

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 26/07/2020.



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

ANÁLISE PROTEÔMICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE PACU (*Piaractus mesopotamicus*) APÓS JEJUM PROLONGADO E DURANTE CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO.

RAFAELA NUNES DA SILVA GOMES

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Prof.^a Dr.^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2018



unesp

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



PG-BGA

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE PROTEÔMICA DO MÚSCULO ESQUELÉTICO DE
PACU (*Piaractus mesopotamicus*) APÓS JEJUM PROLONGADO E
DURANTE CRESCIMENTO COMPENSATÓRIO**

Aluna: Rafaela Nunes Da Silva-Gomes

Orientadora: Dr.^a Maeli Dal Pai

Co-orientadora: Dr.^a Lucilene Delazari Dos Santos

Tese apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração em Biologia Celular Estrutural e Funcional.

Orientadora: Dr.^a Maeli Dal Pai

BOTUCATU – SP

2018

Instituto de Biociências - Seção Técnica de Pós-Graduação

Distrito de Rubião Júnior s/n CEP 18618-970 Cx Postal 510 Botucatu-SP Brasil

Tel (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÊC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Silva-Gomes, Rafaela Nunes da.

Análise proteômica do músculo esquelético de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) após jejum prolongado e durante crescimento compensatório / Rafaela Nunes da Silva-Gomes. - Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maeli Dal Pai

Coorientador: Lucilene Delazari dos Santos

Capes: 20100000

1. Atrofia muscular. 2. Desenvolvimento muscular. 3. Marcadores bioquímicos. 4. Proteoma. 5. Parvalbuminas.

Palavras-chave: atrofia muscular; biomarcador; crescimento muscular; parvalbumina; proteoma muscular.

Dedicatória

Pensando para escrever essa dedicatória eu quis lembrar toda trajetória pessoal que encarei para que pudesse chegar até aqui. Mudança de cidade, mudança de laboratório e linha de pesquisa, orientadora, novos amigos, novos companheiros de trabalho, novos vizinhos, novos amores...

Estar longe daqueles que sempre foram seu ponto de equilíbrio, seu conforto, seu apoio incondicional chega a ser doloroso, mas fazer novos pontos de encontro, novos guias, novos caminhos e saber que na chegada ou na partida “eles” sempre estarão lá é reconfortante.

Com certeza não trilhei essa trajetória sozinha, não terminei esse doutorado sem o apoio e suporte de inúmeras pessoas, e porque não, sem a crítica dolorosa, de algumas poucas também.

Aqui encerro esse ciclo que durou 4 anos, intensos 4 anos, e agradeço por tudo o que passei para que hoje eu pudesse estar aqui...

Hoje eu tenho certeza que fiz a melhor escolha, que trilhei o meu melhor caminho, que fiz os melhores encontros e mantive os melhores para sempre para perto de mim.

Tudo isso para que, hoje, eu pudesse vivenciar toda essa experiência e sobrecarga emocional e dizer que a cada dia mais eu quero ser melhor, por você, Moreno, por nós...

Não vou dizer vem logo, porque eu amo te sentir aqui dentro de mim, mas digo venha no seu momento e continue mudando tudo aqui dentro de mim, que eu vou fazer o meu melhor por você, sempre!

Dedico esse trabalho, e todos os meus planos e pensamentos futuros ao meu amor...

Moreno, mamãe te ama!

Agradecimentos

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de Doutorado durante a realização deste projeto, à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP Processo nº 2017/12237-6), pela bolsa de Iniciação Científica vinculada à este trabalho e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – 116795/2016, 447233/2014, 302656/2015-4) pelo financiamento científico.

Agradecimentos especiais...

Agradeço, primeiramente, à minha orientadora, Maeli Dal-Pai, pela oportunidade em realizar meu doutorado e por acreditar em mim na execução dessa pesquisa. Sou grata por ter me acolhido tão bem em seu laboratório, por tudo o que aprendi nesses anos de convivência e de muito trabalho. A senhora é um exemplo de profissional, como pesquisadora, orientadora e professora, sempre tão empolgada com cada novo conhecimento, novas técnicas, novas pesquisas e oportunidade de crescimento que encanta a todos os seus alunos e orientados. Além de uma ótima amiga, ouvinte, sensível com as particularidades de cada um. Que honra te encontrar!

Aos meus colegas de trabalho e amigos do LBME (Laboratório de Biologia do Músculo Estriado) que estiveram presentes durante esses 4 anos: Tassiana, Leonardo, Ivan, Edson, Rondi, Bruno Pira, Bruno Fanti, Sarinha, Paulinha, Bruninha, Jason, Juarez, Aninha, Grasi, Jack, Carol, Mariana, Maria Laura e Robson. Aprendi demais com cada um de vocês. Obrigada pelos ensinamentos profissionais e, principalmente, pelos momentos compartilhados, de alegria, choros, risadas e os bolos e parabéns!

Aos amigos mais próximos Sarinha, Paulinha e Grasi, feliz o dia em que eu conheci vocês e pude enfim dizer que estava em casa em Botucatu! Com vocês compartilho os meus melhores momentos dessa jornada, e nos piores sei que estavam lá me apoiando também. Amo vocês!

Ao professor Dr. Robson Carvalho, pelo incentivo, pela doação, pela troca de conhecimento e profissionalismo. Ao amigo Robson, te admiro por sempre saber como nos incentivar, ter uma palavra de elogio, pelo ombro amigo em momentos difíceis, pela sensibilidade em lidar com seus alunos e por todos os momentos compartilhados.

A iniciação científica Maria Laura, que tanto fez para a realização deste trabalho e que me instigou a saber sempre mais, a pesquisar, a estudar, ler, reler... Obrigada Maria pela enorme ajuda, na prática e

teoria para que esta pesquisa se realizasse. Com certeza esse trabalho é muito melhor pela sua parceria! Que os seus sonhos se realizem e você cresça cada vez mais, potencial para tudo isso você tem, é só acreditar!

Ao pesquisador Dr. Vander Bruno dos Santos por disponibilizar o seu laboratório para a realização da parte experimental deste projeto.

Ao professor Dr. Pedro de Magalhães Padilha e a todos integrantes do Laboratório de Bioanalítica e Metaloproteômica (Departamento de Química e Bioquímica do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP) pela parceria e empenho para a realização deste trabalho. Professor, muito obrigada por ter aberto totalmente o seu laboratório para mim, onde por algum tempo, até brincava que tinha mudado de departamento, de tão a vontade que me sentia para trabalhar. Em especial ao José, que SEMPRE esteve disponível para dúvidas, apoios, sugestões, troca de conhecimentos e também, pelo grande amigo que você tem sido nesses anos. Meu muito obrigada!

A professora Dr^a Lucilene Delazari dos Santos e ao CEVAP pela parceria e troca de conhecimento científico e técnico para a realização deste trabalho. A proteômica começou a partir do nosso encontro, do curso de proteômica, onde me encantei e me joguei nessa jornada. Que continue semeando “proteômica” por onde for, sucesso!

Aos companheiros do departamento de Morfologia (IBB/UNESP, Botucatu), alunos, professores e funcionários que participaram positivamente na formação acadêmico-científica, por serem tão prestativos e estarem sempre presentes eu agradeço.

Aos funcionários da secretaria de pós-graduação pelo profissionalismo e pela disposição em sempre querer ajudar.

Aos amigos mais próximos durante essa jornada: minha vizinha de apartamento Naiara, obrigada pelos almoços, jantares, risadas, choros e passeios em volta da piscina; a amiga-psicóloga-dançarina desde adolescência, Carol, obrigada por sempre se fazer presente em todos os momentos da minha vida, com a nossa troca de mensagem de boa semana e nossas tentativas de encontro (que quando dão certo me renovam!); a amiga que a Biologia – UNESP/Bauru me deixou, Karen, por iniciarmos juntas essa jornada de doutorado em Botucatu, obrigada pelo apoio, carinho e parceria em todos os momentos, por ser um ponto de equilíbrio para mim, minha ligação chorando de desespero ou chorando de alegria (estou grávida!); e a amiga que eu não vi pessoalmente todos esses anos, mas

que se fez presente de inúmeras formas e continua até hoje sendo a minha melhor, Francine, volta logo da Europa! Eu amo vocês!

E não poderia deixar de agradecer aos meus pais, que mais do que nunca estivemos juntos, enfrentando momentos, torcendo, chorando, rindo, festejando, nos apoiando... Nós sabemos o tanto que aconteceu nesses anos, mas o mais importante é o que mais me orgulha é que o nosso amor superou tudo. Obrigada por me apoiarem, por me bancarem sem bolsa em uma nova cidade, por acreditarem em mim. Eu amo vocês vovô Juca e vovó Del! Fico calma e feliz toda vez que penso que o Moreno vai receber todo esse amor também, assim eu não me preocupo com mais nada!

Em especial à minha mãe e minha avó Bina, vovó e bisavó do Moreno, minhas duas mulheres guerreiras! Não tenho palavras para descrever o que vocês são para mim e o quanto somos ligadas. Eu amo absurdamente vocês, e quero ser só um pouquinho do que vocês são para mim para o Moreno.

Em último, mas não menos importante, agradeço ao meu geminiano favorito do mundo todo! Quem diria que entre “tanta gente gente chata sem nenhuma graça você veio” para “bagunçar tudo em mim” e ainda dizendo que “está tipo a fim de se jogar de cara num romance assim tipo para a vida inteira” e ser meu amigo, meu companheiro, meu parceiro, meu namorado, meu marido, minha melhor companhia, e o pai do Moreno. Obrigada por tudo, Ga! A cada dia na construção da nossa família eu sinto muito orgulho e vontade “de ir dormir bem cansado e de acordar do teu lado pra te dizer que eu te amo, que eu te amo demais”. Eu tenho certeza que “consta nos astros, nos signos, nos búzios, eu li num anúncio, eu vi no espelho, tá lá no evangelho, garantem os orixás serás o meu amor, serás a minha paz” e que “tudo fica mais bonito quando você está por perto”.

Á todos que, direta ou indiretamente, passaram por mim nesses anos, eu agradeço!

Tem dias que a gente se sente como quem partiu ou morreu
A gente estancou de repente ou foi o mundo então que cresceu...
A gente quer ter voz ativa no nosso destino mandar
Mas eis que chega a roda viva e carrega o destino prá lá...

Roda mundo, roda gigante
Roda moinho, roda pião
O tempo rodou num instante
Nas voltas do meu coração...

A gente vai contra a corrente até não poder resistir
Na volta do barco é que sente o quanto deixou de cumprir
Faz tempo que a gente cultiva a mais linda roseira que há
Mas eis que chega a roda viva e carrega a roseira prá lá...

...

A roda da saia mulata não quer mais rodar não senhor
Não posso fazer serenata a roda de samba acabou...
A gente toma a iniciativa viola na rua a cantar
Mas eis que chega a roda viva e carrega a viola prá lá...

...

O samba, a viola, a roseira que um dia a fogueira queimou
Foi tudo ilusão passageira que a brisa primeira levou...
No peito a saudade cativa faz força pro tempo parar
Mas eis que chega a roda viva e carrega a saudade prá lá...

Roda mundo, roda gigante
Roda moinho, roda pião
O tempo rodou num instante
Nas voltas do meu coração...

(Chico Buarque – Roda Viva)

RESUMO

A musculatura esquelética em peixes corresponde mais de 70% do peso corporal total desses animais e o desenvolvimento, crescimento e manutenção do fenótipo muscular envolvem o balanço dinâmico entre as vias de anabolismo e catabolismo muscular, sendo influenciado por diversos fatores, como a disponibilidade alimentar. Períodos com baixa ou nenhuma disponibilidade de alimento é frequentemente observado na natureza e talvez, por isso, garantem aos peixes uma alta capacidade adaptativa para enfrentar períodos de jejum prolongado. Com a realimentação e os níveis metabólicos restabelecidos, o animal pode apresentar um processo de crescimento acelerado, chamado crescimento compensatório. Existe um grande interesse da aquicultura nos processos de crescimento compensatório após jejum, uma vez que bem estabelecido pode gerar diminuição do custo com a alimentação e aumento dos níveis de produção. Uma ferramenta para o estudo do músculo de peixes durante períodos de jejum e realimentação é a proteômica. A proteômica permite identificar o conjunto de proteínas expressas por uma célula ou tecido em determinadas situações e modificações ambientais e possui a vantagem de caracterizar eventos pós-traducionais, algo impossibilitado pela genômica e transcriptoma. Dessa forma, nós testamos a hipótese de que juvenis de pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submetidos a 30 dias de jejum e 30 e 60 dias de realimentação apresentam crescimento compensatório e alterações no perfil de expressão proteico da musculatura esquelética. Para isso dois grupos de animais foram utilizados: grupo Controle (C) alimentado continuamente por 90 dias e grupo experimental (E), submetidos a 30 dias de jejum e 60 dias de realimentação. Amostras do músculo branco foram coletadas após 30 dias de jejum e após 6, 24, 48 horas, 30 e 60 dias de realimentação. O peso corporal total, comprimento padrão, taxa de crescimento, morfologia e morfometria das fibras musculares foram analisados, assim como o proteoma do músculo branco de pacu. Nós demonstramos que os peixes apresentaram atrofia muscular após 30 dias de jejum, crescimento compensatório parcial após 30 dias de realimentação e crescimento compensatório total após 60 dias de realimentação. A análise proteômica sob estratégia de *shotgun* identificou 99 proteínas após jejum, sendo 21 proteínas diferencialmente expressas entre o grupo E e C e 71 proteínas após 30 dias de realimentação, com 14 proteínas diferencialmente expressas. Entre as proteínas com expressão diferencial, nós validamos a expressão gênica e proteica para parvalbumina que mostrou-se diminuída durante atrofia muscular no músculo branco de pacu após 30 dias de jejum e 30 dias de realimentação. A análise proteômica por 2D-PAGE demonstrou diminuição no número de *spots* proteicos identificados após jejum e aumento no número de *spots* proteicos após 30 e 60 dias de realimentação nos géis do grupo E. Os *spots* proteicos mais significativos foram extraídos e caracterizados por espectrometria de massas. As proteínas caracterizadas foram classificadas em vias envolvidas, principalmente, no anabolismo e catabolismo muscular, enzimas do metabolismo celular, biosíntese de aminoácidos, citoesqueleto e contração muscular, que foram profundamente afetadas pelo jejum e crescimento compensatório. Além disso, o período de jejum prolongado promoveu intenso estresse celular e identificou proteínas que podem estar relacionadas com mecanismos para compensação de danos negativos. Dessa forma, esse estudo pode auxiliar na identificação de possíveis biomarcadores para monitoramento do bem-estar animal, qualidade da carne e segurança alimentar, além de melhorar o entendimento das necessidades alimentícias e do impacto da dieta administrada à produção.

Abstract

The skeletal muscle in fish corresponds more than 70% of the total body weight and the development, growth and maintenance of the muscle phenotype involves the dynamic balance between muscle anabolism and catabolism pathways, being influenced by several factors, such as food availability. Periods with low or no food availability are often observed in nature and may therefore, ensure a high adaptive capacity in fish to deal with prolonged fasting periods. With refeeding and metabolic levels restored, the animal may exhibit accelerated growth, called compensatory growth. There is a great interest of aquaculture in the processes of fasting/refeeding, once well-established can generate decrease of the feeding costs and increase of the production levels. An important tool to analyze muscle fish during fasting/refeeding is Proteomics. The proteomics allows to identify a set of proteins expressed by a cell or tissue in some situations and environmental changes and has the advantage of characterizing post-translational events, something impossible to detect by genomic and transcriptome analysis. This way, we tested the hypothesis that juveniles pacu (*Piaractus mesopotamicus*) submitted to 30 days of fasting and 30 and 60 days of refeeding present compensatory growth and alterations in the protein expression profile of the skeletal muscle. For this, we used two animal groups: Control group (C) fed continuously for 90 days and experimental group (E), submitted to 30 days of fasting followed by 60 days of refeeding. White muscle samples were collected after 30 days of fasting and after 6, 24, 48 hours, 30 and 60 days of refeeding. The total body weight, standard length, growth rate, morphology and morphometry of the muscle fibers were analyzed, as well as the white muscle proteome of pacu. We demonstrated that fish presented muscle atrophy after 30 days of fasting, partial compensatory growth after 30 days of refeeding and total compensatory growth after 60 days of refeeding. Proteomic analysis by shotgun approach identified 99 proteins after fasting, being 21 differentially expressed between E and C group and 71 proteins after 30 days of refeeding, being 14 differentially expressed. Among the differential expression proteins, we validated gene and protein expression for parvalbumin that was down-regulated during muscle atrophy in white muscle of pacu after 30 days of fasting and 30 days of refeeding. Proteomic analysis by 2D-PAGE demonstrated decreased in the number of protein spots identified after fasting and increased number after refeeding in the gels of E group. The most significant protein spots were extracted and characterized to mass spectrometry. The proteins characterized were classified into pathways mainly involved in muscle anabolism and catabolism, cellular metabolism enzymes, amino acid biosynthesis, cytoskeleton and muscle contraction, and they were deeply affected by fasting and compensatory growth. In addition, the prolonged fasting period promoted intense cellular stress and presented proteins that may be related to compensation mechanisms for negative damages. Thus, this study can help identify possible biomarkers for monitoring animal welfare, meat quality and food safety, as well as, improving the understanding of food needs and the diet impact into aquaculture.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
Organização da musculatura esquelética nos peixes.....	1
Miogênese nos peixes	3
Crescimento muscular pós-embrionário.....	5
Fatores que afetam o crescimento.....	9
Jejum e realimentação	9
Proteômica	10
HIPÓTESE	12
OBJETIVOS.....	12
DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	12
Condições experimentais.....	12
REFERÊNCIAS	14
<i>Capítulo I</i>	20
Prolonged fasting/refeeding modifies proteome profile and parvalbumin expression in the white muscle of pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>).	20
<i>Capítulo II</i>	41
Proteomic analysis of white muscle of pacu (<i>Piaractus mesopotamicus</i>) after prolonged fasting and compensatory growth	41
CONCLUSÕES FINAIS.....	66
ANEXO I.....	67

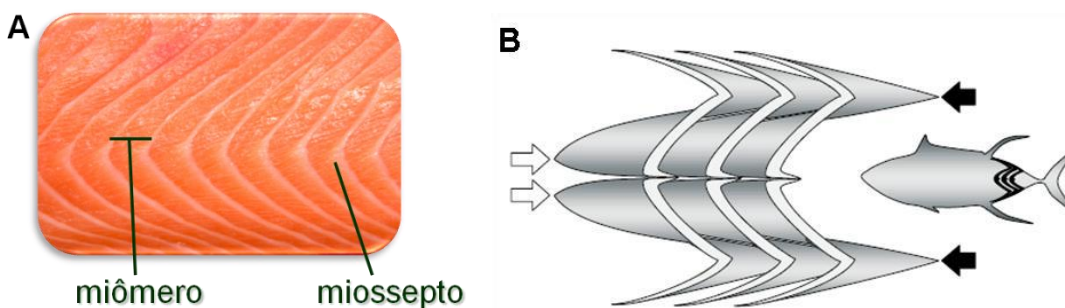
1 INTRODUÇÃO

2 *Organização da musculatura esquelética nos peixes*

3 Nos peixes, o músculo estriado esquelético pode ocupar de 40 a 75% da massa corporal total
4 do peso do animal, o que representa um mecanismo específico para a adaptação desses animais ao
5 meio aquático(1,2), mas também serve como principal estoque de proteínas a serem utilizadas em
6 atividades que requerem grande demanda de energia(3).

7 Os principais músculos locomotores são representados pelos músculos esqueléticos
8 miotomais laterais, que estão organizados em unidades morfofuncionais, os miômeros, que se
9 repetem ao longo do corpo do animal, e são separados por bainhas de tecido conjuntivo, os
10 miosseptos(1) (Fig. 1a). Os miômeros apresentam formato em “W” e cada um contém uma região
11 superficial, em formato de cunha, disposta imediatamente abaixo da linha lateral, onde as fibras
12 musculares têm disposição paralela ao eixo corporal, e uma região mais profunda, com as fibras
13 musculares apresentando uma disposição em hélice, formando ângulos maiores que 40° em relação
14 ao eixo corporal(1) (Fig. 1b). A orientação das fibras musculares em peixes está relacionada com a
15 necessidade de todas as fibras contraírem a uma mesma velocidade, qualquer que seja a sua posição
16 dentro dos miômeros, para resultar na flexão do corpo(2,4,5). Os miosseptos, por sua vez,
17 transmitem a força de contração das fibras musculares, através dos tendões, para o esqueleto axial e a
18 nadadeira caudal, resultando na ondulação e propulsão do corpo(2). Esse padrão de organização
19 anatômica da musculatura esquelética em peixes maximiza a eficiência mecânica dos músculos em
20 relação à limitada capacidade de flexões do corpo no plano lateral(5).

21

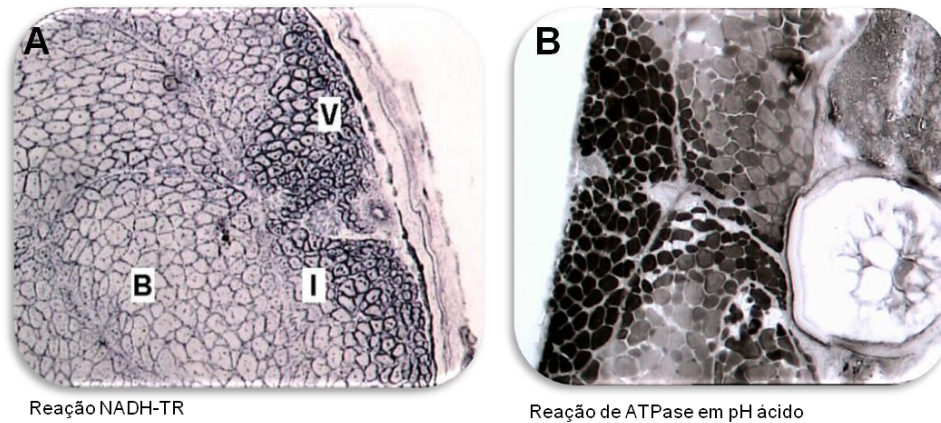


23 **Fig. 1 - (A)** Organização anatômica da musculatura esquelética em peixes: unidades morfofuncionais,
24 miômeros, separados por bainhas de tecido conjuntivo, miosseptos. **(B)** Detalhe de três miômeros isolados,
25 com formato em “W”, cada um apresentando uma região superficial (setas brancas) e profunda (setas em
26 preto)(6).

27

28 Dependendo do tipo de movimento executado, como movimentos sustentados ou de alta
29 velocidade, a extensão da força de contração da musculatura estriada esquelética em peixes pode ser

30 variável. Devido a essa capacidade funcional do sistema muscular, a musculatura estriada esquelética
31 apresenta-se organizada em compartimentos ou camadas distintas, contendo diferentes tipos de fibras
32 musculares que possuem diferentes velocidades de contração(2,5). Os diferentes tipos de fibras
33 musculares apresentam-se organizados nos compartimentos vermelho (superficial), intermediário e
34 branco (profundo)(7,8) (Fig. 2). Essa organização pode variar, ainda, de acordo com a espécie e a
35 fase de crescimento estudada(3).



36

37 **Fig. 2** - Corte transversal da musculatura estriada esquelética da tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*). (V)
38 Compartimento vermelho superficial, (I) compartimento intermediário e (B) compartimento branco profundo.
39 A) Reação NADH-TR (nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-reduzido-tetrazólio-redutase). B) Reação de
40 ATPase em pH ácido. Adaptado de Aguiar *et al.*(9).

41

42 O compartimento vermelho pode estar localizado na região subdermal, como uma camada
43 fina e uniforme ao longo de todo o corpo do animal ou apresentar uma distribuição mais localizada,
44 aparecendo somente na região do nervo da linha lateral, onde assume um aspecto triangular(2,8–10).
45 O compartimento vermelho, normalmente, corresponde a menos de 10% e nunca excede 30% de
46 toda a musculatura miotomal(2). Esse compartimento é constituído por fibras musculares vermelhas,
47 de contração lenta e metabolismo oxidativo. As fibras vermelhas apresentam pequeno diâmetro (entre
48 25 e 45 μm), excelente suprimento de capilares sanguíneos, alta concentração de mioglobina, grande
49 quantidade de mitocôndrias (na região subsarcolemal e entre as miofibrilas) e muitas gotículas de
50 lipídios(2,7). As fibras vermelhas são recrutadas durante a realização de movimentos lentos e de
51 sustentação, como a migração(11,12).

52 O compartimento branco corresponde entre 70 e 90% do volume total do tecido muscular(3),
53 sendo formado por fibras musculares brancas, de contração rápida e metabolismo glicolítico(12).
54 Quando comparadas às fibras vermelhas, as fibras brancas apresentam maiores diâmetros (entre 50 e
55 100 μm), menor suprimento de capilares sanguíneos, baixa concentração de mioglobina, poucas
56 mitocôndrias e poucas gotículas de lipídios(2,12). Esse tipo de musculatura é recrutada nos
57 movimentos bruscos de natação, como a captura de alimento e fuga de predadores(11,12).

CONCLUSÕES FINAIS

Concluimos que 30 dias de jejum e 60 dias de realimentação promoveu crescimento compensatório e alterou o perfil de expressão proteica do músculo branco de juvenis de pacu, *Piaractus mesopotamicus*.

As análises proteômicas no músculo branco de pacu, após jejum e 30 e 60 dias de realimentação, demonstraram mudanças de expressão do proteoma muscular principalmente em proteínas de vias envolvidas com o metabolismo celular, citoesqueleto, contração muscular, biosíntese de aminoácidos, regulação e proteínas nucleares. Após o jejum observou-se mudanças no metabolismo das fibras musculares e a alta expressão de proteínas relacionadas ao estresse e danos celulares demonstraram quebra da homeostase muscular, sugerindo intenso estresse nutricional. Durante o jejum ainda foi possível identificar algumas proteínas inseridas em vias de sinalização que poderiam estar atuando em mecanismos de compensação ao catabolismo muscular. A atrofia e o re-crescimento (re-growth) muscular foi corroborada pelas análises de expressão gênica, MAFbx e IGF-1, respectivamente, e pelas análises biométricas, taxa de crescimento, morfometria e morfologia das fibras musculares.

Devido ao intenso processo catabólico causado no músculo após 30 dias de jejum, o período de 30 dias de realimentação não foi suficiente para caracterizar o crescimento compensatório total. A análise proteômica demonstrou início do restabelecimento do metabolismo muscular e síntese proteica. Nesse período ainda foi possível observar mudanças na morfometria das fibras musculares e análises biométricas, embora as análises de expressão gênica indicassem mudanças transitórias após 48 horas de realimentação.

Ao final do experimento, 60 dias de realimentação, caracterizou-se crescimento compensatório total com o restabelecimento da homeostase muscular. As análises morfométricas foram similares, assim como as análises biométricas e a taxa de crescimento. Entretanto, a análise proteômica evidenciou inúmeras proteínas diferencialmente expressas, relacionadas principalmente, com o processo de crescimento compensatório tardio observado nesse experimento.

As diferentes abordagens proteômicas, *shotgun* e eletroforese bidimensional, além de complementares para a identificação do perfil proteico, propiciaram a observação de possíveis futuros biomarcadores do estresse nutricional, como a pavalbumina, e como possíveis indicadores da qualidade da carne e segurança alimentar em protocolos de jejum/realimentação, como *Heat Shock Proteins* e proteínas antioxidantes, no músculo branco de pacu.