

CÁSSIA NASSER DE FREITAS

**PERFIL PROTEICO DE *Prochilodus Lineatus* (VALENCIENNES, 1836) EM  
INDIVÍDUOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE CROMOSSOMOS B**

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

VIÇOSA  
MINAS GERAIS-BRASIL  
2018

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

**T**

**F866p**  
**2018**  
Freitas, Cássia Nasser de, 1991-  
Perfil proteico de *Prochilodus lineatus* (Valenciennes,  
1836) em indivíduos com diferentes números de cromossomos B  
/ Cássia Nasser de Freitas. – Viçosa, MG, 2018.  
xi, 59 f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Inclui anexos.

Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 41-50.

1. Proteômica. 2. Proteínas. 3. Cromossomos. 4.  
*Prochilodus lineatus*. I. Universidade Federal de Viçosa.  
Departamento de Biologia Animal. Programa de Pós-Graduação  
em Biologia Animal. II. Título.

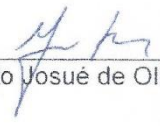
CDD 22. ed. 572.6

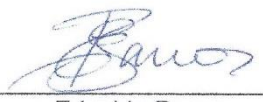
CÁSSIA NASSER DE FREITAS


**PERFIL PROTEICO DE *Prochilodus lineatus* (VALENCIENNES, 1836) EM INDIVÍDUOS COM DIFERENTES NÚMEROS DE CROMOSSOMOS B**

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

APROVADA: 26 de outubro de 2018.

  
Humberto Josué de Oliveira Ramos

  
Edvaldo Barros

  
Jorge Abdala Dergam dos Santos  
(Orientador)

Dedico este trabalho a todos que sempre me apoiaram e acreditaram no meu sucesso, incentivando a superar cada dificuldade e conquistar meu futuro.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, o qual sempre me protegeu e me deu forças para acreditar que tudo é possível;

À minha família, principalmente aos meus pais, Silma e Gutemberg, e ao meu irmão, Pedro, pelo amor incondicional e por acreditarem na minha capacidade e incentivarem a sempre superar cada desafio;

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia, professores e funcionários, pela oportunidade de aprender e realizar o curso de Pós-Graduação;

Ao Núcleo de Análises de Biomoléculas, pela disponibilidade da estrutura utilizada;

À CAPES e a CEMIG, pelo financiamento da pesquisa, assim como a todas agências que incentivam o desenvolvimento de projetos científicos;

Ao Prof. Dr. Jorge Abdala Dergam, por aceitar me orientar e repassar tanto conhecimento e vivência, para a construção dessa pesquisa e também do meu futuro profissional;

Ao TNS. Edvaldo Barros, por toda paciência e prazer em ensinar, sempre disponibilizando conhecimento e auxílio, e também a todos do Núcleo de Análises de Biomoléculas pela parceria e ajuda nas análises;

Ao Prof. Dr. Humberto Ramos pelas sugestões e melhorias nesta pesquisa;

Aos membros da banca examinadora e suplentes, pela disponibilidade e aceitação do convite;

À Prof. Maria Goreti, por disponibilizar o Laboratório de Enzimologia e Bioquímica de Proteínas e Peptídeos para o desenvolvimento desta pesquisa;

Ao Bruno, pela orientação e por sempre me acalmar nos momentos de desespero;

À Roberta, por toda sua disposição e grandiosa ajuda com as análises e revisão do projeto;

Aos membros do Beagle e da Enzimologia pela amizade e cooperação;

À República Toda Boa, minha família em Viçosa, amigas-irmãs que me proporcionaram companheirismo e diversão durante toda minha graduação e pós-graduação, me acolhendo e motivando em todos os momentos;

A todos os amigos que tive o prazer de conviver durante dez anos em Viçosa, em especial ao Alex e à Ariana, que em todos os momentos me apoiaram e incentivaram o meu sucesso;

Enfim, a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, meus mais sinceros agradecimentos.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>vii</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>ix</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>x</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>2</b>
2.1. O gênero <i>Prochilodus</i> .....	2
2.2. A importância da preservação .....	4
2.3. Proteômica .....	5
2.4. Cromossomos supranumerários (ou cromossomos B).....	7
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>10</b>
3.1. Objetivo geral.....	10
3.2. Objetivos específicos.....	11
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>11</b>
4.1. Coleta e amostragem.....	11
4.2. Análise citogenética .....	12
4.3. Análise proteômica .....	13
4.3.1. Extração de tecido muscular e obtenção do extrato proteico .....	13
4.3.2. Quantificação de proteínas .....	14
4.3.3. Eletroforese bidimensional.....	14
4.2.3.1. Focalização isoelétrica (1ª dimensão).....	14
4.2.3.2. Equilíbrio das fitas de gel.....	15
4.2.3.3. Eletroforese em gel de poliacrilamida (2ª dimensão) .....	15
4.3.4. Fixação e coloração do gel .....	16
4.3.5. Captura de imagens e análise da expressão .....	16
4.3.6. Tripsinização das amostras .....	17
4.3.7. Análise das proteínas por espectrometria de massas .....	18
4.3.8. Identificação das proteínas .....	19
4.3.9. Caracterização funcional das proteínas .....	20

<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>21</b>
5.1.	Proteoma diferencial no contraste entre espécimes 0B e 6B .....	21
5.2.	Proteoma diferencial no contraste com 0 e com 2 cromossomos B .....	27
5.3.	Proteoma diferencial no contraste do 0B com o 4B.....	30
5.4.	Análise comparativa geral entre os contrastes .....	32
<b>6.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>36</b>
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	<b>40</b>
<b>8.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>41</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	<b>51</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Exemplar da espécie <i>Prochilodus lineatus</i> .....	3
<b>Figura 2.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> comparando indivíduos que possuem 0 cromossomos B (JD5689) e 6 cromossomos B (JD5706). .....	23
<b>Figura 3.</b> Abundância relativa (% volume) da proteína diferencial enolase 3 $\beta$ muscular nos <i>spots</i> 404 e 126 do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> contrastando o indivíduo 0B (JD5689) com o indivíduo 6B (JD5706).....	24
<b>Figura 4.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais actina alfa 1b muscular nos <i>spots</i> 100, 103 e 107; da proteína miosina de cadeia leve regulatória no <i>spot</i> 14 do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> , comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 6B (JD5706). .....	25
<b>Figura 5.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do <i>P. lineatus</i> nos tratamentos com peixes com e sem o cromossomo B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG .....	26
<b>Figura 6.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 2B (JD5648). .....	27
<b>Figura 7.</b> Abundância relativa (% volume) da proteína diferencial actina $\alpha$ 1b nos <i>spots</i> 100 e 107 do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 2B (JD5648)...	28
<b>Figura 8.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do <i>P. lineatus</i> nos indivíduos 0B x 2B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG .....	29
<b>Figura 9.</b> Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais do músculo do peixe <i>P. lineatus</i> comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 4B (JD5675) .....	30
<b>Figura 10.</b> Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do <i>P. lineatus</i> nos indivíduos 0B e 4B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG .....	32
<b>Figura 11.</b> Rede de interações funcionais das proteínas identificadas com abundância diferencial em músculo do peixe <i>P. lineatus</i> . As proteínas foram analisadas usando o banco de dados STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do UNIPROT. As proteínas marcadas com um círculo vermelho são as proteínas identificadas por espectrometria de massa.....	32

<b>Figura 12.</b> Comparação da abundância da proteína actina $\alpha$ 1b muscular esquelética nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão. ....	33
<b>Figura 13.</b> Comparação da abundância da proteína actina $\alpha$ 1b muscular esquelética nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão .....	34
<b>Figura 14.</b> Comparação da abundância da proteína actina $\alpha$ 1b muscular esquelética nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão. ....	35
<b>Figura 15.</b> Comparação da abundância da proteína actina $\alpha$ 1b muscular esquelética nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão. ....	35
<b>Figura 16.</b> Comparação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em músculo de <i>P. lineatus</i> nos contrastes 0B x 2B, 0B x 4B e 0B x 6B. Em azul o quanto a proteína aumentou em relação ao indivíduo sem cromossomos B, em vermelho o quando a proteína diminuiu em relação ao indivíduo sem cromossomos B. O traço representa proteínas exclusivas de apenas um tratamento. O x está indicado onde não houve identificação para aquela proteína no contraste indicado. ....	36

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Revisão do número de cromossomos B em diferentes populações de <i>Prochilodus lineatus</i> .....	9
<b>Tabela 2.</b> Proteínas identificadas em músculo de <i>Prochilodus lineatus</i> no contraste 0B x 6B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG .....	25
<b>Tabela 3.</b> Lista das proteínas identificadas em músculo de <i>Prochilodus lineatus</i> no contraste 0B x 2B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.....	29
<b>Tabela 4.</b> Lista das proteínas identificadas em músculo de <i>Prochilodus lineatus</i> contraste 0B x 4B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.....	31

## RESUMO

FREITAS, Cássia Nasser de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, outubro de 2018. **Perfil proteico de *Prochilodus Lineatus* (Valenciennes, 1836) em indivíduos com diferentes números de cromossomos B.** Orientador: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

*Prochilodus lineatus* são peixes de grande importância ecológica, uma vez que processam sedimentos do fundo dos rios para se alimentar, influenciando nos padrões de distribuição e abundância de outras espécies. Esses peixes podem apresentar cromossomos B, os quais podem influenciar diretamente em seu desempenho. O objetivo deste trabalho foi auxiliar na elucidação da função desses cromossomos B, verificando como diferentes números destes influenciam no valor adaptativo da espécie. Esse estudo foi feito por meio de ferramentas proteômicas, proporcionando a identificação e comparação da abundância de proteínas. Os perfis foram obtidos por meio de eletroforese bidimensional (SDS-PAGE 2DE). As proteínas dos spots diferenciais foram tripsinizadas e os peptídeos tripticos analisados pelo espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF. As proteínas foram identificadas pelo MASCOT, por meio do confronto contra o banco de dados de proteínas de Characiformes do UNIPROT e validadas estatisticamente pelo SCAFFOLD. Os resultados indicam um aumento na abundância relativa de proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos a estresse como, glicólise e gliconeogênese, proteínas envolvidas no metabolismo energético do animal e proteínas do citoesqueleto, relacionadas ao processo de contrações musculares. A maior abundância relativa em proteínas do citoesqueleto e produção de energia sugere que a maior quantidade de cromossomos B correlaciona-se com o aumento de aspectos metabólicos importantes no sistema locomotor e, conseqüentemente, no desempenho do animal. Se essa correlação for demonstrada como válida para todas as classes de espécimes portadores de cromossomos B, poderia explicar que uma quantidade ótima para o desempenho dos espécimes da Estação de Piscicultura de Volta Grande seja de 6 cromossomos B.

## ABSTRACT

FREITAS, Cássia Nasser de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, October, 2018. **Protein profile of *Prochilodus Lineatus* (Valenciennes, 1836) in individuals with different numbers of chromosomes B.** Advisor: Jorge Abdala Dergam dos Santos.

*Prochilodus lineatus* are fish of great ecological importance, since they process sediments of the bottom of the rivers to feed, influencing the patterns of distribution and abundance of other species. These fish may have B chromosomes, which may directly influence their performance. The objective of this work was to aid in the elucidation of the function of these B chromosomes, verifying how different numbers of these influence on the adaptive value of the species. This study was done through proteomic tools, providing the identification and comparison of the abundance of proteins. The profiles were obtained by means of two-dimensional electrophoresis (SDS-PAGE 2DE). Differential spot proteins were trypsinized and tryptic peptides analyzed by the MALDI-TOF / TOF mass spectrometer. The proteins were identified by MASCOT, through the clash against the UNIPROT Characiform protein database and statistically validated by SCAFFOLD. The results indicate an increase in the relative abundance of proteins involved in different stress-responsive processes such as glycolysis and gluconeogenesis, proteins involved in energy metabolism of the animal and proteins of the cytoskeleton, related to the process of muscular contractions. The higher relative abundance in cytoskeletal proteins and energy production suggests that the greater quantity of B chromosomes correlates with the increase of important metabolic aspects in the locomotor system and, consequently, in the performance of the animal. If this correlation is shown to be valid for all classes of specimens bearing B chromosomes, it could explain that an optimal amount for the performance of the specimens of the Volta Grande Fish Culture Station is 6 B chromosomes.

## 1. INTRODUÇÃO

*Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) é uma espécie de curimba de grande porte que realiza longas migrações reprodutivas, cujas populações estão distribuídas em diversas bacias na América do Sul, como as bacias do Paraná-Paraguai e Paraíba do Sul (Sivasundar et al., 2001). Estes peixes possuem hábito alimentar iliófago, processando sedimentos presentes no fundo dos rios, de modo que influenciam em padrões de distribuição e abundância de outras espécies, tais como diatomáceas e invertebrados, criando também condições propícias para cianobactérias nitrificantes, sendo assim considerados engenheiros de ecossistemas (Flecker, 1996). Dessa forma, apresentam grande importância ecológica, além da comercial (Castro & Vari, 2003). Estudos populacionais incluindo citogenética, genômica e proteômica são fundamentais na compreensão das relações entre as diferentes populações de peixes, principalmente as de ampla distribuição. Estes estudos são fundamentais para garantir ações eficientes na conservação das espécies e no manejo efetivo de recursos pesqueiros.

O surgimento da proteômica, que tem como abordagem principal estudar os conjuntos de proteínas expressas pelo genoma (Wasinger et al., 1995), possibilitou uma maior compreensão biológica, funcional e fenotípica dos organismos (Bensimon et al., 2012). As proteínas participam do controle de processos celulares, agindo como enzimas, componentes estruturais, hormônios, anticorpos e receptores celulares (Aebersold & Mann, 2003; De Souza et al., 2003). Desse modo podem auxiliar neste estudo, que procura comparar espécimes com e sem a presença de cromossomos supranumerários do complemento A, denominados cromossomos B.

Em populações naturais, a distribuição dos cromossomos B segue uma distribuição binomial, com modas dominantes e classes extremas menos frequentes. Na amostragem deste trabalho sobre *P. lineatus*, em 154 indivíduos, apenas um espécime não era portador de cromossomos B, assim como apenas um apresentava 6 cromossomos B (maior valor encontrado). Por meio da

comparação do perfil proteico desses indivíduos, a partir de um estudo da abundância diferencial detectada, é possível explorar a possibilidade de um efeito fenotípico dos cromossomos B no desempenho dessa espécie.

A população de *Prochilodus lineatus* da Estação de Piscicultura de Volta Grande apresenta um perfil especial de cromossomos B em relação a outras populações, sendo menos diversificada e contando com cromossomos de tipo metacêntrico, os quais apresentaram, em estudos de cruzamento controlado, taxas de transmissão mais semelhantes aos cromossomos do complemento A (tendo um sistema de acumulação mais eficiente). Em contraste, as outras variedades de cromossomos B (incluindo submetacêntricos e acrocêntricos) apresentam uma perda de capacidade de transmissão, sendo esperado o declínio desses cromossomos em populações naturais panmíticas.

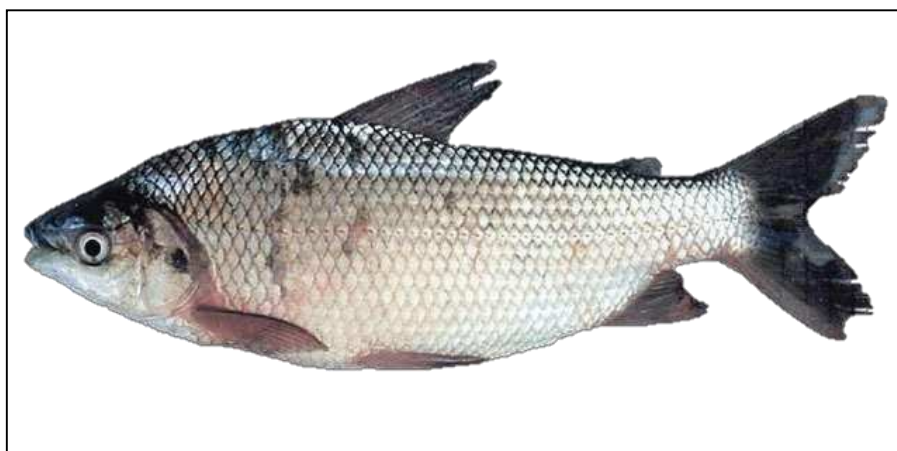
A identificação das proteínas foi realizada através da espectrometria de massas, com o auxílio de programas que relacionam a massa obtida experimentalmente com aquelas geradas teoricamente em um banco de dados (Aebersold & Mann, 2003). O método de identificação utilizado foi o *MS/MS Ion Search*, vantajoso por oferecer grande detectibilidade e maior seletividade de fragmento, diminuindo erros na identificação e quantificação dos analitos (Cristale, 2008).

Diante do pouco conhecimento sobre vantagens/desvantagens da presença destes cromossomos para as espécies que o possuem (Carvalho et al., 2008), o objetivo principal desta pesquisa foi auxiliar na elucidação da função dos cromossomos B em populações de *Prochilodus lineatus*, se estes poderiam ser favoráveis ou não ao portador, a partir da análise proteômica.

## **2. REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 O gênero *Prochilodus***

Dentre os peixes neotropicais, o gênero *Prochilodus* representa um dos mais abundantes e amplamente distribuídos na América do Sul, ocorrendo principalmente na bacia do Prata (rios Paraná-Paraguai) e no rio Paraíba do Sul (Castro & Vari, 2003; Froese & Pauly, 2015). Dos 50 nomes específicos existentes na literatura, 21 delas são consideradas válidas (Fricke et al., 2018); dentre elas inclui-se a espécie-alvo deste trabalho, *Prochilodus lineatus* (Valenciennes, 1836) (Figura 1).



**Figura 1.** Exemplar da espécie *Prochilodus lineatus*, conhecido popularmente como curimba.

*Prochilodus lineatus*, popularmente conhecida como curimba ou curimbatá, representa peixes de porte médio com escamas ciclóides ásperas e coloração prateada, de vida curta, geralmente 6 a 7 anos, e comprimento máximo de 61,5 cm (Payne e Harvey, 1989). Possuem nadadeira dorsal precedida por um espinho bifurcado e boca prostrátil com lábios carnosos, apresentando duas séries de dentículos falciformes ou espatulados enfileirados (Britski et al., 1988; Castro & Vari, 2003). Tem como características principais para reconhecimento a nadadeira caudal sem manchas pretas, a presença de linha lateral completa com 44 a 50 escamas e possuem de 42 a 44 vértebras (Castro, 1990).

Esses peixes apresentam ciclo de vida curto e realizam longas migrações reprodutivas (Godoy, 1975). O período reprodutivo ocorre de novembro a fevereiro com desova total, e eles chegam a percorrer cerca de 600 km entre seus locais de alimentação e desova (Godoy, 1975). A fecundação é externa com desenvolvimento embrionário rápido, sem cuidado parental e com ovos

pequenos, de coloração verde à cinza que necessitam de correnteza para oxigenação e dispersão (Sato & Godinho, 1999). Os ovócitos maduros possuem um diâmetro médio de 1,45 mm (Vazzoler, 1996).

Possuem hábito iliófago, processando sedimentos, e desse modo participam diretamente do equilíbrio do ecossistema aquático (Castro & Vari, 2003). Essa espécie foi observada como sendo o principal alimento para cinco espécies de predadores no rio Paraná (Luz-Agostinho et al., 2008). Apesar da sua grande ocorrência nas bacias brasileiras, tem sido observado um desgaste dos seus estoques naturais nos últimos anos (Carolsfeld et al., 2003).

Tendo em vista seu grande valor ecológico e comercial (Castro & Vari, 2003), uma vez que possui grande importância pesqueira (Silva, 2006), o repovoamento dessa espécie se torna essencial para a manutenção das populações nativas e a manutenção das relações tróficas desta espécie.

## **2.2 A importância da preservação**

Curimbas são peixes detritívoros que se alimentam de matéria orgânica e microorganismos encontrados associados à lama presente nas margens e no fundo dos lagos (Lowe-McConnell, 1975; Bowen, 1984; Gerking, 1994). Ao processar sedimentos influenciam nos padrões de distribuição e abundância de diversas espécies, como diatomáceas e invertebrados, além de criarem condições propícias para cianobactérias nitrificantes, sendo assim consideradas engenheiras de ecossistema (Flecker, 1996).

Com o aumento das grandes construções hidrelétricas, as espécies migratórias acabam tendo sua reprodução afetada, uma vez que estas alteram as características físicas e químicas dos rios, além de bloquear ou dificultar a migração reprodutiva. Consequentemente, causam declínio quantitativo e qualitativo, uma vez que mantém as populações isoladas, podendo levar até mesmo à extinção de espécies (Agostinho, 1992; Silva, 2006; Weingartner et al., 2008).

É necessário então tomar providências quanto à preservação ambiental, pois dependemos da energia elétrica tanto quanto do equilíbrio do ecossistema para sobrevivência. Em decorrência disso, há diversos mecanismos de transposição para que a alteração na biodiversidade local seja diminuída, como eclusas, elevadores e escadas, porém esses sistemas nem sempre são implantados devido ao seu alto custo (Viana et al., 2006), além de se mostrarem ineficientes em alguns casos (Carvalho, 2002).

Desse modo, temos como alternativa, a manutenção dos estoques pesqueiros através de programas de repovoamento, principalmente considerando-se espécies migradoras, que costumam ser as mais afetadas por essas barreiras. Repovoamentos devem ser feitos com auxílio de pesquisadores ambientais, de modo a promover a conservação dessas populações e a diversidade genética. Para assegurar melhores resultados, esses trabalhos devem se iniciar antes que ocorra redução significativa da variabilidade genética (Weingartner et al., 2008).

Neste contexto, trabalhos desenvolvidos utilizando-se a genômica e a proteômica tem sido de grande valia para a conservação das espécies. Nos estudos de conservação, marcadores moleculares têm sido frequentemente utilizados para estimar a variabilidade genética em populações naturais (Rowena et al., 2004; Spidle et al., 2004), e os microssatélites têm sido um dos marcadores mais importantes, uma vez que apresentam alto nível de polimorfismo (Fitzsimmons et al., 1995; Waldbieser et al., 2001; Carvalho, 2002; Hatanaka et al., 2006). Recentemente foi enfatizada a necessidade de incorporar métodos proteômicos em estudos populacionais e de ecologia (Biron et al., 2006), complementando com informações quantitativas sobre proteínas e suas expressões que não podem ser deduzidas apenas com a genômica (Jensen 2006; Schrimpf et al. 2009).

### **2.3 Proteômica**

O termo proteoma foi primeiramente definido em 1995, referindo-se ao

conjunto de proteínas complementares ao genoma (*PROTEin complement to a genOME*) (Wasinger et al., 1995). Do DNA à proteína, existem inúmeras modificações pós-transcricionais (*splicings* alternativos, adição de nucleotídeos, degradação do RNAm, etc.) e pós-traducionais (acetilação, fosforilação, metilação, etc) que podem interferir na função final da proteína. O surgimento da proteômica possibilitou uma maior compreensão biológica, funcional e fenotípica, uma vez que estuda de maneira aprofundada o conjunto de proteínas codificadas pelos genes, abrangendo identificação, caracterização quantitativa, estrutural, funcional e pós-traducional de proteínas, possibilitando também determinar relações entre elas e com o sistema biológico (Bensimon, Heck et al., 2012).

Apesar do genoma ser constante, o conjunto de proteínas expressas em diversos tecidos é dinâmico e varia no indivíduo de acordo com a condição fisiológica em que o organismo se encontra. Portanto, uma maior compreensão da formação do fenótipo exige maior detalhamento sobre todas as etapas da regulação gênica e seus produtos finais no nível do proteoma (Feder & Walser 2005; Karr 2008).

A identificação das proteínas pode ser realizada por diversos métodos, dentre eles por meio de programas que relacionam a massa obtida experimentalmente com aquelas geradas teoricamente em um banco de dados (Aebersold & Mann, 2003). O método *Peptide Mass Fingerprinting* (PMF) apresenta como vantagem a praticidade, a rapidez e o baixo custo, sendo a interpretação dos dados experimentais realizada por meio da comparação com os resultados genômicos.

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica muito utilizada na identificação de proteínas, a qual determina as massas dos átomos, moléculas ou seus fragmentos, através do comportamento dos seus íons, que em um campo elétrico ou magnético, são utilizados para determinar a relação entre a massa e a carga ( $m/z$ ) (Aebersold & Mann, 2003). O método de identificação *MS/MS Ion Search*, é vantajoso por oferecer grande detectibilidade e maior seletividade de fragmento, diminuindo erros na identificação e quantificação dos analitos (Cristale, 2008). Apesar da sua precisão, essa técnica apresenta bastante sensibilidade, para tanto podem ser empregados também

equipamentos de separação de moléculas, indicados para aumentar a eficiência da leitura, como a cromatografia líquida e gasosa (Abdelnur et al., 2008).

A proteômica além de estudar, de maneira quantitativa e/ou qualitativa, o conjunto de proteínas, pode estudar também as suas variantes na população, as mudanças em relação ao tipo de ambiente e as modificações e interações com outras proteínas (Valledor & Jorrín, 2011). Ela complementa a análise genômica, uma vez que os genes, ao serem transcritos em mRNA, podem ser traduzidos em proteínas. Desse modo, o estudo dessas proteínas pode fornecer inúmeros dados sobre a biologia e ecologia de populações e indivíduos, contribuindo para todas as suas áreas subjacentes, certificando por exemplo estudos de comparação entre cromossomos B. A proteômica já explora o fenótipo primário, sujeito a seleção natural em populações selvagens (Marshall et al., 2011; Diz et al., 2012).

## **2.4 Cromossomos B**

Estudos genéticos e moleculares propõem intervenções para conservar as espécies de peixes de água doce. Compreender as relações genéticas entre as diferentes populações de peixes é fundamental para garantir ações eficientes na conservação dos recursos pesqueiros. Anteriormente acreditava-se que as populações de peixes migratórios eram extensas e panmíticas, com cruzamentos ao acaso, devido a sua grande capacidade de dispersão trófica e reprodutiva, negligenciando a real necessidade de análises genéticas populacionais (Carvalho-Costa, 2008).

Análises citogenéticas relatam o conservadorismo de características cromossômicas presentes em *P. lineatus*, no que se refere ao número de cromossomos e fórmula cariotípica, e demonstram que indivíduos dessa espécie apresentam cromossomos supranumerários ao complemento A, também denominados cromossomos B, cuja ocorrência foi indicada há mais de três décadas (Pauls & Bertollo, 1983).

Os cromossomos B foram primeiramente descobertos em hemípteros (Wilson, 1907). Posteriormente, sua presença foi demonstrada em muitos outros organismos. Hoje, já foram caracterizados em milhares de seres vivos (Houben et al., 2014). Sua origem ainda é bastante discutida, dependendo da espécie estudada, ora a hipótese de origem intraespecífica (advinda do complemento A cromossômico) ora a de origem interespecífica (como subproduto de hibridização entre espécies próximas) ganha mais peso. Em *P. lineatus*, estudos com hibridização de sondas com cromossomos B microdissecados indicam que a origem interespecífica parece ser a mais provável para esta espécie, uma vez que não ocorre hibridização da sonda em cromossomos do complemento A (Voltolin et al., 2011; Voltolin et al., 2013b).

Como características gerais, os cromossomos B não seguem as leis mendelianas de segregação e transmissão. A sua ocorrência pode caracterizar grandes grupos, por exemplo nas espécies de curimbas do gênero *Prochilodus*, e ainda, variar de uma população para outra. A grande maioria dos cromossomos B é heterocromática, com heterocromatina fortemente condensada e formada por sequências em geral de DNA satélite, ribossomal e de elementos de DNA móbil (Camacho, 2005). Até recentemente, têm sido considerados elementos extras e dispensáveis para as funções vitais dos seus portadores. Estudos mais recentes indicam que eles apresentam muitas sequências derivadas de genes do complemento A (Houben et al., 2014).

Alguns pesquisadores afirmam que a convivência entre os cromossomos do complemento A e os cromossomos Bs ocorreria por meio do estabelecimento de um “sistema de eliminação” por parte do primeiro grupo de cromossomos, compensado por outro ‘sistema de acumulação’ do segundo grupo. A pressão de seleção para a existência do primeiro sistema é extremamente fraca, enquanto que a pressão de seleção do segundo sistema é muito mais forte, já que representa a ‘razão de ser’ dos cromossomos B (Östergren, 1945). Já por outro lado, há a interpretação heterótica dos cromossomos B, na qual autores propõem que os Bs seriam benéficos em baixos números ou frequências e deletérios em altos números (Darlington, 1958; White, 1973). Os efeitos benéficos da presença de cromossomos Bs foram demonstrados na cebolinha

*Allium schoenoprasum*: espécimes portadores de cromossomos Bs são capazes de germinar de forma mais efetiva em condições de seca (Plowman & Bougourd, 1994).

Em contraste com o observado em outras espécies de peixes neotropicais, os cromossomos B de *Prochilodus lineatus* podem ser considerados como microcromossomos, que em populações naturais seguem uma distribuição binomial, com modas dominantes e classes extremas menos frequentes. Seu número pode variar de 0 a 9 (Voltolin et al., 2011), mas a moda de ocorrência em populações do rio Mogi-Guaçu é de 2 a 3 (Cavallaro et al., 2000, Voltolin et al., 2010). Estes números variam a cada população, sendo registrados entre zero e nove cromossomos supranumerários, em maioria heterocromáticos (Tabela 1). Dentro da família *Prochilodontidae*, *Prochilodus argenteus* (Penitente et al., 2015), *Prochilodus brevis* (Pauls & Bertollo, 1990), *Prochilodus mariae* (Oliveira et al., 2003) e *Prochilodus nigricans* (Venere et al., 1999) também possuem cromossomos B descritos, apresentando de um a três por cariótipo.

BACIA	CARIÓTIPO	Nº B	REFERÊNCIA
Rio Paraná	40m+14sm	5	Pauls & Bertollo, 1990
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	Oliveira et al., 1997
Bacia do Rio Paraná	2n = 54	5	Cavallaro et al., 2000
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	40m+14sm	4	Maistro et al., 2000
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	Jesus & Moreira-Filho, 2003
Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	3	Vicari et al., 2006
Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	3	Artoni et al., 2006
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	40m+14sm	7	Artoni et al., 2006
Rio Paraná, Argentina	40m+14sm	0	Gras et al., 2007
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	7	Voltolin et al., 2009
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	5	Voltolin et al., 2010
Rio Paraná, Argentina	40m+14sm	2	Jorge et al., 2011
Rio Tibagi, Alto Paraná	40m+14sm	2	Terencio et al., 2012
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	4	Voltolin et al., 2013
Rio Mogi-Guaçu, Alto Paraná	2n = 54	9	Voltolin et al., 2013b

**Tabela 1.** Revisão do número de cromossomos B em diferentes populações de *Prochilodus lineatus*.

A taxa de transmissão dos Bs em *P. lineatus* foi estudada por Penitente et al. (2013, 2016) com cruzamentos experimentais. Os autores concluíram que os cromossomos B metacêntricos estão em fase estável nas populações do rio Mogi-Guaçu (taxa de transferência próxima a 0,5), enquanto que os cromossomos B do tipo acrocêntricos e submetacêntricos estão em fase de declínio, com perda do *drive* e transferência menor que 0,5. Recentemente, Penitente (2018) também confirmou que existem amplos padrões de variação da morfologia dos cromossomos B, dentro e entre as populações de *P. lineatus* na bacia do Paraná Superior. Ele indica que na bacia há ocorrência de 3 tipos morfológicos e ainda, variação no tamanho dos metacêntricos. Já na bacia do Baixo Paraná (ambas as regiões eram isoladas pela Sete Quedas, até 1982, quando começou o enchimento do reservatório da UHE Itaipu (Itaipu Binacional, 2018), no rio APA, afluente do rio Paraguai, a população de *P. lineatus* não apresentava cromossomos B. É interessante destacar que em geral, a morfologia dos cromossomos B reflete a morfologia dos cromossomos do complemento A, conforme observado em muitas espécies de mamíferos (Camacho, 2005).

O estudo desses cromossomos do tipo B permite inferir sobre o desempenho dos indivíduos que os possuem. Descobertas genômicas permitem testar duas hipóteses: os cromossomos B são parasitas que oneram a biologia dos seus portadores (Henriques-Gil & Arana, 1990; Jones, 1991; Camacho, 2000) ou acrescentam fitness ou valor adaptativo aos seus portadores (White, 1973; Holmes & Bougourd, 1989). A questão se eles representam um fator seletivo negativo ou positivo para os portadores pode ser analisada de forma direta, caracterizando a composição molecular deste tipo de cromossomos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contrastar os perfis de expressão proteica entre indivíduos de *Prochilodus*

*lineatus* com diferentes números de cromossomos B.

### **3.2 Objetivos específicos**

Selecionar indivíduos com diferentes números de cromossomos B por meio de análise citogenética;

Relacionar a abundância diferencial das proteínas nos espécimes de *P. lineatus* quanto ao volume dos *spots*;

Analisar diferenças no padrão de abundância relativa das proteínas presentes no músculo de *P. lineatus* em espécimes portadores e não portadores de cromossomos B;

Sequenciar os peptídeos trípticos das proteínas diferencialmente abundantes no músculo de *P. lineatus* por espectrometria de massa MALDI-TOF-TOF;

Identificar proteínas com abundância diferencial no músculo de *P. lineatus* por meio do confronto entre as listas de peptídeos identificados contra as proteínas depositadas em banco de dados.

## **4. MATERIAL E MÉTODOS**

O estudo foi desenvolvido no Laboratório de Sistemática Molecular em conjunto com o Laboratório de Enzimologia, Bioquímica de Proteínas e Peptídeos no Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária (BIOAGRO). As análises referentes à espectrometria de massas e de bioinformática foram realizadas no Núcleo de Análise de Biomoléculas (NUBIOMOL) na Vila Gianetti. Todos estes centros de pesquisa localizados na Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/Minas Gerais.

### **4.1 Coleta e amostragem**

Foram coletados e processados 154 indivíduos de *Prochilodus lineatus* em fevereiro de 2015, provenientes da base de piscicultura da CEMIG em Volta Grande/MG (permissão de coleta SISBIO 14975-1 fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (ICMBio) a Jorge Abdala Dergam). Todos os espécimes foram depositados na coleção científica do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, Brasil (MZUFV 4505).

Os peixes eutanasiados foram dissecados para obtenção do material para a análise citogenética (contagem dos cromossomos B) e para a análise proteômica e genômica (tecido muscular) a partir de cada espécime. Os tecidos musculares para análise proteômica foram acondicionados em nitrogênio líquido no local da coleta e após chegar ao laboratório foram transferidos para freezer - 80 °C.

#### **4.2 Análise citogenética**

Os espécimes foram injetados intraperitonealmente com uma solução de fermento, no intuito de fomentar a atividade mitogênica e desse modo obter um número adequado de células em divisão celular. Após 24 horas da injeção do fermento, foi injetado no ventre do animal, entre as nadadeiras peitorais e pélvicas, 0,1 ml de solução aquosa de colchicina 0,025 %, que permaneceu agindo durante 20 minutos. Faltando 2 minutos para completar o tempo da colchicina, os peixes foram transferidos para solução de óleo de cravo 4 % com a finalidade de anestesiá-los.

Os animais foram eutanasiados para retirada do rim anterior. Os fragmentos de rim cefálico foram separados em 15 mL de solução hipotônica (KCl 0,075 M) e uma suspensão de células foi obtida mediante a fragmentação mecânica do tecido, utilizando-se de uma seringa de vidro sem ponta e um béquer. A suspensão foi colocada em estufa a 37 °C, durante 20 min. As células foram separadas do meio líquido por centrifugação e o material fixado três vezes em fixador Carnoy: metanol e ácido acético (3:1). Após a última centrifugação e eliminação do sobrenadante, foi adicionado 1,5-2,0 ml de fixador e armazenado

em tubo Eppendorf a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Essa suspensão posteriormente foi pingada em lâminas aquecidas em água destilada a  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  e coradas com Giemsa 5 % diluído em tampão fosfato pH 6,8 (9,5 ml de tampão fosfato + 0,5 ml de solução-mãe de Giemsa), durante 5 minutos. Após serem lavadas em água corrente, as mesmas estavam prontas para serem analisadas.

Foram preparadas suspensões citogenéticas dos indivíduos e 10 lâminas para cada um deles. Essas lâminas foram analisadas em microscópios Olympus CX31 e selecionadas, em média, 30 metáfases por indivíduos. As imagens das metáfases foram capturadas no microscópio Olympus BX53 acoplado a uma câmera Olympus DP73. Em seguida, as mesmas foram examinadas para compreensão do padrão de distribuição e número de cromossomos B.

O número de cromossomos B foi conferido em pelo menos 30 metáfases para cada indivíduo, embora esta amostragem foi de 150 metáfases no espécime que não apresentou nenhum cromossomo B. A partir desses resultados, foram selecionados 4 espécimes com diferentes números de cromossomos supranumerários: um espécime com 0 cromossomos B (JD 5689), considerado o indivíduo controle, um espécime com 2 (JD 5648), um com 4 (JD 5675) e outro com 6 (JD 5706) cromossomos B.

### **4.3 Análise proteômica**

#### **4.3.1 Extração de tecido muscular e obtenção do extrato proteico**

Foram colocados 100 mg de tecido muscular de cada amostra em 400  $\mu\text{l}$  de solução de Tampão PBS (contendo NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  4,3 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1,4 mM) pH 7,3 a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  (de acordo com o protocolo de Barik et al., 2013, com modificações). O extrato proteico foi obtido pelo rompimento celular resultante da maceração do tecido muscular em um microtubo, através do atrito com um bastão de vidro. Após a maceração foi adicionado mais 800  $\mu\text{l}$  de tampão PBS pH 7,3 e 10  $\mu\text{l}$  de uma mistura de inibidores de proteases (contendo E-64 1,4 mM, aprotinina 80  $\mu\text{M}$ , pestatina 1,5

mM). A suspensão obtida foi centrifugada a 9500 g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante separado. O sobrenadante contendo o material solúvel foi retirado e denominado extrato proteico. O extrato foi concentrado por precipitação por tricloroacético (TCA) /Acetona 10 % (p/v) numa proporção 3:1, durante 12 h a -20 °C. Após a precipitação, a solução foi centrifugada a 9500 g por 10 min a 4 °C, o sobrenadante descartado e o precipitado lavado com acetona pura. A solução contendo precipitado proteico e acetona foi vortexada e centrifugada novamente, a 9500 g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado permaneceu a temperatura ambiente por 10 minutos para secagem. Em seguida o precipitado foi ressuspenso com a solução de reidratação contendo uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 % (p/v) e conservado a -20 °C para futuras análises.

#### **4.3.2 Quantificação de proteínas**

A partir dos extratos proteicos de cada tratamento, foi realizada a quantificação de proteínas em triplicata, utilizando-se a metodologia de Bradford (Bradford, 1976). Para a mesma, foi preparada uma curva padrão construída com concentrações crescentes de soroalbumina bovina.

#### **4.3.3 Eletroforese bidimensional**

Foi utilizado para a eletroforese bidimensional o sistema da GE Healthcare, composto dos módulos *Ettan IPGphor 3* (1ª dimensão, focalização isoeletrica) e *EttanDALTSix* (2ª dimensão, eletroforese em gel de SDS-PAGE).

##### **4.2.3.1 Focalização isoeletrica (1ª dimensão)**

A focalização isoeletrica utilizou fitas de gel de poliacrilamida de 24 cm com gradientes de pH 3 a 10 imobilizado (*IPG strips*, GE Healthcare). As fitas foram reidratadas com a solução proteica (amostras dos tratamentos com 0

cromossomos B, JD 5689, e 6 cromossomos B, JD 5706), por cerca de 20 h em temperatura ambiente, até completa reidratação, para um volume final de 450 µL utilizando a relação 1:1 de solução de reidratação com uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2 % (p/v) e solução Destreak (GE Healthcare), acrescido de 1 % de solução de anfólitos (IPG *buffer*, GE Healthcare).

Após a reidratação, as fitas foram submetidas à focalização isoelétrica no equipamento *IPGPhor 3* (GE Healthcare), de acordo com as seguintes etapas: início com 500 V constante por 1 h, seguido de 1000 V constante por 8 h, seguido por 8000 V gradiente por 3 h, 8000 V constante por 5 h, seguido por 50 V constante por até 6 h. As fitas focalizadas foram armazenadas a -80 °C, ou diretamente utilizadas para a segunda dimensão.

#### **4.2.3.2 Equilíbrio das fitas de gel**

Após a isoeletrofocalização, foram realizadas duas etapas para o equilíbrio das proteínas focalizadas. As fitas focalizadas foram reduzidas e alquiladas através de incubações em tampão de equilíbrio (Tris-HCl pH 8,8, 75 mM, SDS 2 %, glicerol 30 %, uréia 6 M, azul de bromofenol 0,002 %) sob 30 min de constante agitação. Durante a primeira etapa foi adicionado DTT 1,0 % (m/v) ao tampão de equilíbrio para a redução, e na segunda etapa, iodoacetamida 2,5 % (m/v) para a alquilação. Após estes passos, as tiras foram lavadas em tampão de corrida e colocadas diretamente sobre a parte superior de géis de SDS-PAGE 12,0 % para dar sequência à segunda dimensão.

#### **4.2.3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (2ª dimensão)**

Seguindo o método descrito por Laemmli (1970), a eletroforese em gel de SDS-PAGE foi realizada utilizando géis de 20 cm x 25 cm x 1,5 mm. Os géis de SDS-PAGE foram preparados utilizando o sistema de *Ettan DALTSix gel caster* (GE Healthcare). As fitas foram seladas com solução de agarose antes de iniciar

a corrida. Cada gel foi carregado com uma única fita e o marcador de ampla faixa *Broad Range* (Bio Rad), composto por miosina (200.000 Da),  $\beta$ -galactosidase (116.250 Da), fosfolipase b (97.400 Da), soroalbumina bovina (66.200 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (31.000 Da), inibidor de tripsina (21.500 Da), lisozima (14.400 Da) e aprotinina (6.500 Da). A corrida dos géis foi realizada a 20 °C temperatura, primeiramente utilizando uma corrente de 20 mA/gel durante 45 min e, em seguida, com uma corrente de 40 mA/gel até o final da corrida, a qual considerada ocorreu quando o corante migrava até 90 % do comprimento do gel.

#### **4.3.4 Fixação e coloração do gel**

Após o término da 2ª dimensão, os géis foram fixados com uma solução contendo ácido acético 15,0 % (v/v) e metanol 10,0 % (v/v). Terminada essa etapa após 12 h, essa solução foi retirada e uma solução de coloração foi adicionada contendo sulfato de amônio 10,0 % (m/v), ácido fosfórico 1,0 % (v/v), Coomassie Blue G-250 0,1 % (v/v) e metanol 20,0 % (v/v) durante aproximadamente 72 h, sendo descartada após este tempo. Em seguida, adicionou-se uma solução de descoloração contendo ácido acético 5,0 % (v/v) para a estocagem dos géis, até a retirada dos *spots* para a proteólise das proteínas.

#### **4.3.5 Captura de imagens e análise da expressão**

Os géis foram digitalizados usando o *Image Scanner III* (GE Healthcare) na modalidade de escaneamento transparente. As imagens digitais e suas análises comparativas foram efetuadas utilizando o *software Image Master 2D Platinum 7.0* (GE Healthcare). Através deste *software* foi feita a detecção automática dos *spots*, com correções manuais quando necessárias. No mesmo também foram obtidos o ponto isoelétrico e a massa molecular de cada proteína, assim como a porcentagem de seus volumes.

Foram comparadas triplicatas nos tratamentos sem cromossomos B (JD5689) e nos tratamentos com: 2 (JD5648), 4 (JD5675) e 6 (JD5706) cromossomos B. Primeiramente em cada triplicata: foram detectados os *spots*, determinados os *landmarks* (*spots* que servem de parâmetro para que o programa determine os *matches*) e feita a comparação dos *matches*. Em seguida, foi feita a comparação entre as classes ou tratamentos, tendo como padrão de comparação o indivíduo sem cromossomos B, para os contrastes 0B x 2B, 0B x 4B e 0B x 6B, determinando novos *landmarks* para a análise da abundância relativa por meio da detecção de *matches* dos *spots*.

Foram considerados *spots* diferencialmente abundantes aqueles que apresentaram ANOVA com  $p$  valor menor que 0,05 e variação de sobreposição de medidas (*ratio*) acima de 1,5. A abundância relativa foi calculada com base na comparação da porcentagem de volume dos *spots* diferencialmente abundantes.

#### **4.3.6 Tripsinização das amostras**

As proteínas com abundância diferencial presentes nos *spots* dos géis bidimensionais foram retiradas com o auxílio de ponteiras e colocadas em microtubos identificados, para que fossem submetidas ao processo de proteólise com a enzima tripsina (*Trypsin Gold, mass spectrometry*, Promega). Cada microtubo recebeu sucessivas lavagens com solução de descoloração contendo acetonitrila 50 % (v/v) e bicarbonato de amônio 25 mM, onde ao final o sobrenadante foi descartado. As lavagens foram realizadas a temperatura ambiente e sob agitação em vórtex.

Em seguida, os fragmentos de gel foram desidratados duas vezes com acetonitrila 100 % durante 5 min e submetidos a *speed vac* por 15 min. As proteínas foram então reduzidas com uma solução de DTT a 200 mM em bicarbonato de amônio 100 mM, a 56 °C durante 30 min em banho seco. Após esta etapa, as proteínas foram alquiladas com solução de iodoacetamida 200 mM em bicarbonato 100 mM, a 25 °C durante 30 min.

Na sequência, os pedaços de gel foram lavados com bicarbonato de amônio 100 mM, por 10 min, por duas vezes. Logo depois, os fragmentos de gel foram desidratados em acetonitrila 100 % por 5 min e secos em *speed vac* por 15 min.

A proteólise foi realizada utilizando a enzima tripsina (*Trypsin from porcine pancreas, Proteomics grade* - Sigma), seguindo o protocolo de Shevchenko et al., 2006, à concentração final de 500 ng/mL. Para cada amostra, os *spots* removidos dos géis foram reidratados com 20 µL de solução de clivagem, contendo a enzima tripsina em solução de bicarbonato de amônio 40 mM, pH 8,0 e acetonitrila 10 %, de forma a cobrir os pedaços do gel. Durante 45 min as amostras foram mantidas em banho de gelo, para que houvesse maior penetração da enzima no gel antes do início da digestão. Então, foram adicionados 50 µL da solução de bicarbonato de amônio 40 mM em cada tubo e incubados a 37 °C por 18 h.

Após a digestão, os microtubos contendo os fragmentos de gel foram submetidos a banho de ultrassom durante 10 min, centrifugados a 1500 *g* por 2 min e a solução foi então deslocada para novos tubos. Em cada fragmento de gel restante, em duas etapas sequenciais, foram adicionados 40 µL da solução de ácido fórmico 5 % (v/v) contendo acetonitrila 50 % (v/v), sendo submetidos à agitação por 2 min em vórtex e incubados por 15 min a temperatura ambiente, para recuperar a maior quantidade de fragmentos trípticos. Posteriormente, os fragmentos trípticos foram novamente incubados por mais 10 min no banho ultrassom, centrifugados e o sobrenadante foi removido e transferido a um novo microtubo. As amostras contendo os peptídeos clivados, foram concentradas até a secagem completa em *speed vac*.

#### **4.3.7 Análise das proteínas por espectrometria de massas**

Para a análise por espectrometria de massas, os peptídeos trípticos dos *spots* com abundância diferencial de proteínas foram ressuspensos em 10 µL de solução de acetonitrila 50 %, acidificada com ácido trifluoracético 0,1 %. Foi

utilizado como matriz o ácido ociano-4-hidroxicinâmico – HCCA (Bruker Daltonics, Alemanha), solubilizado na mesma solução da qual os peptídeos tripticos foram ressuspendidos, para uma concentração final de 10 mg/mL. Para calibração do método de análise MS1 foram utilizados peptídeos padrões (*Peptide Calibration Standard II*) (Bruker Daltonics, Alemanha). Em seguida foram aplicados e homogeneizados 1 µL de amostra e 1 µL de matriz em cada *spot* de placa de aço apropriada para a espectrometria. Os espectros de MS1 e MS2 foram adquiridos em espectrômetro de massas MALDI-TOF/TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight/Time-Of-Flight mass spectrometry), modelo *Ultraflex III* (Bruker Daltonics, Alemanha).

Para obtenção dos dados de MS1 utilizou-se o modo refletivo e positivo, com uma faixa de detecção de 500-3400 Da. Para a realização de MS2, usando o método LIFT no modo positivo, foram selecionados os íons com maior intensidade em relação à razão massa carga ( $m/z$ ).

Os dados obtidos foram gerenciados pelo *software Flexcontrol*, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha), sendo os espectros resultantes das análises MS1 e MS2 processados com o auxílio do *software FlexAnalysis*, versão 3.3 (Bruker Daltonics, Alemanha). As listas de picos de MS2 foram geradas no formato *mascot generic format* (mgf) pelo aplicativo *BioTools*, versão 3.2 (Bruker Daltonics, Alemanha).

#### **4.3.8 Identificação das proteínas**

As listas de massas foram confrontadas com o Banco de Dados de proteínas da ordem Characiformes, depositadas no UNIPROT, utilizando o aplicativo *MASCOT*, versão 2.4.0 (*Matrix Science*, London, UK). Os parâmetros utilizados para a pesquisa foram: digestão enzimática pela tripsina com uma clivagem perdida; permitindo uma tolerância de erro para o íon parental de 0,2 Da e para os fragmentos de 0,5 Da; carbamidometilação da cisteína como modificação fixa e oxidação da metionina como modificação variável.

O resultado obtido pelo *MASCOT* foi validado pelo programa *SCAFFOLD*,

versão 3.6.4 (*Proteome Software* INc., Portland, OR). Para a validação dos peptídeos identificados foi aplicado o algoritmo *Peptide Prophet* (Keller et al., 2002) e para as proteínas o algoritmo *Protein Prophet* (Nesvizhskii et al., 2003), como critério de aceitação foram adotados os parâmetros com o mínimo de 90 % de probabilidade de identificação para ambos, peptídeos e proteínas, com a presença de pelo menos um peptídeo único para cada proteína identificada.

#### 4.3.9 Caracterização funcional das proteínas

A classificação funcional das proteínas identificadas e validadas foi dada por meio da comparação das suas sequências com as proteínas ortólogas de eucariotos disponíveis no banco de dados *EuKarioto Orthologous Groups* KOG (Tatusov et al., 2003). Nessa classificação foi atribuído um ID do KOG à cada proteína que alinhou significativamente ( $E\text{-value} < 1e-4$ ) com as proteínas depositadas nesse banco de dados, usando o *Reverse Position Specific* BLAST (RPS-BLAST) (Marchler-Bauer et al., 2002; Schäffer et al., 1999).

Com o uso do aplicativo STRING (*Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes*, versão 10.0, [http:// string-db.org/](http://string-db.org/)) (Szkarczyk et al., 2014) foram elaboradas redes de interações entre as proteínas identificadas e validadas. Nessa análise, as redes foram obtidas usando a espécie de peixe Paulistinha *Danio rerio* como organismo de referência para as buscas nas bases de dados por meio das estratégias de *text mining*, *experiments*, *database* e *co-expression*, dentro de um nível de confiança acima de 0.90 e com 10 interações na primeira chamada. O gráfico da rede de interações foi gerado no modo *confidence view*, no qual os nós maiores representam proteínas com estrutura 3D conhecida e a espessura da linha entre os nós, indica o nível de confiança entre as proteínas de determinada interação; quanto mais espessa a linha, maior é a confiança. Também foi possível identificar a quais rotas metabólicas as proteínas identificadas pertencem e quais outras proteínas podem estar diretamente ligadas a elas nos processos bioquímicos.

## 5. RESULTADOS

Foram encontradas diferenças no perfil proteico em relação aos diferentes números de cromossomos. Por meio da análise do gel bidimensional foram observadas mudanças nos perfis proteicos nos tratamentos com 0 cromossomos B (amostra JD5689) comparados com os tratamentos com 2 (amostra JD5648), 4 (amostra JD5675) e 6 (amostra JD5706) cromossomos B. Estes espécimes são referidos doravante como 0B, 2B, 4B e 6B respectivamente.

### 5.1 Citogenética

Foram confirmadas variações em relação à quantidade de cromossomos B nos indivíduos. Foi encontrado apenas um indivíduo 0B e um indivíduo 6B (número máximo encontrado). Para tanto, foram selecionados também um indivíduo 2B e um 4B.

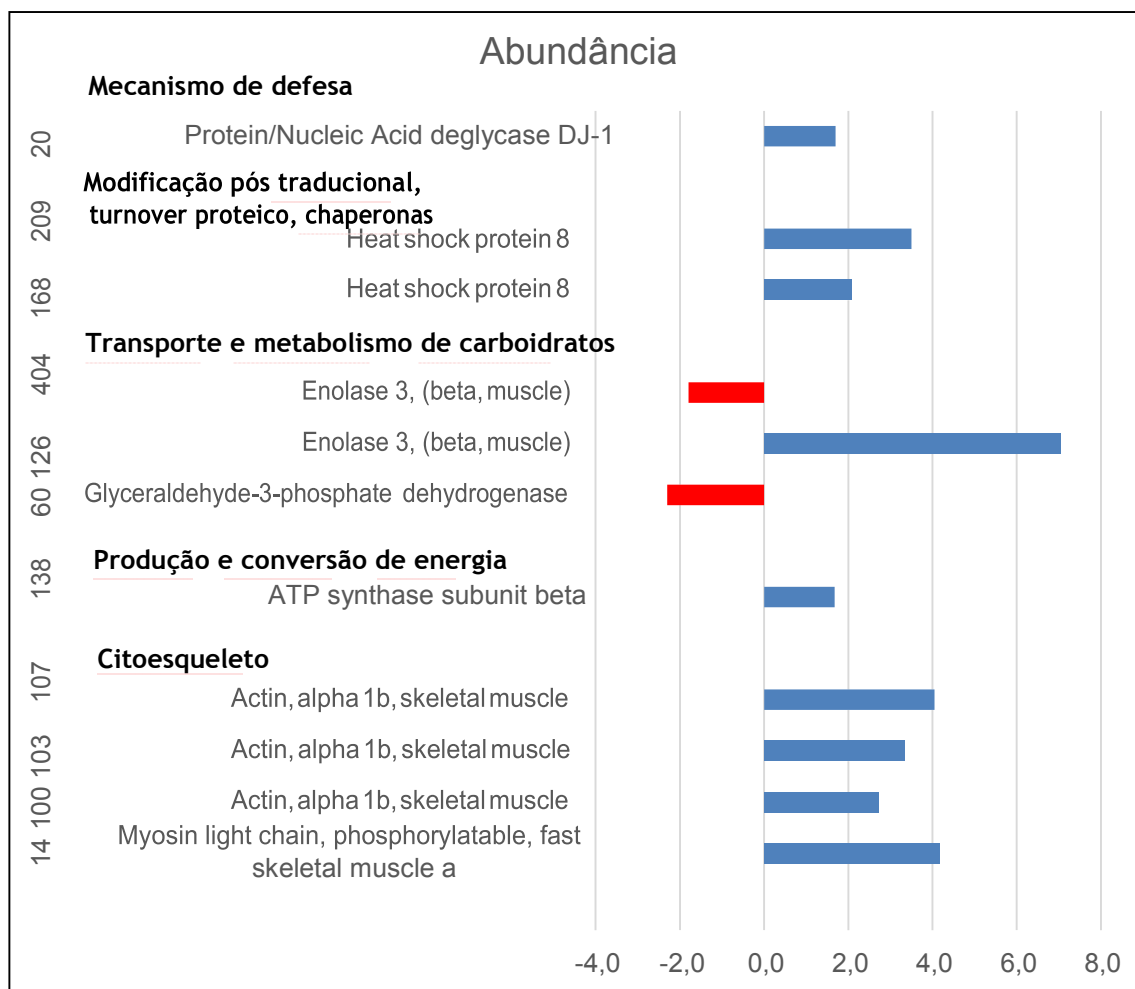
### 5.2 Proteoma diferencial no contraste entre espécimes 0B e 6B

No contraste 0B x 6B foram detectados um total de 633 *spots* nas triplicatas dos géis bidimensionais, dois quais 204 foram considerados significativos e 63 *spots* foram selecionados, considerados diferencialmente abundantes entre os tratamentos. Dos 63 *spots*: 39 estavam presentes em ambos os tratamentos, sendo 30 deles mais abundantes no espécime 6B (JD 5706) e 9 mais abundantes no espécime 0B (JD 5689); 24 foram encontrados exclusivamente em cada tratamento, apresentando 11 exclusivos no espécime 6B e 13 exclusivos no espécime 0B.

Dos 63 *spots* diferenciais no contraste 0 x 6, foram identificados 11 *spots* (Anexos 1 e 2), os quais correspondem a um total de 7 proteínas, uma vez que a mesma proteína pode ser encontrada em diferentes isoformas ou modificações pós-traducionais, sendo representada por mais de um *spot* no gel.

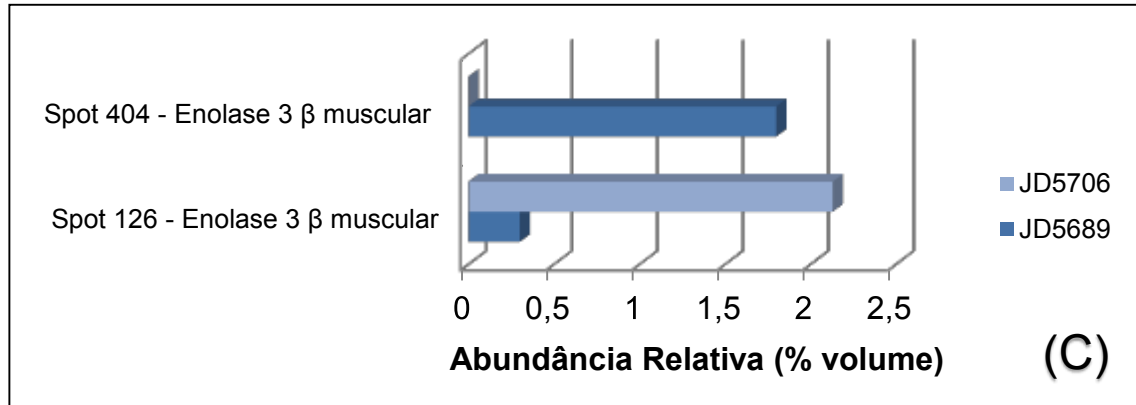
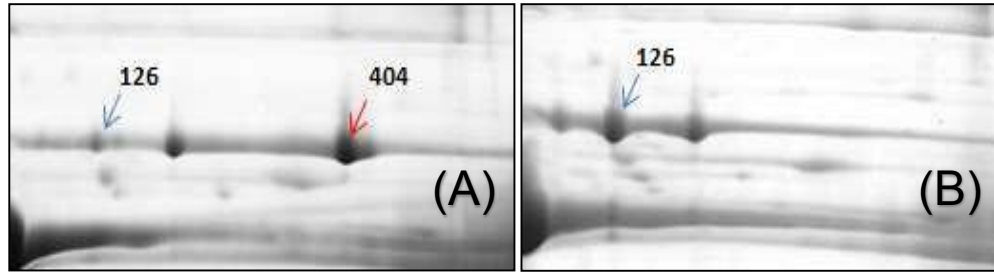
Os 11 *spots* identificados (Anexo 3) foram validados pelo SCAFFOLD com um ou mais peptídeos dentro dos parâmetros de validação, das quais a proteína identificada no *spot* 138, a ATP sintase subunidade  $\beta$  (identificada no UNIPROT com número de acesso W5LHE0) apresentou o maior número de peptídeos, sendo identificada com seis deles, com probabilidade média de identidade acima de 97%. Os três *spots* identificados como a proteína actina  $\alpha$  1b muscular esquelética (número de acesso W5K7M9) foram identificados com 2, 3 e 2 peptídeos, para os *spots* 100, 103 e 107 respectivamente. A proteína choque térmico 8 (número de acesso W5KA74) também foi identificada com 2 peptídeos para o *spot* 168, porém com apenas um peptídeo para o *spot* 209. As proteínas restantes também foram identificadas por apenas um peptídeo, como a enolase 3  $\beta$  muscular (número de acesso W5LLK3) identificada nos *spots* 126 e 404, a proteína miosina de cadeia leve muscular esquelética rápida fosforilável (número de acesso W5K709) no *spot* 14; a proteína/ácido nucléico deglicase DJ-1 (número de acesso Q5XJ36) no *spot* 20 e a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (número de acesso W5LI76) identificada no *spot* 60.

Dos 11 *spots* identificados, 10 foram relacionados a partir da variação de abundância entre os tratamentos e 1 foi observado exclusivamente em 0B (Anexo 3) (Figura 2). Foi observada uma maior abundância de 9 proteínas no indivíduo 6B (3 actina  $\alpha$  1b muscular esquelética; 2 proteínas de choque térmico 8; 1 miosina de cadeia leve muscular esquelética rápida fosforilável; 1 enolase 3  $\beta$  muscular; 1 ATP sintase subunidade  $\beta$ ; 1 proteína/ácido Nucléico DJ-1) e maior abundância de 1 proteína no indivíduo 0B (1 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase).



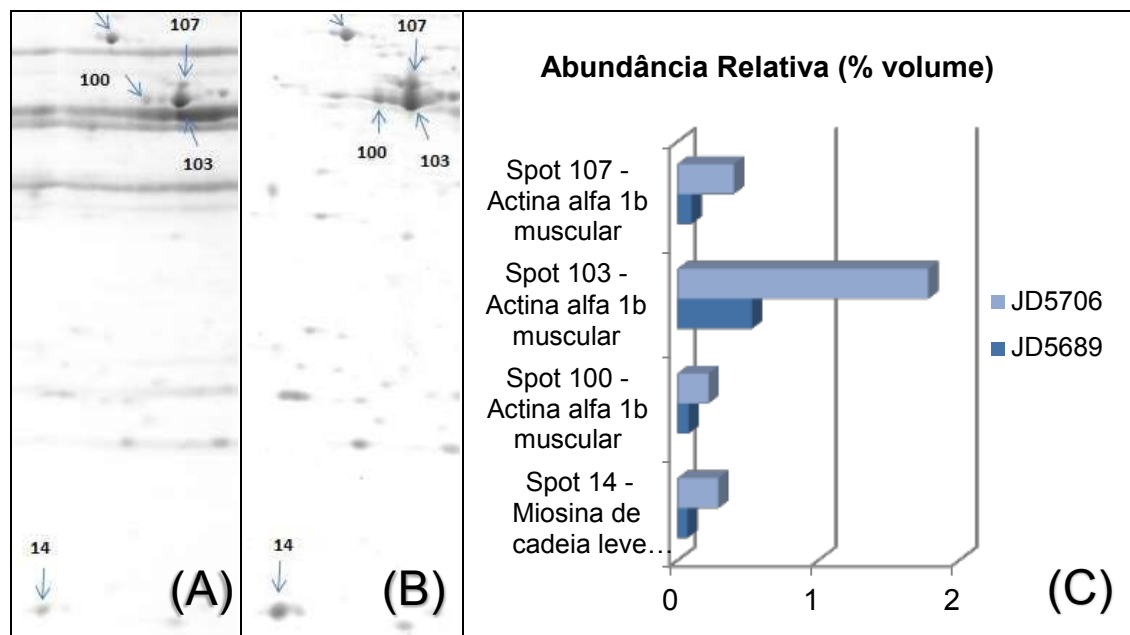
**Figura 2.** Abundância relativa das proteínas diferenciais do músculo do peixe *P. lineatus* comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 6B (JD5706). Barras em azul representam o aumento de abundância no indivíduo 6B, e barras em vermelho representam maior abundância no indivíduo 0B.

No espécime 0B foi encontrado um *spot* exclusivo (*spot* 404) dentre todos os indivíduos, identificado para enolase 3  $\beta$  muscular (*eno3*) (W5LLK3). No entanto, apesar de não apresentarem este mesmo *spot*, todos os tratamentos apresentaram outro *spot* identificado para a mesma proteína enolase 3  $\beta$  muscular (*spot* 126) (Figura 3).



**Figura 3.** Comparação dos *spots* 126 e 404 do músculo do peixe *P. lineatus*, identificados para a proteína enolase 3 $\beta$  muscular, contrastando os perfis proteicos dos indivíduos 0B (JD5689) (A) e 6B (JD5706) (B) e sua abundância relativa (C).

A proteína miosina foi encontrada em ambos tratamentos e, assim como a actina em todos os *spots* desse tratamento, apresentou maior abundância no indivíduo 6B (Figura 4). Dessa forma, nesse contraste, as proteínas identificadas relacionadas ao citoesqueleto responsáveis pela contração muscular foram mais abundantes no indivíduo 6B.



**Figura 4.** Comparação dos *spots* 14, identificado para a proteína miosina de cadeia leve regulatória e *spots* 100, 103 e 107, identificados para a proteína actina alfa 1b muscular, do músculo do peixe *P. lineatus*, contrastando os perfis proteicos dos indivíduos 0B (JD5689) (A) e 6B (JD5706) (B) e sua abundância relativa (C).

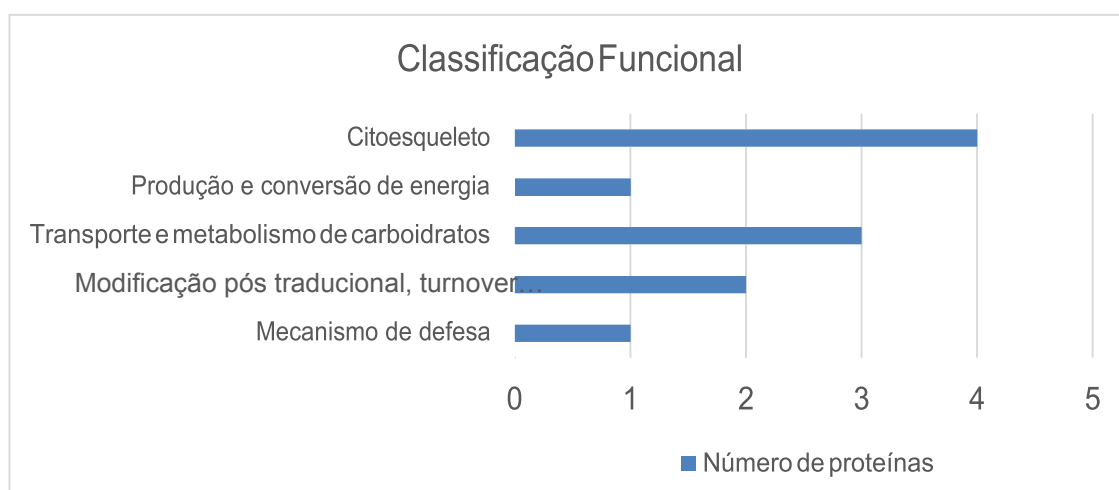
As proteínas identificadas do músculo de *P. lineatus* foram agrupadas em categorias funcionais, conforme sua possível função molecular, com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG (Tabela 2). Podemos observar que na classificação funcional pelo KOG (Figura 5), predominam as classes correspondentes ao metabolismo (42,85 %) e as responsáveis por processos e sinalizações celulares (42,85 %), enquanto as proteínas pouco caracterizadas representam o restante (14,3 %).

Uniprot ID	Identity (%)	KOG Description	KOG ID	KOG Class Description	Group
W5K7M9	81,17	Actin and related proteins	KOG0676	Cytoskeleton	Cellular processes and signaling
W5K709	60,47	Myosin regulatory light chain, EF-Hand protein superfamily	KOG0031	Cytoskeleton	Cellular processes and signaling

W5KA74	84,07	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	KOG0101	Post translational modification,	Cellular processes and signaling
				Protein turnover, chaperones	
W5LHE0	92,96	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	KOG1350	Energy production and conversion	Metabolism
W5LI76	71,34	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	KOG0657	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
W5LLK3	78,06	Enolase	KOG2670	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
Q5XJ36	54,45	Putative transcriptional regulator DJ-1	KOG2764	General function prediction only,	Poorly characterized
				Defense mechanisms	

**Tabela 2.** Proteínas identificadas em músculo de *Prochilodus lineatus* no contraste 0B x 6B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.

Estas proteínas foram distribuídas em cinco grupos funcionais (Figura 5): 4 proteínas de citoesqueleto, 1 de produção e conversão de energia, 3 de transporte e metabolismo de carboidratos, 2 de modificação pós traducional e chaperonas e 1 de mecanismo de defesa.

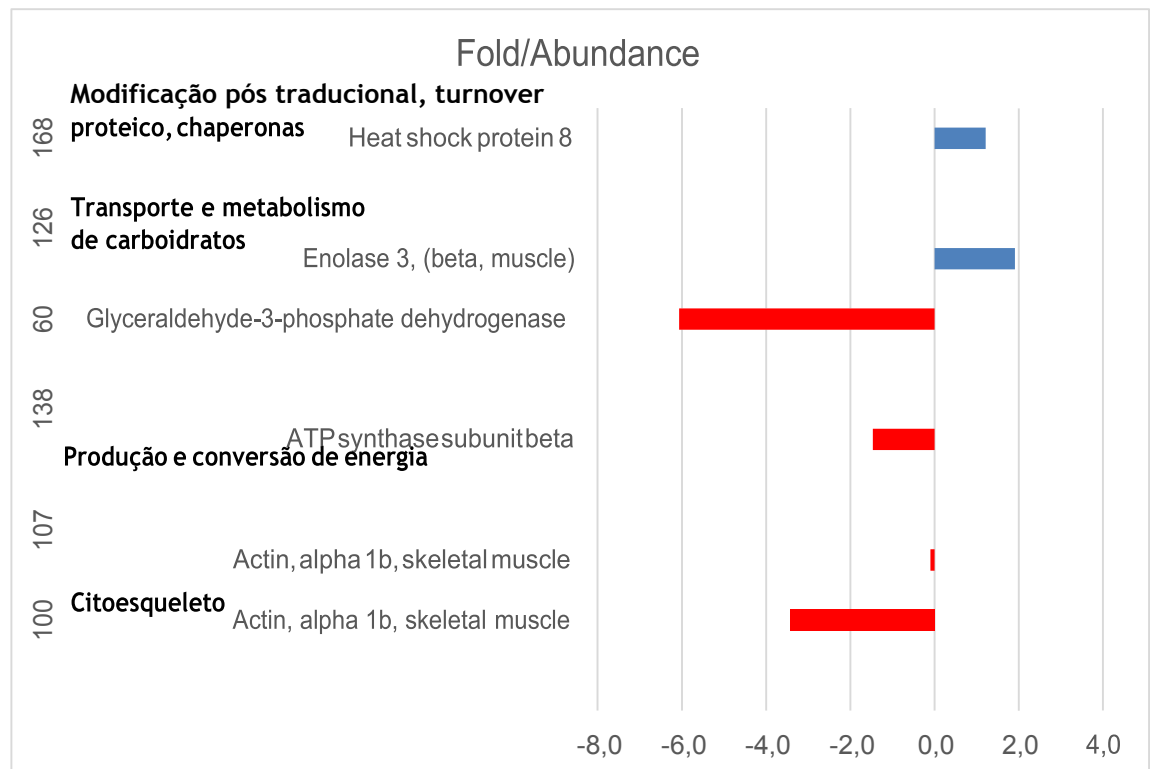


**Figura 5.** Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do *P. lineatus* nos tratamentos 0B e 6B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG.

Levando em conta a classificação funcional, a maior parte das proteínas apresentaram maior abundância em 6B, a única proteína que exibiu maior abundância no espécime 0B pertence ao transporte e metabolismo de carboidratos.

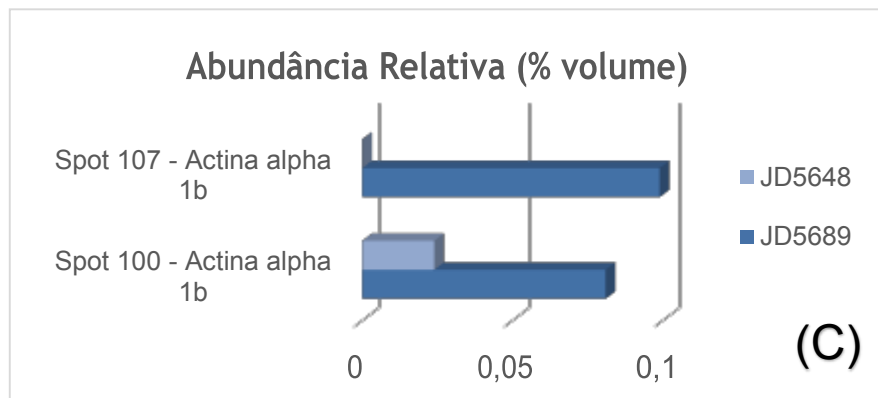
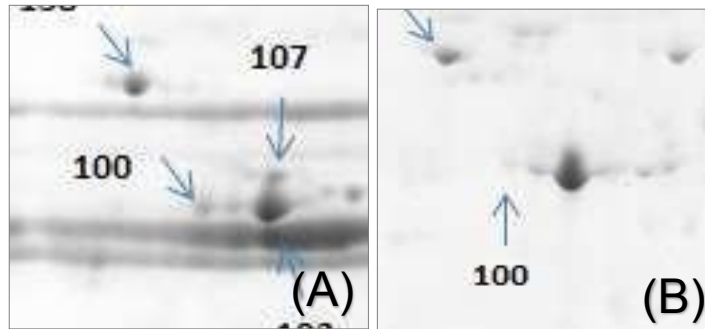
### 5.3 Proteoma diferencial no contraste com 0 e com 2 cromossomos B

No contraste 0B x 2B, foram detectados um total de 765 *spots* nas triplicatas dos géis bidimensionais, com 318 *spots* considerados significativos. Foram selecionados 6 *spots* (Figura 6) correspondendo a 5 proteínas com abundância diferencial significativa, onde 5 proteínas foram relacionadas a partir da variação de volume entre elas (1 proteína de choque térmico 8, 1 enolase 3  $\beta$  muscular; 1 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 1 ATP sintase subunidade  $\beta$ , 1 actina  $\alpha$  1b muscular esquelética), e uma (*spot* 107 - actina  $\alpha$  1b muscular esquelética) foi encontrada exclusivamente no tratamento 0B (Anexo 4 e 5).



**Figura 6.** Abundância relativa (% volume) das proteínas diferenciais do músculo do peixe *P. lineatus* comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 2B (JD5648).

A proteína actina  $\alpha$  1b muscular esquelética (actc1b) (W5K7M9) também foi encontrada em um *spot* exclusivo de JD5689 (*spot* 107), apesar de também estar presente como outra isoforma em ambos os tratamentos (*spot* 100) (Figura 7). Na comparação do contraste 0B x 2B, essa proteína apresentou maior abundância no indivíduo com 0 cromossomos B.



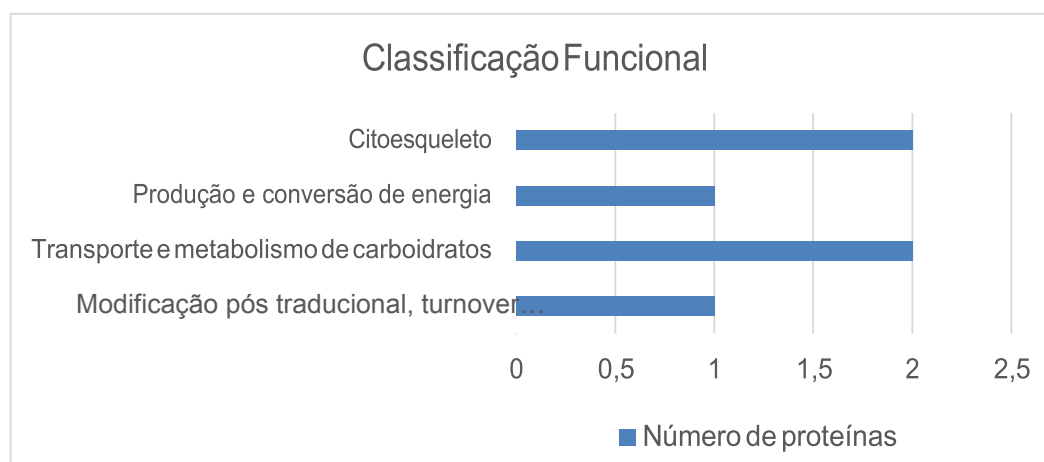
**Figura 7.** Comparação dos *spots* 100 e 107 do músculo do peixe *P. lineatus*, identificados para a proteína actina  $\alpha$  1b muscular, contrastando os perfis proteicos dos indivíduos 0B (JD5689) (A) e 2B (JD5648) (B) e sua abundância relativa (C).

Neste contraste foram identificados 6 *spots*, que foram agrupados de acordo com sua possível função molecular em categorias funcionais, com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG (Tabela 3). Na classificação funcional pelo KOG (Figura 8), predominam com 60 % as classes correspondentes ao metabolismo e com 30 % os processos e sinalizações celulares.

Uniprot ID	Identity (%)	KOG Description	KOG ID	KOG Class Description	Group
W5K7M9	81,17	Actin and related proteins	KOG0676	Cytoskeleton	Cellular processes and signaling
W5KA74	84,07	Molecular chaperones HSP70/HSC70, HSP70 superfamily	KOG0101	Post translational modification, Protein turnover, chaperones	Cellular processes and signaling
W5LHE0	92,96	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	KOG1350	Energy production and conversion	Metabolism
W5LI76	71,34	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	KOG0657	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
W5LLK3	78,06	Enolase	KOG2670	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism

**Tabela 3.** Lista das proteínas identificadas em músculo de *Prochilodus lineatus* no contraste 0B x 2B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.

Estas proteínas foram distribuídas em quatro grupos funcionais (Figura 8): 2 proteínas de citoesqueleto, 1 de produção e conversão de energia, 2 de transporte e metabolismo de carboidratos e 1 de modificação pós traducional, chaperona.

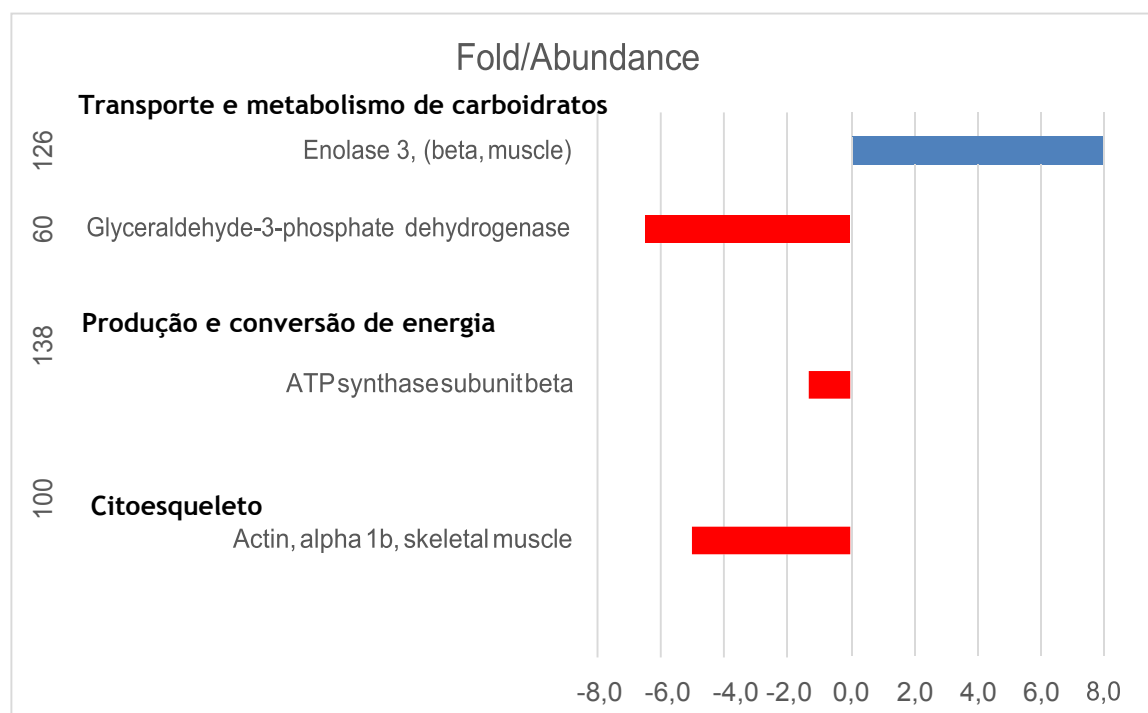


**Figura 8.** Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do *P. lineatus* nos indivíduos 0B x 2B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG.

Proteínas relacionadas ao citoesqueleto e produção e conversão de energia apresentaram maior abundância em 0B enquanto proteínas de modificação pós traducional, chaperonas exibiram maior abundância em 2B. Já quanto ao transporte e metabolismo de carboidratos: a proteína enolase apresentou maior abundância em 2B, enquanto a proteína gliceraldeído apresentou maior abundância em 0B.

#### 5.4 Proteoma diferencial no contraste do 0B com o 4B

No contraste 0B x 4B (Anexo 6), foram detectados um total de 762 *spots* nas triplicatas dos géis bidimensionais. Destes, 303 foram considerados significativos, onde foram seleccionados 11 *spots* dos quais 4 proteínas foram identificadas (Anexo 7), relacionadas a partir da variação de volume entre elas (1 enolase 3  $\beta$  muscular; 1 gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, 1 ATP sintase subunidade  $\beta$  e 1 actina  $\alpha$  1b muscular esquelética) (Figura 9).



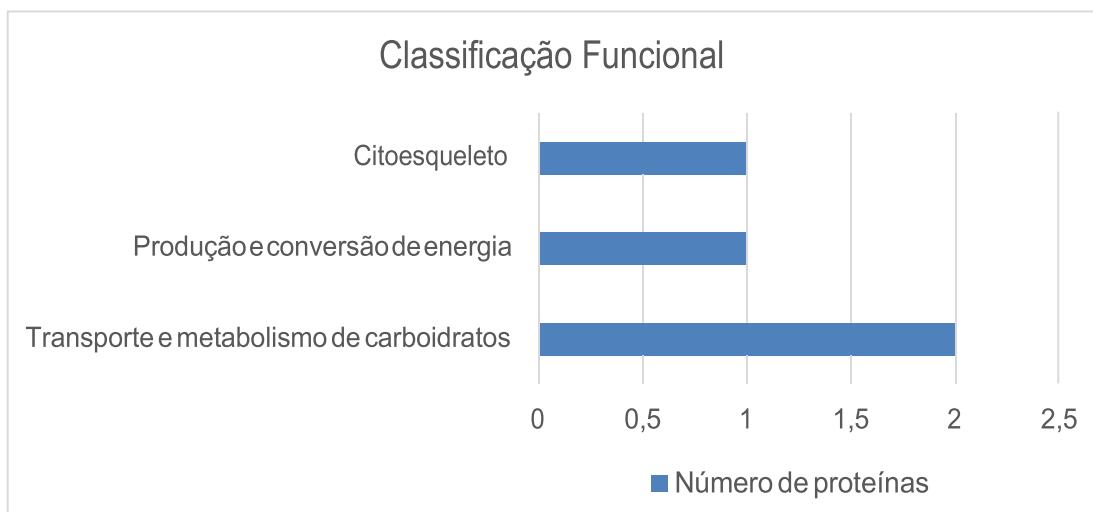
**Figura 9.** Abundância relativa das proteínas diferenciais do músculo do peixe *P. lineatus* comparando os indivíduos 0B (JD5689) e 4B (JD5675).

Dos 4 *spots* identificados, apenas um apresentou maior abundância no indivíduo com a presença de cromossomos B. As 4 proteínas identificadas foram agrupadas de acordo com sua possível função molecular em categorias funcionais, com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos anotadas no KOG (Tabela 4). Na classificação funcional pelo KOG (Figura 10), predominam com 75 % as classes correspondentes ao metabolismo e com 25 % os processos e sinalizações celulares.

Uniprot ID	Identity (%)	KOG Description	KOG ID	KOG Class Description	Group
W5K7M9	81,17	Actin and related proteins	KOG0676	Cytoskeleton	Cellular processes and signaling
				Protein turnover, chaperones	
W5LHE0	92,96	F0F1-type ATP synthase, beta subunit	KOG1350	Energy production and conversion	Metabolism
W5LI76	71,34	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase	KOG0657	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism
W5LLK3	78,06	Enolase	KOG2670	Carbohydrate transport and metabolism	Metabolism

**Tabela 4.** Lista das proteínas identificadas em músculo de *Prochilodus lineatus* contraste 0B x 4B, caracterizadas funcionalmente com a utilização do conjunto de proteínas ortólogas de eucariotos presentes no KOG.

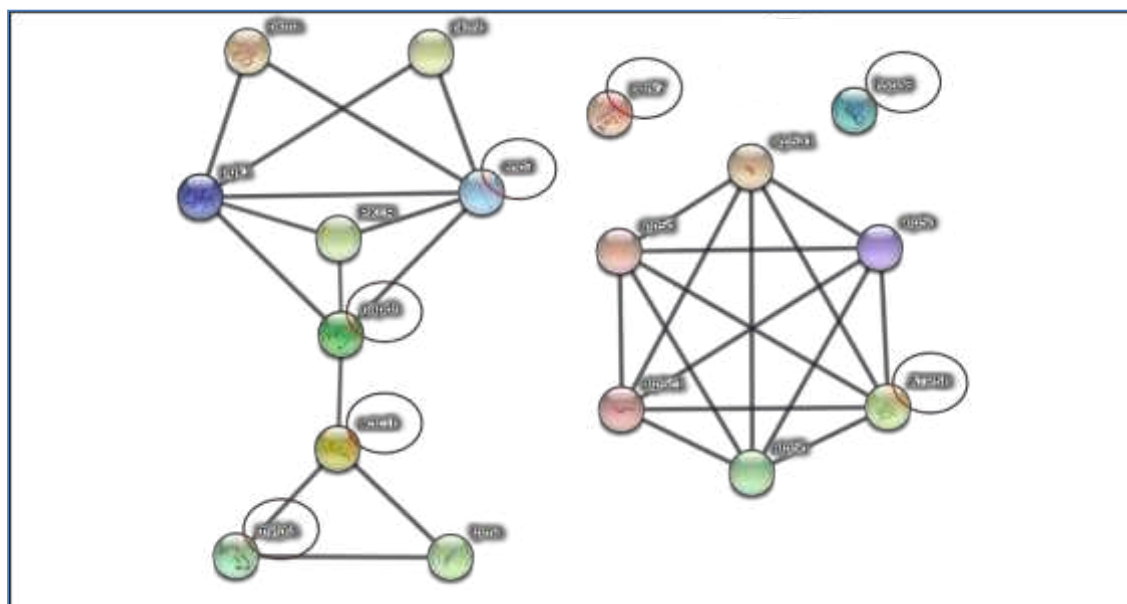
Estas proteínas foram distribuídas em três grupos funcionais (Figura 10): 1 proteínas de citoesqueleto, 2 de produção e conversão de energia e 2 de transporte e metabolismo de carboidratos.



**Figura 10.** Classificação funcional das proteínas identificadas em músculo do *P. lineatus* nos indivíduos 0B e 4B, usando proteínas de eucariotos anotadas no KOG.

### 5.5 Análise comparativa geral entre os contrastes

Foi elaborada uma rede de interações funcionais das proteínas com abundância diferencial através do banco de dados STRING (Figura 11), que também possibilitou relacionar as interações entre as proteínas identificadas e outras relacionadas a elas.



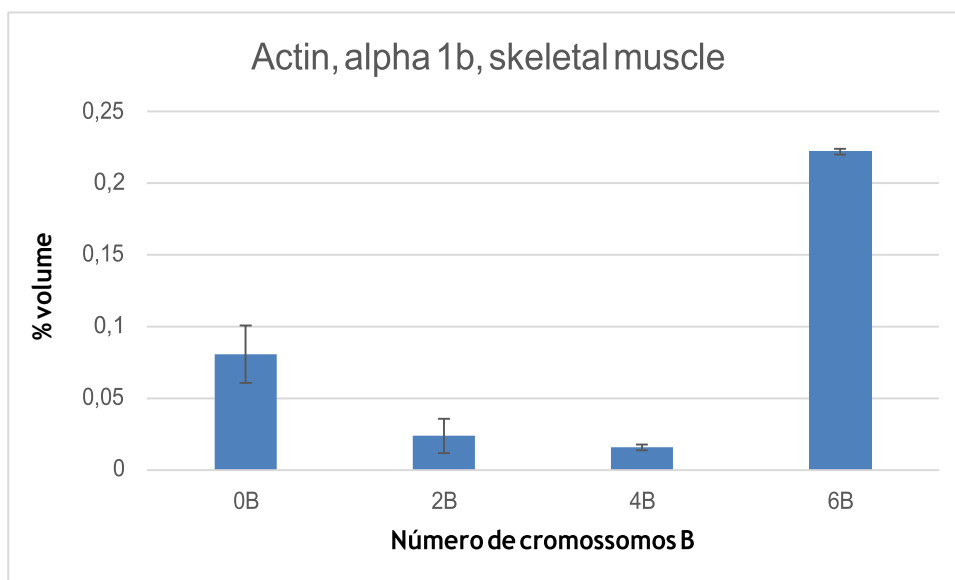
**Figura 11.** Rede de interações funcionais das proteínas identificadas com abundância diferencial em músculo do peixe *P. lineatus*. As proteínas foram analisadas usando o banco de dados

STRING. As letras seguidas de números correspondem ao número de acesso das proteínas no banco de dados do UNIPROT. As proteínas marcadas com um círculo vermelho são as proteínas identificadas por espectrometria de massa.

Foram relacionadas interagindo entre si ou com proteínas próximas, as proteínas ATP sintase subunidade  $\beta$  (ATP5B), miosina de cadeia leve muscular esquelética rápida fosforilável (mylpfa), actina  $\alpha$  1b muscular esquelética (actc1b), gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapdh) e enolase 3  $\beta$  muscular (eno3). Algumas proteínas identificadas, como a ácido nucléico deglicase DJ-1 (park7) e a choque térmico 8 (hspa8), não apresentaram nenhuma interação funcional direta com outras proteínas de acordo com os parâmetros identificadas neste trabalho, mesmo participando das mesmas vias (Figura 11).

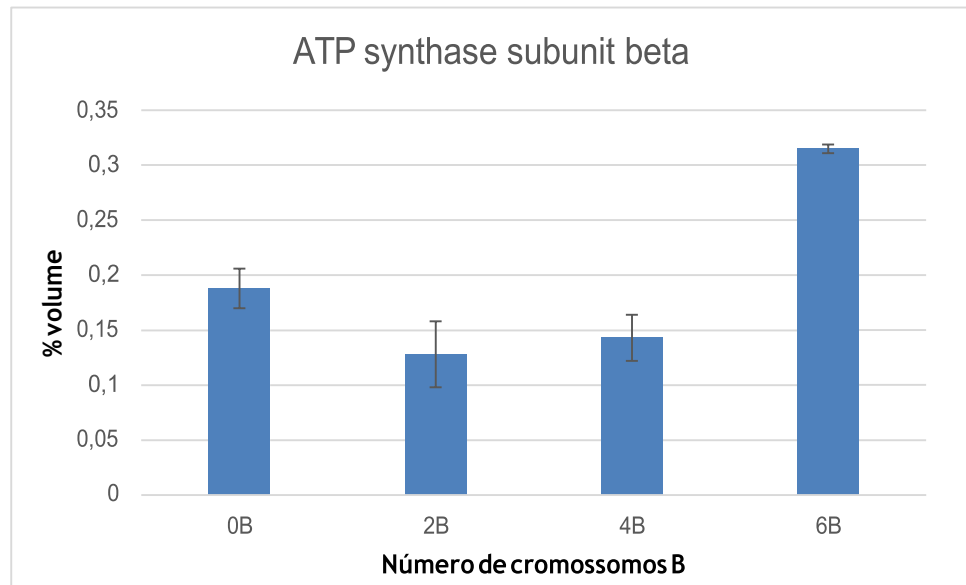
A partir da comparação entre os indivíduos (Anexo 8), verificou-se a presença de 4 *spots* presentes em todos os indivíduos, identificados para as proteínas ATP, enolase 3, actina e gliceraldeído já mencionadas.

Diferentes isoformas da actina foram encontradas nos tratamentos. Destas, apenas o *spot* 100 foi identificado em todos eles. Esta proteína apresentou maior abundância no indivíduo com número elevado de cromossomos B (Figura 12).



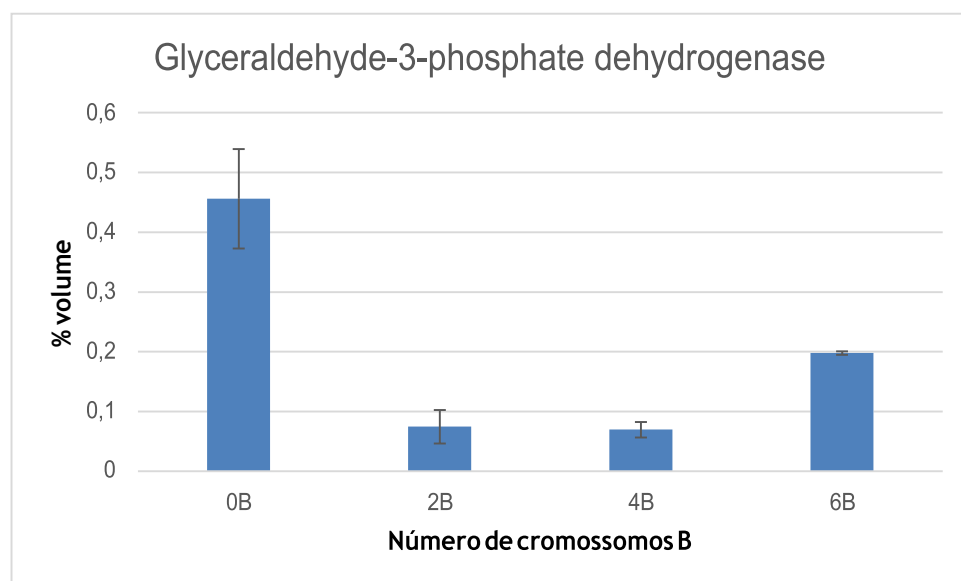
**Figura 12.** Comparação da abundância da proteína actina  $\alpha$  1b muscular esquelética nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão.

Assim como a actina, a ATP também apresentou maior abundância nos indivíduos com números contrastantes de cromossomos, com uma abundância mais elevada em 6B, que se mostrou cerca de duas vezes maior que a abundância nas médias (2B e 4B) (Figura 13).



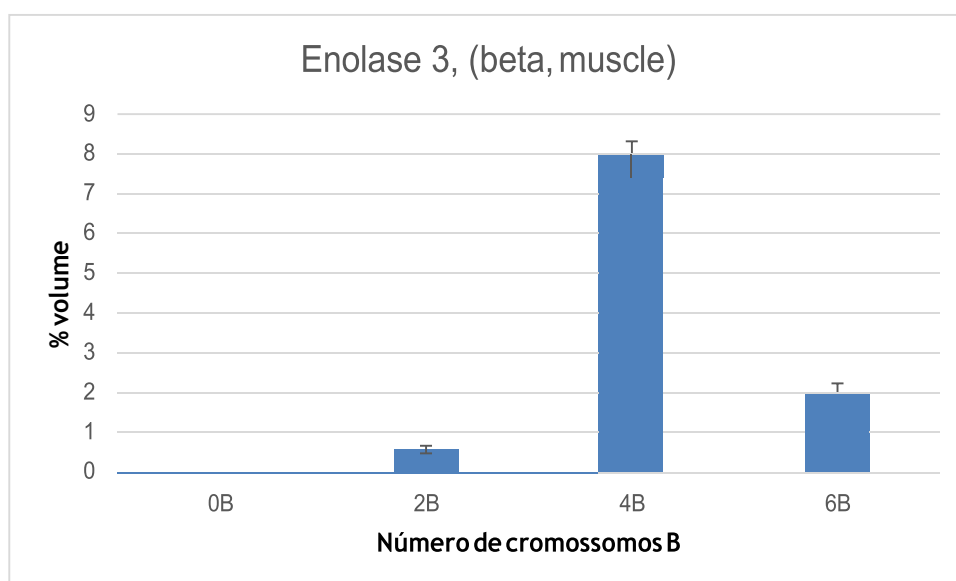
**Figura 13.** Comparação da abundância da proteína ATP sintase subunidade  $\beta$  nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão.

A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase teve sua abundância diminuída em qualquer presença de cromossomos B (Figura 14). Em 0B sua abundância faz-se mais de duas vezes maior do que em 6B, esta última que ainda exibiu maior abundância que os indivíduos com números de B modais.



**Figura 14.** Comparação da abundância da proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão.

O *spot* 126, identificado para enolase 3 apresentou uma abundância muito elevada no indivíduo 4B, contrastando em valor de volume até mesmo com as outras proteínas já citadas acima (Figura 15).



**Figura 15.** Comparação da abundância da proteína enolase nos indivíduos 0B, 2B, 4B e 6B. Valores médios acompanhados de desvio padrão.

Foi verificado que, se tratando de números extremos de cromossomos B (0B e 6B), as proteínas (em maioria) apresentaram maior abundância na presença de cromossomos B. Já quando relacionados indivíduos com números medianos de cromossomos B, a abundância dessas proteínas prevaleceu na ausência destes (Figura 16).

Spot ID	Protein Name	Access Number	Abundância diferencial em relação ao indivíduo sem cromossomos B		
			0B x 2B	0B x 4B	0B x 6B
14	<i>Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle a</i>	W5K709	x	x	4,169
20	<i>Protein/Nucleic Acid deglycase DJ-1</i>	Q5XJ36	x	x	1,698
60	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	W5LI76	6,064	6,477	2,303
100	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	3,43	5,012	2,729
103	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	x	x	3,336
107	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	-	x	4,050
126	<i>Enolase 3, (beta, muscle)</i>	W5LLK3	1,913	2,365	7,051
	<i>Pyruvate carboxylase</i>	W5LFN3	x	x	
138	<i>ATP synthase subunit beta</i>	W5LHE0	1,467	1,317	1,675
168	Heat shock protein 8	W5KA74	1,216	x	2,070
209	Heat shock protein 8	W5KA74	x	x	3,499
404	Enolase 3, (beta, muscle)	W5LLK3	x	x	-

**Figura 16.** Comparação das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em músculo de *P. lineatus* nos contrastes 0B x 2B, 0B x 4B e 0B x 6B. Em azul o quanto a proteína aumentou em relação ao indivíduo sem cromossomos B, em vermelho o quanto a proteína diminuiu em relação ao indivíduo sem cromossomos B. O traço representa proteínas exclusivas de apenas um tratamento. O x está indicado onde não houve identificação para aquela proteína no contraste indicado.

## 6. DISCUSSÃO

Foi possível observar nos tratamentos que a maior parte das proteínas identificadas corresponde a proteínas relacionadas ao metabolismo. Esses resultados indicam um aumento na abundância relativa de proteínas envolvidas em diferentes processos responsivos a estresse como: glicólise e gliconeogênese (gapdh e eno3); respiração, proteínas envolvidas no metabolismo energético do animal (pcl e ATP5B) e proteínas do citoesqueleto (actc1b e mylpfa), relacionadas ao processo de contrações musculares.

A maior abundância relativa em proteínas do citoesqueleto e produção de energia no metabolismo do carbono sugerem que o peixe com maior número de cromossomos B, no caso o 6B (JD5706), possua maior desempenho, uma vez que, a abundância dessas proteínas e estas funcionalidades estão diretamente ligadas ao desempenho da espécie, assim como a maior abundância dessas proteínas em uma mesma via tende a tornar a mesma mais ativa.

Analisando cada proteína, foi possível observar que a abundância da actina aumentou em 6B, enquanto números medianos exibiram menor abundância desta. A actina  $\alpha$  1b é uma proteína constitutiva do músculo esquelético dos peixes, que possui diferentes isoformas e é altamente conservada. Ela é responsável por atividades envolvendo a motilidade, citocinese, integridade celular e nas contrações de células musculares através da interação com filamentos de miosina (Negra et al., 2011; Sztal et al., 2015). De acordo com o observado nos perfis proteicos, podemos sugerir que os *spots* 126 e 404 representam formas ativa e inativa da actina.

Foi possível observar a interação da actina com a proteína identificada em 0B e 6B, miosina (mylpfa), a qual corresponde a proteínas que atuam em conjunto com vários componentes na contração muscular, como as ATPases de ligação de actinas, que atuam como motores moleculares para fornecer uma variedade de funções associadas ao movimento. A miosina é a transdutora de energia mecanomecânica, cujo domínio motor (ou cabeça) interage com a actina no filamento fino gerando força, potência e encurtamento (Irving et al. 1992; Yu et al. 2016).

Sabe-se que o músculo esquelético é um tecido plástico que desempenha

um papel essencial na locomoção e no metabolismo da energia (King et al., 2004; Wen & Ushio, 2017). Em adultos, o principal padrão de crescimento muscular é referido como hipertrofia muscular, que é caracterizada por um aumento na massa muscular e uma área transversal aumentada devido ao crescimento de miofibras (Hernandez & Kravitz, 2003; Wen & Ushio, 2017). Desse modo, a maior abundância das proteínas actina e miosina no indivíduo 6B sugere um maior desenvolvimento muscular no peixe, podendo auxiliar na sua capacidade de sobrevivência.

O maior desenvolvimento muscular leva ao aumento do gasto energético celular, ativando as vias de glicólise e do ciclo de Krebs. A grande abundância das proteínas envolvidas no metabolismo do carbono, como por exemplo a enolase, e na produção de energia, como produção de ATP, no indivíduo 6B, possivelmente está relacionada à maior atividade da contração muscular no peixe devido à hipertrofia do músculo esquelético.

Como observado, a proteína identificada para ATP sintase subunidade  $\beta$  (ATP5B), tem interações fortes e diretas com outras proteínas ATP. Estas atuam em conjunto na fosforilação oxidativa como produto final do metabolismo energético, formando uma grande rede de interações entre proteínas de produção e conversão de energia.

A síntese de ATP é proveniente da oxidação gerada na degradação de carboidratos, gorduras e aminoácidos. Ela além de atuar como uma “moeda de energia”, é capaz também de doar um grupamento fosfato para outras moléculas (fosforilação). Em indivíduos fotossintéticos, ela é utilizada na fotofosforilação, onde os mesmos capturam a luz proveniente do sol para produzir ATP (Arnon, 1954). Sua abundância se deu maior no indivíduo 6B, onde podemos sugerir que com a maior concentração de outras proteínas há maior liberação de ATP.

A gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapdh) apresentou uma maior abundância no indivíduo 0B em relação aos demais.

Essa enzima catalisa a fosforilação oxidativa, sendo essencial nas vias de glicólise e gliconeogênese. Pode ligar-se ao DNA ou RNA, assim como aos

cofatores NAD<sup>+</sup> e NADH. Ela interage com microtúbulos além de participar na fusão de membranas celulares (Hernandez-Fonseca & Massieu, 2005; Hara & Snyder, 2006).

Ela interage diretamente a enolase 3  $\beta$  muscular (eno3), uma vez que ambas participam do transporte e metabolismo de carboidratos. As proteínas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapdh) (W5LI76) e enolase 3  $\beta$  muscular (eno3) estão dentro de uma grande rede de interações. Primeiramente, participam da glicólise e gliconeogênese, do metabolismo de carbono, assim como da biossíntese de aminoácidos. Juntamente à proteína ATP sintase subunidade  $\beta$  (ATP5B) elas participam das vias metabólicas, transporte e metabolismo de carboidratos e produção de energia. A proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (gapdh) também participa do processo de estabilização de proteínas, a qual também participa a proteína/ácido nucléico deglicase DJ-1 (park7).

A proteína correspondente ao *spot* 126, identificada por apenas um peptídeo, apresentou uma abundância consideravelmente maior em 0B em relação aos demais. A identificação mais precisa das proteínas acontece quando estas são identificadas com um maior número de peptídeos, o que pode oferecer uma maior cobertura desses peptídeos na sequência depositada da proteína nos bancos de dados. O número de peptídeos para a identificação depende também dos dados presentes nos bancos, pois nem todas as proteínas que estão depositadas no banco de dados possuem suas sequências completas, muitas estão depositadas como fragmentos, o que pode dificultar a identificação e os números de peptídeos (Walther & Mann, 2010).

A enolase 3, que é uma enzima abundante em músculo, apresentou-se em outra isoforma no *spot* 404 do indivíduo 0B. O aparecimento dessas isoformas é normal e ocorre como forma de regulação do metabolismo do carbono e consumo de energia, na via glicolítica (Nelson & Cox, 2014; Foucault et al., 2000). A enolase é uma enzima homodimérica pertencente à família das liases, quebrando ligações carbono-oxigênio. Ela catalisa a desidratação 2-fosfo-D-glicerato (reversível) em fosfoenolpiruvato, também como parte das vias glicolíticas e de gliconeogênese.

Sua presença ocorre em tecidos e organismos que realizam glicólise e fermentação. Tem como funções moleculares: permitir a ligação de íons de magnésio e de metal, permitir a atividade de hidratase de fosfopiruvato; nos processos biológicos faz parte do complexo hidropase fosfopiruvato; envolvida no processo glicolítico (Nelson & Cox, 2014).

Foi possível observar que a maior parte das proteínas identificadas apresentaram maior abundância em 6B. Quanto maior a abundância proteica em um espécime, há maior quantidade de proteínas no *spot* daquele indivíduo, indicando uma maior interação e atividade de suas vias. Desse modo é possível sugerir que indivíduos com números maiores de cromossomos B possuem um melhor desempenho nas funções apresentadas neste trabalho.

Apesar de observar maior abundância de proteínas em 6B, notou-se que, se estes supranumerários aparecem em quantidade baixa (2B e 4B), a abundância destas prevalece na ausência dos mesmos. Dessa forma é possível sugerir que números elevados de cromossomos B aumentam a abundância das proteínas envolvidas em processos que influenciam o desempenho do peixe, enquanto números medianos diminuem a abundância das mesmas.

## **7. CONCLUSÕES**

Foram verificadas diferenças nos perfis proteicos dos indivíduos com diferentes números de cromossomos B.

Na população deste estudo, apenas dois indivíduos apresentaram números extremos de cromossomos B (1 espécime sem cromossomos B e um espécime com 6 cromossomos B).

Números medianos de cromossomos B são os mais frequentes na população em questão, de modo que essa frequência possa estar ligada a herança ou que a maior abundância de proteínas pode estar relacionada com a

disrupção do metabolismo celular, na dinâmica de RNAs mensageiros, como os miRNA e siRNA, conforme descrito em *Astatotilapia*.

A maior abundância das proteínas identificadas na presença de cromossomos B está ligada ao metabolismo, sugerindo que peixes com esses cromossomos podem possuir maior desempenho.

O estudo resultou em avanços consideráveis sobre o conhecimento da natureza dos cromossomos B na espécie *Prochilodus lineatus*, estimando que um número elevado de cromossomos B ocasione maior abundância das proteínas no peixe.

## 8. REFERÊNCIAS

Abdelnur, P. V.; Eberlin, L. S.; de SA, G. F.; Souza, V.; Eberlin, M. N. Single-Shot biodiesel analysis: Nearly instantaneous typification and quality control solely by ambient mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, Washington, v. 80, p. 7882–7886, 2008.

Aebersold, R. and Mann, M. Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature*, 422, 198-207, 2003.

Agostinho, A.A. in: Situação atual e perspectivas da ictiologia no Brasil. IX encontro brasileiro de ictiologia. Manejo de recursos pesqueiros em reservatórios. Maringá. p. 106-121, 1992.

Arnon, D.I; Allen, M.B.; Whatley, F.R. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature*. Aug 28;174(4426):394-6, 1954.

Artoni, R. F., Vicari, M. R., Endler, A. L., Cavallaro, Z. I., Jesus, C. M., Almeida, M. C., Moreira-Filho, O. & Bertollo, L. A. C. Banding pattern of A and B chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae), with comments on B chromosomes evolution. *Genetica*, v. 127, p. 277–284, 2006.

Barik, S. K., Banerjee, S., Bhattacharjee, S., Das Gupta, S. K., Mohanty, S., & Mohanty, B. P. Proteomic Analysis of Sarcoplasmic Peptides of Two Related Fish Species for Food Authentication. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 171(4), 1011–1021, 2013.

Bensimon, A.; Heck, A. J.; Aebersold, R. Mass spectrometry-based proteomics and network biology. *Annu Rev Biochem*, v. 81, p. 379-405, 2012.

Biron, D.G.; Ponton, F.; Marché, L.; Galéotti, N.; Renault, L.; Demey-Thomas, E.; Poncet, J.; Brown, S.P.; Jouin, P.; Thomas, F. ‘Suicide’ of crickets harbouring hairworms: a proteomics investigation. *Insect Mol Biol*. 15:731–742, 2006.

Bowen, S. H. Detritivory in neotropical fish communities. *Environ. Biol. Fish.* 9:137-144, 1984.

Bradford, M. M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v.72, p.248-254, 1976.

Britski, H.A.; Sato, Y.; Rosa, A.B.S.. Manual de identificação de peixes da região de Três Marias (com chave de identificação para peixes da Bacia do São Francisco). 3 ed., Minas Gerais: Ministério da Irrigação-CODEVASF. 115p, 1988.

Camacho, J.P., Sharbel, T.F. e Beukeboom, L.W. B-chromosome evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 355:163-178, 2000.

Camacho, J.P.M. B chromosomes. In: Gregory TR, ed. *The evolution of the genome*. New York: Academic Press. pp 223–286, 2005.

Carolsfeld, J., Godinho, H.P., Zaniboni Filho, E. e Harvey, B.J. Cryopreservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology* 63:472-489, 2003.

Carvalho, D.C. Identificação e caracterização de regiões microssatélites de *Prochilodus lineatus* (Pisces, Characiformes). Dissertação de Mestrado. Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 82f. 2002.

Carvalho, R. A., Martins-Santos, I. C. & Dias, A. L. B chromosomes: An update about their occurrence in freshwater Neotropical fishes (Teleostei). *Journal of Fish Biology*, v. 72, p. 1907–1932, 2008.

Castro, M.C.C. Revisão taxonômica da família Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tese D.S. USP, SP. 1990.

Castro e Vari. *Prochilodus lineatus*. In: Reis, R. E.; Kullander, S. O.; Ferraris, C. J. Check list of the freshwater fishes of South and Central America. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Museu de Ciências e Tecnologia. Porto Alegre: Edipucrs. 2003

Cavallaro, Z. I., Bertollo, L. A. C., Perfectti, F. & Camacho, J. P. M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, v. 8, p. 627–634, 2000.

Cavallaro, Z. I., Bertollo, L. A. C., Perfectti, F. & Camacho, J. P. M. Frequency increase and mitotic stabilization of a B chromosome in the fish *Prochilodus lineatus*. *Chromosome Research*, v. 8, p. 627–634, 2000.

Cristale, J.; Silva, F. S.; Marchi, M. R. R. Desenvolvimento e aplicação de método GC-MS/MS para análise simultânea de 17 HPAs em material particulado atmosférico. *Eclética Química*, São Paulo, v. 33, n. 4, p. 69-78, dez. 2008.

Darlington, C. D. The evolution of genetic systems. Edinburgh and London: Oliver and Boyd. 1958.

Diz, A.P.; Martinez-Fernandez, M; Rolan-Alvarez, E. Proteomics in evolutionary ecology: linking the genotype with the phenotype, *Mol Ecol*. vol. 21, p. 1060-80, 2012.

Feder, M.E. & Walser J-C. The biological limitations of transcriptomics in elucidating stress and stress responses, *J Evol Biol*, vol. 18, p. 901-10, 2005.

Fitzsimmons, N.N.; Moritz, C.; Moore, S.S.. Conservation and dynamics of microsatellite loci over 300 million years of marine turtle evolution. *Molecular Biology and Evolution* 12:432-440, 1995.

Flecker, A. S. Ecosystem engineering by a dominant detritivore in a diverse tropical stream. *Ecology*, 77(6): 1845-1854, 1996.

Fricke, R., Eschmeyer, W. N. & Fong, J. D. 2018. Species by family/subfamily. (<http://researcharchive.calacademy.org/research/ichthyology/catalog/SpeciesByFamily.asp>). Electronic version accessed in 04 october 2018.

Froese, R. & Pauly, D. Editors 2015. FishBase.World Wide Web electronic publication. Available at <http://www.fishbase.org>. Electronic version accessed in 23 November 2015.

Gerking, S. D. Feeding ecology of fish. San Diego: Academic Press. 416p, 1994.

Godoy, M.P. Peixes do Brasil, subordem Characoidei; bacia do rio Mogi Guassu, Vol. 3. Piracicaba: Franciscana. 1975.

Gras, D. E., Brassesco, M. S., Markariani, R., & Roncati, H. (Pisces: Characiformes) from the middle Paraná River, Santa Fe City, Argentina. *Comparative Cytogenetics*, v. 1, p. 113–119, 2007.

Hara, M.R. & Snyder, S.H. Nitric oxide-GAPDH-Siah: a novel cell death cascade. *Cell Mol Neurobiol* 26: 527–538, 2006.

Hatanaka, T., Henrique-Silva, F., e Galetti, P.M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. *Genetica* 126:153-159, 2006.

Henriques-Gil N., e Arana, P. Origin and substitution of B chromosomes in the grasshopper *Eyprepocnemis plorans*. *Evolution* 44: 747–753, 1990.

Hernández-Fonseca, K. & Massieu, L. Disruption of endoplasmic reticulum calcium stores is involved in neuronal death induced by glycolysis inhibition in cultured hippocampal neurons. *Journal of neuroscience research* 82 (2), 196-205, 2005.

Holmes, D.S., e Bougourd, S.M. B-chromosome selection in *Allium schoenoprasum* II. Experimental populations. *Heredity* 67:117-122, 1989.

Houben, D.; Sonnet, P.; Cornélis, J-T. Biochar from Miscanthus: a potential silicon fertilizer. In: Plant and Soil, Vol. 374, no. 1, p. 871-882, 2014.

Itaipu Binacional. Disponível em: <https://www.itaipu.gov.br/nossahistoria>. Acesso em: 12 de setembro de 2018.

Jensen LJ, et al. Co-evolution of transcriptional and post-translational cell-cycle regulation. Nature 443(7111):594-7, 2006

Jesus, C. M.; Moreira-Filho, O. Chromosomal localization of 5S and 18S rRNA genes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). Caryologia, v. 56, p. 281-287, 2003.

Jones, R.N. B-chromosome drive. American Naturalist 137:430-432, 1991.

Jorge, L. C., Sanchez, S., & Moreira Filho, O. Chromosomal Characterization of *Prochilodus lineatus* from Paraná River, Corrientes, Argentina. I. B Chromosomes and NOR Banding. Cytologia, 76, 219–222, 2011.

Karr, T.L. Application of proteomics to ecology and population biology, Heredity, vol. 100 (pg. 200-6), 2008.

Keller, A., Nesvizhskii, A. I., Kolker, E., Aebersold, R. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search. Analytical Chemistry, v. 74, p. 5383-5392, 2002.

Laemmli, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, v. 227, p. 152-162, 1970.

Lowe-McConnell, R. H. Fish communities in tropical freshwaters. London: Longman. 337p, 1975.

Luz-Agostinho, K.D.G., Agostinho, A.A., Gomes, L.C. e Horácio, F.J.Jr. Influence of flood pulses on diet composition and trophic relationships among piscivorous fish in the upper Paraná River floodplain. Hydrobiologia. 607:187-198, 2008.

Maistro, E. L., Oliveira, C., & Foresti, F. Cytogenetic analysis of A- and B-chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Teleostei, Prochilodontidae) using

different restriction enzyme banding and staining methods. *Genetica*, v. 108, p. 119–125, 2000.

Marchler-Bauer, A., Panchenko, A. R., Shoemaker, B. A., Thiessen, P. A., Geer, L. Y., Bryant, S. H. CDD: a database of conserved domain alignments with links to domain three-dimensional structure. *Nucleic Acids Research*, v. 30, p. 281–283, 2002.

Marshall, J.L.; Huestis, D.L.; Garcia, C.; Hiromasa, Y.; Wheeler, S.; Noh, S.; Tomich, J.M.; Howard, D.J. Comparative proteomics uncovers the signature of natural selection acting on the ejaculate proteomes of two cricket species isolated by postmating, prezygotic phenotypes. *Mol Biol Evol* 28(1): 423–435. 2011.

McGarry, J.D. Glucose-Fatty acid interactions in health and disease. *Am. J. Clinical Nutrition* 67: 500S-504S, 1998.

Nelson, D. L. & Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. 6°. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.

Nesvizhskii, A. I., Keller, A., Kolker, E., Abersold, R. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, v. 75, p. 4646-4658, 2003.

Oliveira, C., Saboya, S. M. R., Foresti, F., Senhorini, J. A. & Bernadino, G. Increased B chromosome frequency and absence of drive in the fish *Prochilodus lineatus*. *Heredity*, v. 79, p. 473–476, 1997.

Oliveira, C., Nirchio, M., Granado, A. & Levy, S. Karyotypic characterization of *Prochilodus mariae*, *Semaprochilodus kneri* and *S. laticeps* (Teleostei: Prochilodontidae) from Caicara del Orinoco, Venezuela. *Neotropical Ichthyology*, v. 1, p. 47–52, 2003.

Östergren G: Parasitic nature of extra fragment chromosomes. *Bot Notiser* 2:157–163, 1945.

Pauls, E., Bertollo, LAC Evidence for a system of a supernumerary chromosomes in *Prochilodus scrofa* Steindachner, 1881 (Pisces, Prochilodontidae). *Caryologia* 36:207-314, 1983.

Pauls, E., Bertollo, LAC. Distribution of a supernumerary chromosome system and aspects of karyotypic evolution in the genus *Prochilodus* (Pisces, Prochilodontidae). *Genetica*, v. 81, p. 117–123, 1990.

Penitente, Manolo, Voltolin, T. A., Senhorini, J. A., Bortolozzi, J., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. Transmission rate variation among three B chromosome variants in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 85, n. 4, p. 1371-1377, 2013.

Penitente, M., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. B chromosomes in the species *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae): morphological identity and dispersion. *Comparative Cytogenetics*, v. 9, p. 79–87, 2015.

Penitente, M. Cromossomos B: ocorrência nos peixes neotropicais e sua distribuição em *Prochilodus lineatus*. 2018.

Rowena, M.; Romana-Equia, R.; Ikeda, M.; Basiao, Z.U.; Taniguchi, N. Genetic diversity in farmed Asian Nile and red hybrid tilapia stock evaluated from microsatellite and mitochondrial DNA analysis. *Aquaculture* 236:31-150, 2004.

Sato, Y. & H. P. Godinho. Peixes da bacia do rio São Francisco, p. 401-413. In: R. H. Lowe-McConnell. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp. 534p, 1999.

Schäffer, A. A., Wolf, Y. I., Ponting, C. P., Koonin, E. V., Aravind, L., Altschul, S. F. IMPALA: matching a protein sequence against a collection of PSI-BLAST-constructed position-specific score matrices. *Bioinformatics*, v. 15, p. 1000-1011, 1999.

Schrimpf, Sabine P. et al. Comparative functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* and *Drosophila melanogaster* proteomes. *PLoS biology*, v. 7, n. 3, 2009.

Shevchenko, A; Tomas, H; Havlis, J; Olsen, JV; Mann, M. In-gel digestion for

mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6)2856-2860, 2006.

Silva, R.G. Análise da estrutura genética populacional do Curimatá (*Prochilodus lineatus*, Chariformes: Prochilodontidae) na região da bacia do Rio Grande, SP. Dissertação (Mestrado em Ciências, na área de Biologia/Genética) – Instituto de Biocências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major south american rivers. *Molecular Ecology*, 10: 407-417, 2001.

Sousa, A.B. DE. Análise de variabilidade genética do surubim do São Francisco, *Pseudoplatystoma corruscans* (Pisces, Pimelodidae): subsídios à conservação e ao cultivo da espécie. 101p. Tese (Doutorado em ciências biológicas)-Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, 2003.

Spidle, A.P.; King, T.L.; Letcher, B.H. Comparison of genetic diversity in the recently founded Connecticut River Atlantic Salmon population to that of its primary donor stock Maine's Penobscot River. *Aquaculture* 236:253-265, 2004.

Szklarczyk, D., Franceschini, A., Wyder, S., Forslund, K., Heller, D., Huerter-Cepas, J., Simonovic, M., Roth, A., Santos, A., Tsafou, K. P., Kuhn, M., Bork, P., Jensen, L. J., Mering, C. V. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Research*, v. 43, p. 447-452, 2014.

Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S, Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., Natale, D. A. The COG database: an updated version includes eukaryotes. *BMC Bioinformatics*, v. 4, p. 1-14, 2003.

Terencio, M. L., Schneider, C. H., Gross, M. C., Nogaroto, V., Almeida, M. C., Artoni, R. F., Vicari, M. R. & Feldberg, E. Repetitive sequences associated with differentiation of W chromosome in *Semaprochilodus taeniurus*. *Genetica*, v. 140, p. 505–512, 2012.

Valledor, L.; Jorrín, J. Back to the basics: Maximizing the information obtained by quantitative twodimensional gel electrophoresis analyses by an appropriate experimental design and statistical analyses. *Journal of Proteomics*, Amsterdam, v. 74, n. 1, p. 1-18, 2011.

Vazzoler, A. E. A. M. et al. *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática*. Maringá: Eduem, v. 169, 1996.

Vékey, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in q chromatography. *Journal of Chromatography A*, 921 227–236, 2001.

Venere, P. C., Miyazawa, C. S. & Galetti Jr., P. M. New cases of supernumerary chromosomes in characiform fishes. *Genetics and Molecular Biology*, v. 22, p. 345–349, 1999.

Viana, E. M. F.; Santos, H. A.; Magalhães, V. T. F.; Martinez, C. B. Elaboração de um projeto de mecanismo para transposição de peixes utilizando canal de adução de uma PCH. In: V Simpósio brasileiro sobre pequenas e médias centrais hidrelétricas, 2006, Florianópolis., Comitê Brasileiro de Barragens. p. 1-14, 2006.

Vicari, M. R., de Almeida, M. C., Bertollo, L. A. C., Moreira-Filho, O., & Artoni, R. F. Cytogenetic analysis and chromosomal characteristics of the polymorphic 18S rDNA in the fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 29, p. 621–625, 2006.

Voltolin, T. A., Senhorini, J. A., Oliveira, C., Foresti, F., Bortolozzi, J. & Porto-Foresti, F. Cytogenetic markers in wild population of curimbatá (*Prochilodus lineatus*) from Mogi-Guaçu River. *Cytologia*, v. 74, p. 281–287, 2009.

Voltolin, T. A., Laudicina, A., Senhorini, J. A., Bortolozzi, J., Oliveira, C., Foresti, F. & Porto-Foresti, F. Origin and molecular organization of supernumerary chromosomes of *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae) obtained by DNA probes. *Genetica*, v. 138, p. 1133–1139, 2010.

Voltolin, T. A., Senhorini, J. A., Foresti, F., Bortolozzi, J., Porto-Foresti, F. Intraspecific crosses resulting in the first occurrence of eight and nine B

chromosomes in *Prochilodus lineatus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Genetics and Molecular Biology*, v. 34, p. 220-224, 2011.

Voltolin, T. A., Penitente, M., Mendonça, B. B., Senhorini, J. A., Foresti, F., & Porto-Foresti, F. Karyotypic conservatism in five species of *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae) disclosed by cytogenetic markers. *Genetics and Molecular Biology*, v. 36, p. 347–352, 2013.

Voltolin, T. A., Pansonato Alves, J. C., Senhorini, J. A., Foresti, F., Camacho, J. P. M. & Porto-Foresti, F. Common descent of B chromosomes in two species of the fish genus *Prochilodus* (Characiformes, Prochilodontidae). *Cytogenetic and Genome Research*, v. 141, p. 206–211, 2013b.

Waldbieser, G.C.; Bosworth, B.G.; Nonneman, D.J.; Wolters, W.R.. A microsatellite-based genetic linkage map for channel catfish *Ictalurus punctatus*. *Genetics* 158:727-734, 2001.

Walther, T. C., Mann, M. Mass spectrometry–based proteomics in cell biology. *The Journal of Cell Biology*. 190 (4) 491-500, Aug 2010.

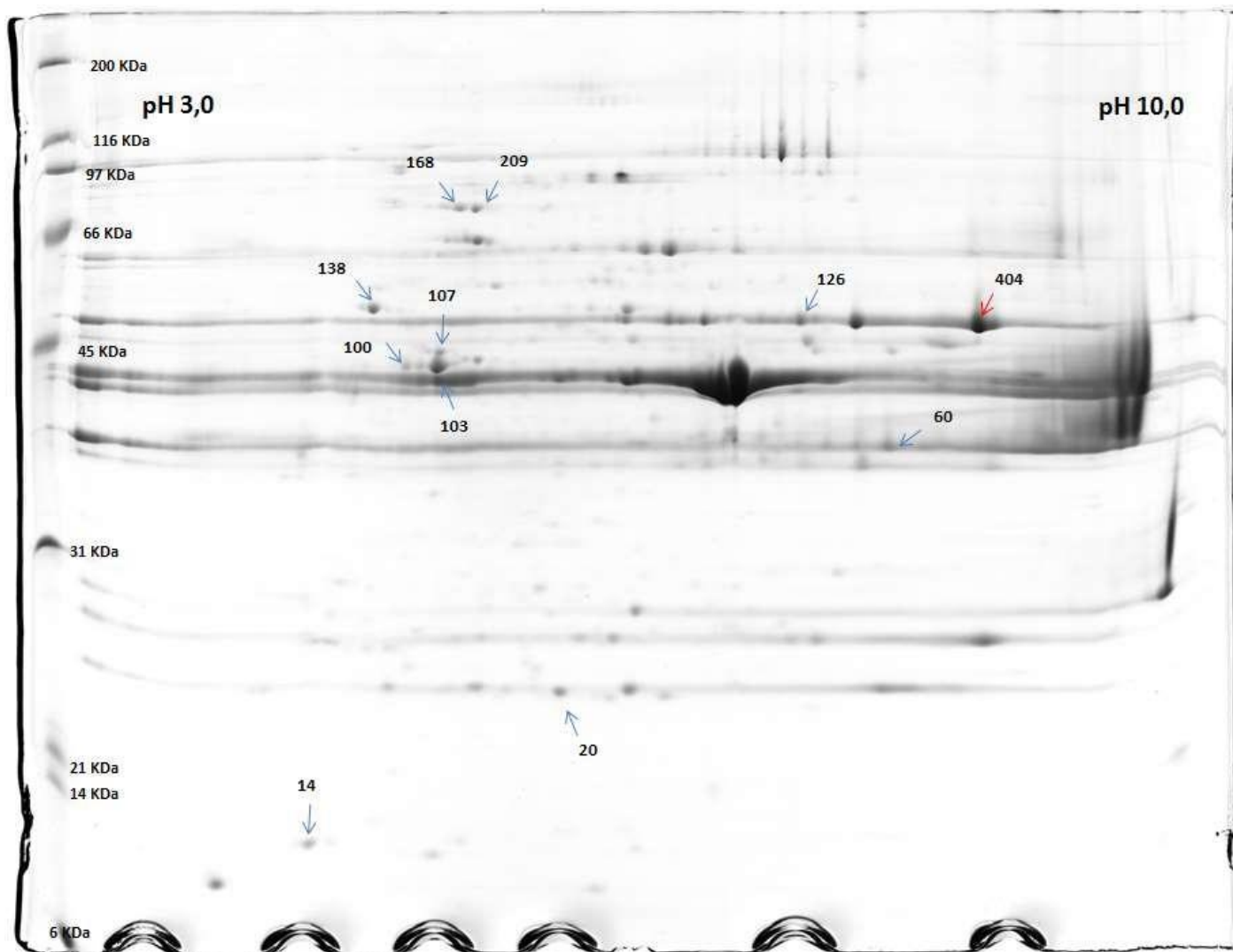
Wasinger, V. C., Cordwell, S. J., Cerpa-Poljak, A. , Yan, J. X., Gooley, A. A., Wilkins, M. R., Duncan, M. W., Harris, R. , Williams, K. L. and Humphery-Smith, I. Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis*, 16: 1090-1094, 1995.

Weingartner, M.; Fracalossi, D.M.; Nuñez, A.P.O.; Zaniboni-Filho, E. In: Zaniboni-Filho, Evoy; Nuñez, Alex Pires de Oliveira. Reservatório de Itá: Estudos ambientais, desenvolvimento de tecnologias de cultivo e conservação da ictiofauna. Conservação genética da ictiofauna da região de Itá. Florianópolis. Cap. 11, p. 307-319, 2008.

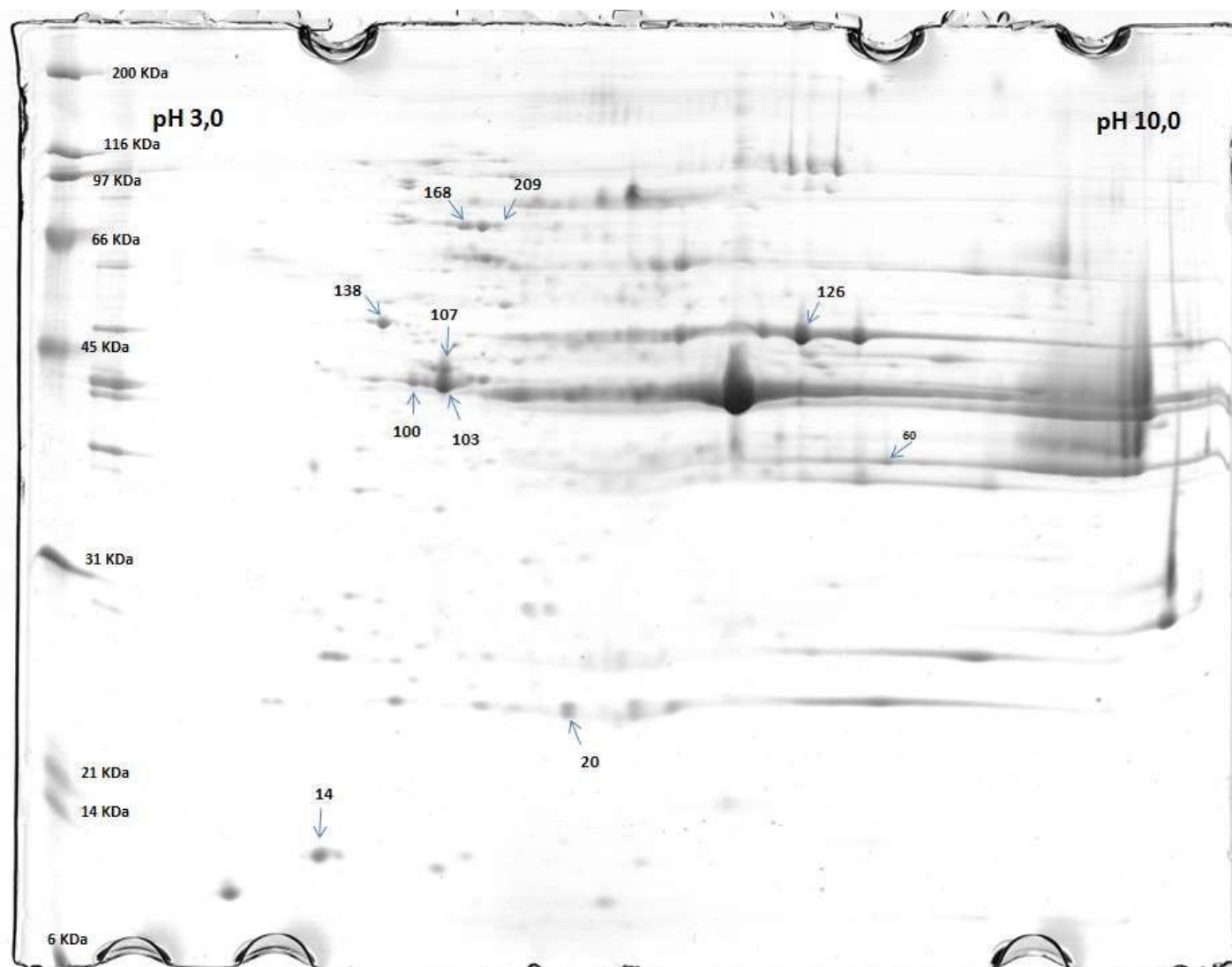
White, M.J.D. *The chromosomes*. London – Chapman e Hall. 1973.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do músculo de *Prochilodus lineatus* do indivíduo que não possui cromossomos B (JD5689). As setas indicam os *spots* com abundância diferencial identificados por MALDI MS/MS, onde a seta vermelha indica *spot* exclusivo para este tratamento e as setas azuis são *spots* presentes em ambos tratamentos. Géis corados com Coomassie Blue G-250.



**Anexo 2.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do músculo de *Prochilodus lineatus* do indivíduo que possui 6 cromossomos B (JD5706). As setas indicam os *spots* com abundância diferencial identificados por MALDI MS/MS, onde a seta vermelha indica *spot* exclusivo para este tratamento e as setas azuis são *spots* presentes em ambos tratamentos. Géis corados com Coomassie Blue G-250.

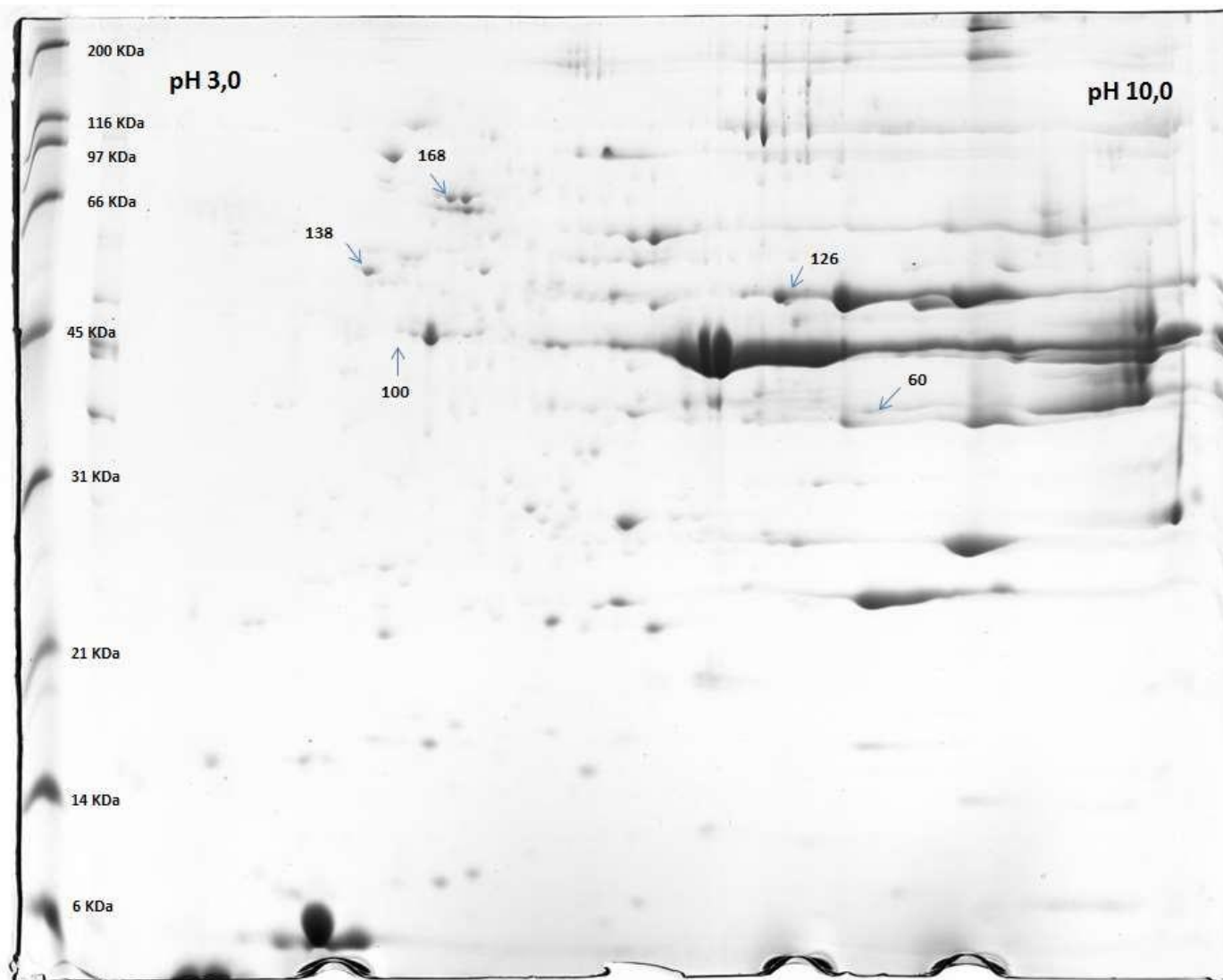


**Anexo 3.** Lista das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em músculo de *P. lineatus* no contraste 0B x 6B. Proteínas separadas de acordo com o número e a sequência de peptídeos identificados, levando como critérios principais: (I) cada proteína deve apresentar ao menos uma sequência de peptídeos não compartilhada com nenhuma outra e (II) a sequência de peptídeo deve ser encontrada em ao menos uma repetição analisada por gênero. Em azul o quanto a proteína aumentou em relação ao indivíduo sem cromossomos B, em vermelho o quando a proteína diminuiu em relação ao indivíduo sem cromossomos B.

Spot ID	Protein Name	Access Number	Protein coverage	Peptide number	Peptide Sequence	% Vol. ± DP		Fold
						0B	6B	
14	<i>Myosin light chain, phosphorylatable, fast skeletal muscle a</i>	W5K709	6%	1	EAFTIIDQNR	0,070 ± 0,036	0,290 ± 0,029	4,169
20	<i>Protein/Nucleic Acid deglycase DJ-1</i>	Q5XJ36	8%	1	GAEEmETVIPVDVmR	0,125 ± 0,029	0,212 ± 0,016	1,698
60	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	W5LI76	4%	1	VPTPNVSVVDLTVR	0,456 ± 0,083	0,198 ± 0,003	2,303
100	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	7%	2	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	0,081 ± 0,020	0,222 ± 0,002	2,729
103	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	12%	3	QEYDEAGPSIVHR SYELPDGQVITIGNER VAPEEHPTLLTEAPLNPK	0,535 ± 0,080	1,783 ± 0,383	3,336
107	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	7%	2	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	0,099 ± 0,013	0,399 ± 0,063	4,050
126	<i>Enolase 3, (beta, muscle) Pyruvate carboxylase</i>	W5LLK3 W5LFN3	4%	1	AAVPSGASTGVHEALELR	0,301 ± 0,029	2,125 ± 0,113	7,051
138	<i>ATP synthase subunit beta</i>	W5LHE0	16%	6	AHGGYSVFAGVGER FTQAGSEVSALLGR IPVGPETLGR LVLEVAQHLGENTVR VALTGLTVAEYFR	0,188 ± 0,018	0,315 ± 0,004	1,675

					VALVYGQMNEPPGAR			
168	Heat shock protein 8	W5KA74	4%	2	FEELNADLFR	0,110 ± 0,010	0,227 ± 0,014	2,070
					TTPSYVAFTDTER			
209	Heat shock protein 8	W5KA74	2%	1	FEELNADLFR	0,015 ± 0,005	0,054 ± 0,008	3,499
404	Enolase 3, (beta, muscle)	W5LLK3	4%	1	AAVPSGASTGVHEALELR	1,796 ± 0,002	-	-

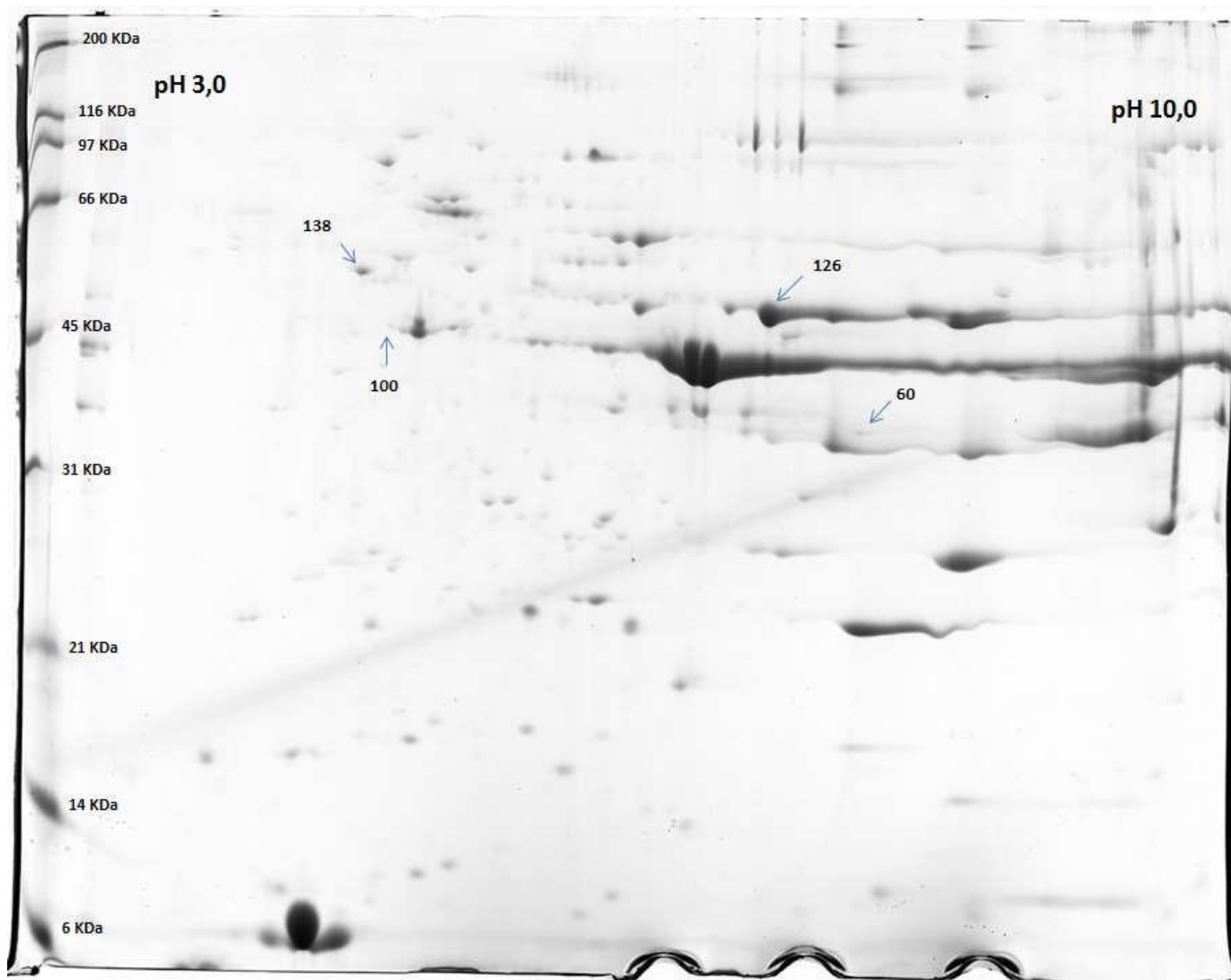
**Anexo 4.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do músculo de *Prochilodus lineatus* do indivíduo que possui 2 cromossomos B (JD5648). As setas indicam os *spots* com abundância diferencial identificados por MALDI MS/MS, onde a seta vermelha indica *spot* exclusivo para este tratamento e as setas azuis são *spots* presentes em ambos tratamentos. Géis corados com Coomassie Blue G-250.



**Anexo 5.** Lista das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em músculo de *P. lineatus* no contraste 0B x 2B. Proteínas separadas de acordo com o número e a sequência de peptídeos identificados, levando como critérios principais: (I) cada proteína deve apresentar ao menos uma sequência de peptídeos não compartilhada com nenhuma outra e (II) a sequência de peptídeo deve ser encontrada em ao menos uma repetição analisada por gênero. Em azul o quanto a proteína aumentou em relação ao indivíduo sem cromossomos B, em vermelho o quando a proteína diminuiu em relação ao indivíduo sem cromossomos B.

Spot ID	Protein Name	Access Number	Protein coverage	Identify Peptides	Peptide Sequence	% Vol. ± DP		Fold
						0B	2B	
60	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	W5LI76	4%	1	VTPNVSVVDLTVR	0,456 ± 0,083	0,075 ± 0,028	6,064
100	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	7%	2	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	0,081 ± 0,020	0,024 ± 0,012	3,43
107	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	7%	2	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	0,099 ± 0,013	-	-
126	<i>Enolase 3, (beta, muscle)</i> <i>Pyruvate carboxylase</i>	W5LLK3 W5LFN3	4%	1	AAVPSGASTGVHEALELR	0,301 ± 0,029	0,577 ± 0,094	1,913
138	<i>ATP synthase subunit beta</i>	W5LHE0	16%	6	AHGGYSVFAGVGER FTQAGSEVSALLGR IPVGPETLGR LVLEVAQHLGENTVR VALTGLTVAEYFR VALVYQMNEPPGAR	0,188 ± 0,018	0,128 ± 0,030	1,467
168	<i>Heat shock protein 8</i>	W5KA74	4%	2	FEELNADLFR TTPSYVAFTDTER	0,110 ± 0,010	0,134 ± 0,004	1,216

**Anexo 6.** Perfil proteico em gel de eletroforese bidimensional 2-DE do músculo de *Prochilodus lineatus* do indivíduo que possui 4 cromossomos B (JD5675). As setas indicam os *spots* com abundância diferencial identificados por MALDI MS/MS, onde a seta vermelha indica *spot* exclusivo para este tratamento e as setas azuis são *spots* presentes em ambos tratamentos. Géis corados com Coomassie Blue G-250.



**Anexo 7.** Lista das proteínas diferencialmente abundantes identificadas por espectrometria de massa no modo MS/MS em músculo de *P. lineatus* no contraste 0B x 4B. Proteínas separadas de acordo com o número e a sequência de peptídeos identificados, levando como critérios principais: (I) cada proteína deve apresentar ao menos uma sequência de peptídeos não compartilhada com nenhuma outra e (II) a sequência de peptídeo deve ser encontrada em ao menos uma repetição analisada por gênero. Em azul o quanto a proteína aumentou em relação ao indivíduo sem cromossomos B, em vermelho o quando a proteína diminuiu em relação ao indivíduo sem cromossomos B.

Spot ID	Protein Name	Access Number	Protein coverage	Peptide number	Peptide Sequence	% Vol. ± DP		Fold
						0B	4B	
60	<i>Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>	W5LI76	4%	1	VPTPNVSVVDLTVR	0,456 ± 0,083	0,070 ± 0,013	6,477
100	<i>Actin, alpha 1b, skeletal muscle</i>	W5K7M9	7%	2	GYSFVTTAER SYELPDGQVITIGNER	0,081 ± 0,020	0,016 ± 0,002	5,012
126	<i>Enolase 3, (beta, muscle)</i> <i>Pyruvate carboxylase</i>	W5LLK3 W5LFN3	4%	1	AAVPSGASTGVHEALELR	0,301 ± 0,029	7,846 ± 0,469	23,65
138	<i>ATP synthase subunit beta</i>	W5LHE0	16%	6	AHGGYSVFAGVGER FTQAGSEVSALLGR IPVGPETLGR LVLEVAQHLGENTVR VALTGLTVAEYFR VALVYQMNEPPGAR	0,188 ± 0,018	0,143 ± 0,021	1,317