-derived antimicrobial peptide from shrimp *Litopenaeus vannamei*. **Amino Acids**, v. 50, n. 8, p. 995–1005, 2018.

ZANJANI, N. T. et al. Antimicrobial Peptides of Marine Crustaceans: The Potential and Challenges of Developing Therapeutic Agents. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 19, p. 2245–2259, 30 maio 2018.

ANEXOS

Anexo 1 - Tabela Suplementar 1

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/15sLXu5DBmu38Tn9mvhKK8sf7rQKdmQ0i/edit?usp=sharing&ouid=111831713428020483251&rtpof=true&sd=true>

Anexo 2 - Tabela Suplementar 2

<https://docs.google.com/spreadsheets/d/15Eug-EQz4od5qQiZuuEwS3BobIivDRey/edit?usp=sharing&ouid=111831713428020483251&rtpof=true&sd=true>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Instituto de Biociências
Câmpus do Litoral Paulista



PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: LILIANE GOMES DA SILVA

Título: "Caracterização do peptidoma na hemolinfa do camarão *Litopenaeus vannamei* e análise in silico do potencial antimicrobiano"

Orientador: Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Gerenciamento Costeiro

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro	APROVADO
Profa. Dra. Patrícia Reckziegel	APROVADO

PARECER:

A discente atingiu os requisitos necessários esperados para um trabalho de conclusão de curso, apresentando sua monografia dentro das normas estabelecidas e com excelente escrita. Durante a apresentação demonstrou domínio e segurança e na arguição respondeu adequadamente aos questionamentos realizados pela banca.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente Liliane Gomes da Silva obteve o seguinte conceito:

☒

APROVADO

☐

REPROVADO

São Vicente, 11 de julho de 2022.

Leandro Mantovani de Castro
Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro

Prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro
Professor Assistente
UNESP - CLP

Patrícia Reckziegel

Profa. Dra. Patrícia Reckziegel