

Jalu Santana Oliveira

Proteoma branquial de *Atlantirivulus peruibensis* durante a exposição ao ar

São Vicente – SP

2026

Jalu Santana Oliveira

Proteoma branquial de *Atlantirivulus peruibensis* durante a exposição ao ar.

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de Biociências, Campus do Litoral Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do Grau de bacharel em Ciências Biológicas, com habilitação em Gerenciamento Costeiro.

Orientador: Prof. Dr. Otto Bismarck Fazzano
Gadig

Coorientador: Dr. Rafael Mendonça Duarte

São Vicente – SP

2026

S232p

Santana, Jalu Oliveira

Proteoma branquial de *Atlantirivulus peruibensis* durante a exposição ao ar. / Jalu Oliveira Santana. -- São Vicente, 2025
33 p. : tabs., fotos

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

Orientador: Otto Bismarck Fazzano Gadig

Coorientador: Rafael Mendonça Duarte

1. Tolerância à emersão. 2. Adaptação fisiológica. 3. Plasticidade proteômica. 4. Alteração nas vias metabólicas. I. Título.

Principia

Vejo a vida passar num instante
Será tempo o bastante que tenho pra viver?
Não sei, não posso saber
Quem segura o dia de amanhã na mão?
Não há quem possa acrescentar um milímetro a cada estação
Então, será tudo em vão? Banal? Sem razão?
Seria. Sim, seria, se não fosse o amor
O amor cuida com carinho
Respira o outro, cria o elo
O vínculo de todas as cores
Dizem que o amor é amarelo
É certo na incerteza
Socorro no meio da correnteza
Tão simples como um grão de areia
Confunde os poderosos a cada momento
Amor é decisão, atitude
Muito mais que sentimento
Alento, fogueira, amanhecer
O amor perdoa o imperdoável
Resgata a dignidade do ser
É espiritual, tão carnal quanto angelical
Não tá no dogma ou preso numa religião
É tão antigo quanto a eternidade
Amor é espiritualidade
Latente, potente, preto, poesia
Um ombro na noite quieta
Um colo pra começar o dia
Filho, abraça sua mãe
Pai, perdoe seu filho
Paz é reparação, fruto de paz
Paz não se constrói com tiro
Mas eu miro de frente a minha fragilidade
Eu não tenho a bolha da proteção
Queria eu guardar tudo que amo
No castelo da minha imaginação
Mas eu vejo a vida passar num instante
Será tempo o bastante que tenho pra viver?
Eu não sei, eu não posso saber
Mas enquanto houver amor
Eu mudarei o curso da vida
Farei um altar pra comunhão
Nele, eu serei um com o mundo até ver
O ponto da emancipação
Porque eu descobri o segredo que me faz humano
Já não está mais perdido o elo
O amor é o segredo de tudo
E eu pinto tudo em amarelo

Henrique Vieira

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço à Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” pela estrutura acadêmica e de pesquisa ofertada, ao Laboratório de Ecotoxicologia e Fisiologia Aquática (LECTA), coordenado pelo prof. Dr. Rafael Mendonça Duarte, o Laboratório de Proteínas e Peptídeos Marinhos (LABPEPMAR), coordenado pelo prof. Dr. Leandro Mantovani de Castro e o Laboratório de Pesquisa de Elasmobrânquios (ELASMOBRASIL), coordenado pelo Prof. Dr. Otto Bismarck Fazzano Gadig pela orientação e estrutura concedida para a realização do presente trabalho. Agradeço também às ações afirmativas que permitiram meu ingresso e permanência universitária.

Agradeço também à instituição de Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa concedida nos últimos três semestres, que possibilitou a continuidade e dedicação à presente pesquisa.

Acredito no amor como potência transformadora, e por isso, gostaria de agradecer a quem sempre me transformou através do amor. Agradeço aos meus guias, à minha família, em especial às mulheres fortes que trabalharam o solo que hoje é o caminho que trilho. Simone, Angélica e Silene, muito obrigada. Agradeço ao meu amor, Maria, por sempre acreditar em mim e por iluminar dias cinzentos como o nascer do sol no mar. Agradeço aos meus amigos, minha rede de apoio para lágrimas e risadas, Beatriz, Pedro, Ana, Maysha, Clarisse, Manoella, Pac, Paraíso, Gabriela e Karla. O carinho, incentivo e a crença de vocês em mim foi essencial para que eu chegasse até aqui.

Dedico este trabalho ao Ícaro, que em pouco tempo nesta terra nos lembrou o significado da conexão, do amor e do apoio de quem nos ama, que como o sol aqueceu o coração de todos que tiveram o privilégio de estar por perto.

Abstract

The rivulidae *A. peruibensis* displays an amphibious lifestyle, with a high tolerance capacity through air exposure. This species presents physiological adaptations that are very similar to those seen in the most researched rivulidae owing to air emersion, *Kryptolebias marmoratus*. The presented work analyzed the main proteomic alterations related to air exposure. We believe that dynamic adjustment of many molecular pathways allows the evolutionary adaptation for exploring and survival of terrestrial habitats by *Atlantirivulus peruibensis*. Therefore, the proteomic responses of the specie were analyzed through a extraction of branchial tissue of individual separators in three distinct groups (Control, were individuals were acclimated for seven days in water and didn't suffer air exposure; exposure, were acclimated individuals were submitted to seven days of air exposure to atmospheric air and; recovery, were individuals were subjected to acclimation, seven days of air exposure and finally submitted to seven days of recovery in water), the obtained tissue were processed and sent to a HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), the expression of proteomic results were subdivided into Gene Ontology (GO) groups and summarized via *Heatmap*. Our results underline a high and dynamic and functional adaptability of molecular pathways such as metabolic pathways, structural remodeling and possible lesions as a reflex of a high physiological cost associated with emersion. The present study underlines the high evolutionary adaptation of amphibious fish to challenging habitats, in addition to highlighting the importance of preservation, conservation and monitoring of flooding areas and amphibious lifestyle species.

Keywords: Emersion tolerance, Physiological adaptation, Proteomic, Shift of metabolic pathways.

Resumo

O rivulidae *A. peruibensis* apresenta um estilo de vida anfíbio, com alta capacidade de tolerância à exposição ao ar. A espécie apresenta características fisiológicas adaptadas e muito similares à espécie *Kryptolebias marmoratus*, um rivulidae bem estudado quanto às respostas fisiológicas e adaptativas sob o estresse da emersão. O presente estudo visa analisar as principais alterações proteômicas relacionadas à exposição ao ar. Acreditamos que um ajuste dinâmico de diversas vias moleculares que permitam a adaptação evolutiva para exploração e sobrevivência em ambiente terrestre por *A. peruibensis*. Para isso as respostas proteômicas dos indivíduos foram analisadas através da obtenção de tecidos branquiais de indivíduos divididos em três grupos distintos (Controle, onde indivíduos foram aclimatados por sete dias em água e não sofreram exposição ao ar; exposição, onde indivíduos aclimatados foram submetidos à sete dias de exposição ao ar atmosférico em câmaras úmidas e; recuperação, onde indivíduos foram submetidos a aclimação, exposição durante sete dias e recuperação por sete dias em água), os tecidos foram processados e enviados para análise de HPLC (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência), os resultados de expressão proteico foram subdivididos em grupos de ontologia gênica (GO) e tabulados via *Heatmap*. Nossos resultados destacaram uma adaptação dinâmica e funcional de vias moleculares como vias metabólicas, de remodelação estrutural e possíveis lesões como reflexo do custo fisiológico alto associado à emersão. O presente estudo reforça a alta adaptação evolutiva de peixes anfíbios à ambientes desafiadores, além de destacar a importância da conservação e monitoramento de áreas alagáveis e espécies de peixe com estilo de vida anfíbio.

Palavras-chave: Tolerância à emersão, Adaptação fisiológica, Perfil de proteoma, Alteração nas vias metabólicas.

Sumário

1. Introdução	9
2. Objetivos	13
2.1 Objetivo Geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3. Material e métodos	14
3.1. Coleta e manutenção dos animais	14
3.2. Experimento de exposição ao ar e recuperação	15
3.3. Avaliação das respostas proteômicas à exposição ao ar.	16
3.4. Análise por LC-MS/MS	17
3.5. Identificação de proteínas e peptídeos e análises estatísticas	18
4. Resultados e discussão	19
5. Conclusão	29
Referências	30

1. Introdução

Os rios e riachos da Mata Atlântica que compõem as sub-bacias do Litoral Centro-Sul do Estado de São Paulo cortam diferentes formações fisiográficas e compartimentos geomorfológicos, tais como o Planalto Atlântico (constituído por morrotes baixos), a Serra do Mar (com escarpas dissecadas e topos angulosos) e a Planície Costeira (a baixada litorânea com mata de restinga) (Ferreira & Petreire, 2009). Os corpos d'água localizados na região da Planície Costeira estão inseridos em uma área de alta heterogeneidade paisagística e são caracterizados por consideráveis diferenças limnológicas e na estrutura dos habitats, sendo considerados um *hotspot* de biodiversidade da ictiofauna (Myers et al., 2000). Na área de drenagem do Rio Preto, principal afluente da bacia Rio Itanhaém na região da Planície Costeira do Litoral Centro-Sul, são encontrados riachos de restinga que apresentam coloração escura com água hipóxicas, pH ácido e altas concentrações de carbono orgânico dissolvido (COD) dentre essas áreas, destacam-se as planícies alagáveis, altamente dependentes dos regimes de cheias e secas, causando uma dinâmica extrema para a ictiofauna desta região. Apesar das condições desafiadoras, os riachos apresentam uma alta riqueza (cerca de 27 espécies) e abundância da ictiofauna, além de grau elevado de endemismo com algumas espécies, tais como *Scleromystax macropterus*, *Mimmagoniates lateralis* e *Atlantirivulus peruibensis*, sendo encontradas apenas nos corpos d'água dessa bacia (Ferreira et al., 2014). Com a soma das diversas pressões presentes nesses habitats, é possível encontrar diversas adaptações para a garantia do sucesso biológico das espécies que ali habitam como uma dieta generalista, estratégias reprodutivas que trabalhem de forma síncrona com os períodos de cheia, onde há mais alimento disponível e portanto uma maior capacidade de obtenção de massa e energia, e uma das estratégias mais interessantes para sobrepujar o estresse das condições extremas encontradas periodicamente é a emersão (Junk & Wantzen 2004).

A emersão pode ser definida como a remoção de indivíduos aquáticos de dentro d'água e a sua exposição ao ar atmosférico e pode ser considerada como hipóxia aguda, à qual causa uma cascata de efeitos fisiológicos (Cook et al., 2015). Entre os peixes estritamente de água doce, o estilo de vida anfíbio já foi descrito para cerca de 90 espécies pertencentes a 12 Ordens e 25 Famílias, com destaque para Cyprinodontiformes com 25 espécies (Rivulidae – 14 e Nothobranchiidae – 8), Siluriformes com 15 espécies (Clariidae – 9), e Galaxiiformes com 14 espécies (Galaxiidae – 14) (Wright & Turko, 2016). Além disso, a tolerância à emersão também é extremamente variável entre as espécies com estilo de vida anfíbio, onde espécies altamente tolerantes – como os

Rivulidae *Kryptolebias marmoratus* (“mangrove killifish”) e *Anablepsoides micropus* (“amazon killifish”) – podem sobreviver por dias a semanas fora da água (Ong et al., 2007; Wright, 2021; Turko et al., 2021). Apesar de amplamente distribuído entre as espécies, a adaptação à emersão é custosa metabolicamente, visto que a exposição ao ar propõe diversos desafios fisiológicos aos indivíduos, tais como: (i) Colapso das estruturas respiratórias como as brânquias, devido às diferenças na densidade do ar atmosférico e da água, (ii) Alimentação, devido à mudança de nicho ecológico disponível, aos desafios distintos para locomoção, forrageamento e busca por itens alimentares (iii) Ressecamento, devido à baixa disponibilidade de água e a constante pressão evaporativa no ambiente e nos tecidos, como a epiderme (iv) Pressões osmóticas extremas devido às concentrações de sais e água completamente distinta no ambiente aéreo (v) Locomoção, uma vez que as estruturas presentes são evolutivamente voltadas para a locomoção em ambiente aquático, como nadadeiras, que possuem baixa efetividade em ambientes terrestres. (Cook et al., 2015).

Uma das características mais marcantes de diversos peixes da família Rivulidae são suas adaptações comportamentais e fisiológicas para lidar com a hipóxia ambiental – condição de baixa concentração de oxigênio dissolvido na água – que resulta na depleção da oxigenação dos tecidos, acarretando na morte de espécies intolerantes à hipóxia (Onukwufor & Wood, 2018). Estudos vêm demonstrando que muitas espécies de Rivulidae apresentam o comportamento de saltar da água em condições hipóxicas e se expor ao ar, baixando o metabolismo e sobrevivendo emersas por longos períodos, até que as condições de normóxia retornem ao ambiente aquático (geralmente após chuvas) (Martin, 2013). Uma das espécies mais bem estudadas quanto ao estilo de vida anfíbio e as respostas morfo-fisiológicas causadas pela exposição ao ar é o rivulidae *Kryptolebias marmoratus*, que apresenta uma média de sobrevivência de impressionantes 7 dias em emersão. A avaliação das respostas morfológicas que promovem o equilíbrio fisiológico e permitem a sobrevivência durante a exposição ao ar encontram-se alterações comportamentais, como o hábito de saltar para fora d’água em condições de hipóxia e fatores físico-químicos desfavoráveis da água (Axlid et al., 2023), alterações morfológicas dos aparatos respiratórios, como o aumento do Índice de Massa Interlamelar (ILMC) com fortes indícios de uma funcionalidade de sustentação das lamelas ao desafio da colabamento devido à diferença de densidade do ar atmosférico (Ong et al., 2007). Além disso, são descritas também alterações morfológicas na epiderme, apresentando um espessamento da epiderme bem como o aumento da produção de células mucosas na pele como forma de contornar pressões evaporativas e diminuir a permeabilidade do tecido (Heffel et al.,

2018), alterações proteômicas, demonstrando que a exposição ao ar aumenta a afinidade de Hemoglobinas que se ligam ao oxigênio, como uma forma de obtenção de oxigênio para a manutenção energética durante os períodos de estresse por emersão (Tunnah et al., 2021).

A espécie *A. peruibensis* pertence à família Rivulidae (Cyprinodontiformes) que conta com cerca 240 espécies descritas e amplamente distribuídas no território brasileiro (320 espécies válidas na região Neotropical (ICMBio, 2013) e possui proximidade genética e funcional com o rivulidae *Kryptolebias marmoratus*. Espécimes de *A. peruibensis* são reconhecidamente de pequeno porte atingindo no máximo – em fêmeas maduras sexualmente – 3,5 cm (Ywamoto, 2025). Embora o grande grupo, previamente descrito como *A. santensis* não seja classificada como espécie ameaçada (atualmente classificada como Menos Preocupante – LC), cerca de 120 espécies de Rivulidae estão em alguma categoria de ameaça (Criticamente em Perigo – CR; Em Perigo – EN; ou Vulnerável – VU) no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção (Volume VI – Peixes), particularmente devido à perda de habitat (ICMBio, 2018), além disso, uma revisão taxonômica recente (Ywamoto, 2025) identificou o grupo antes descrito em todo litoral de São Paulo sendo dividido em 3 espécies distintas, sendo elas: *Atlantirivulus santensis*, *Atlantirivulus tupinambas* e *Atlantirivulus peruibensis*, reforçando a deficiência na identificação da ameaça de espécies devido à generalização de suas características. Isso ocorre devido à dependência de diversos fatores ambientais para a manutenção de suas populações, como a vegetação ripária que é utilizada para a alimentação, abrigo e reprodução. Por este motivo, as espécies de *Atlantirivulus* são fortemente afetadas por ações antrópicas como desmatamento, uso de fertilizantes e praguicidas, além do aumento da intensidade de atividades agrícolas (Ponzetto, 2012). Portanto, devido ao seu endemismo, aliado ao crescente grau de urbanização e o desmatamento das matas ciliares na região, *A. peruibensis* pode ser considerada potencialmente ameaçada. Por ser exclusiva de ambientes lênticos de águas pretas, também ocupando poças temporárias marginais, é esperado que *A. peruibensis* apresenta diversas adaptações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas às condições naturais de hipóxia e emersão (como durante a seca dos ambientes de poças em que vivem). Estudos recentes demonstram uma eficiência alta em sobrevivência à emersão com um período similar ao *Kryptolebias marmoratus*, demonstrando que a massa do indivíduo está intrinsecamente relacionada à sua capacidade de sobrevivência à 7 dias de exposição ao ar. Além disso, as respostas morfo-fisiológicas apresentados por *A. peruibensis* apresentaram semelhanças quanto às respostas de *Kryptolebias marmoratus*, apresentando plasticidade morfológica na estrutura branquial, com aumento da Massa Interlamelar (ILMC) durante a exposição (Oliveira S.,

2025). Devido à similaridade nas respostas branquiais de *Atlantirivulus peruibensis* com o rivulidae *Kryptolebias marmoratus*, há grandes indícios que alterações morfo-fisiológicas ocorram também na pele desses indivíduos, assim como alterações proteômicas que resultem em alterações morfo-funcionais e permitam a obtenção de energia e sobrevivência durante a emersão. Uma vez que o padrão de distribuição e de ocorrência está diretamente relacionado com a história evolutiva das espécies, e das pressões seletivas do ambiente (Wilson, 1997), e o entendimento das adaptações morfofisiológicas, nicho alimentar e interações tróficas são informações cruciais para a conservação, *A. peruibensis* se mostra um excelente modelo para o aprofundamento do entendimento sobre a origem evolutiva do estilo de vida anfíbio em peixes, além das adaptações fisiológicas necessárias para a sobrevivência nos ambientes aquáticos temporários Neotropicais.

Tendo em vista as diversas pressões ambientais encontradas por *Atlantirivulus peruibensis*, seu endemismo, a necessidade de preservação desse estilo de vida complexo e ameaçado pelas ações antrópicas e a carência de estudos voltados às adaptações fisiológicas, principalmente à nível molecular. Dessa forma, esse trabalho analisou remodelações plasticidade de respostas proteômicas presentes no tecido das brânquias do rivulidae *Atlantirivulus peruibensis* durante a exposição ao ar durante 7 dias e posterior recuperação em água por 7 dias, a fim de avaliar os principais mecanismos moleculares relacionados ao sucesso biológico da espécie durante à emersão

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Analisar o perfil de proteínas expressas nas brânquias de *Atlantirivulus peruibensis*, por meio de cromatografia líquida acoplada a espectrômetro de massas por ionização (LC-MS/MS), durante a exposição ao ar e após recuperação, contribuindo para o maior entendimento dos mecanismos fisiológicas e moleculares relacionados com a estratégia adaptativa da espécie à emersão.

2.2 Objetivos específicos

- Analisar o perfil de proteínas e principais vias moleculares nas brânquias de *A. peruibensis* associados com a exposição ao ar por 7 dias e subsequente recuperação em água;
- Avaliar similaridades e dissimilaridades no perfil de proteínas expressas, classificados em três principais categorias (Componentes Celulares, Processos Biológicos e Funções Moleculares) pelo Gene Ontology, nas brânquias de exemplares de *A. peruibensis* entre o grupo controle e após a emersão e recuperação;
- Identificar as principais vias regulatórias relacionadas aos Componentes Celulares, Processos Biológicos e Funções Moleculares associadas à tolerância de *A. peruibensis* à emersão.

3. Material e métodos

3.1. Coleta e manutenção dos animais

Os exemplares de *Atlantirivulus peruibensis*, com uma média de peso de $0,59 \pm 0,28$ g (média $\pm$ desvio padrão de 0,59) e comprimento de $4,16 \pm 0,94$ cm, foram coletados com o auxílio de puçás e peneiras em poças marginais ao Rio Panema (Itanhaém/SP) (Figura 1), e transportados em sacos plásticos contendo água do próprio local de coleta, saturados com carga pura de oxigênio, para o Laboratório de Ecofisiologia e Toxicologia Aquática (LECTA) do Instituto de Biociências do Campus do Litoral Paulista (IB/CLP), da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). No laboratório os animais foram alocados em aquários (40L) com sistema de filtração mecânica e biológica contendo água do local de coleta, aeração constante e controle e monitoramento da temperatura com o auxílio de um termostato (Hopar, 300w) acoplado um controlador digital Tic-17 rgti (Full Gauge). Durante o período de 10 dias os peixes foram aclimatados ao laboratório para evitar a influência do estresse de captura e transporte nos experimentos, sendo alimentados ad libitum diariamente com ração flocada Nutricon®, sendo a alimentação suspensa 24h antes do início dos testes. Durante esse período foi realizada diariamente troca parcial de água (30%) dos aquários para a manutenção das condições físico-químicas desejadas, e evitar o acúmulo de resíduos nitrogenados tóxicos. O projeto e todas as atividades de pesquisa foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da unidade (protocolo CEUA_IB/CLP N°16/2023).



Figura 1. (A) Riacho Panema na sub bacia do Rio Preto (Itanhaém/SP); (B) Exemplares de *Atlantirivulus peruibensis* coletados na área de estudo.

3.2. Experimento de exposição ao ar e recuperação

Nesta etapa os peixes foram submetidos a 3 tratamentos, a saber: o grupo controle, que consistiu nos animais mantidos em água do riacho Panema nos aquários de aclimatação, um grupo experimental exposto ao ar por 7 dias e outro grupo de peixes em recuperação por 7 dias em água após a emersão por 7 dias (N= 24 indivíduos - 8 distribuídos igualmente entre os tratamentos). Para avaliar a plasticidade de respostas à emersão em outras espécies de Rivulidae, como o *K. marmoratus*, utilizamos câmaras úmidas controladas e individualizadas (Ong et al., 2007; Turko et al., 2012). Neste teste, foram acondicionados individualmente exemplares de *A. peruibensis*, com peso variando entre 0,37g e 1,37 g (Oliveira, S. 2025), em câmaras fechadas (N=16, uma vez que 8 indivíduos permaneceram nos aquários com troca parcial de água diária, assim como alimentação -suspensa 24h antes da extração das amostras de tecido - *ad libitum*), com um substrato de algodão ao fundo, que foi conectado com uma cânula externa utilizada para umidificar o interior da câmara, evitando assim a dessecação do animal. Esta câmara permaneceu fechada e os indivíduos foram observados diariamente, sendo mantidos em temperatura constante (24°C), adicionando água ao substrato de algodão conforme a necessidade (Figura 2). A água foi adicionada de forma que o substrato mantenha a câmara úmida, mas não permita que as brânquias dos peixes estivessem submersas ao longo do teste. Os animais foram mantidos em exposição ao ar por 7 dias (180 horas), onde 8 indivíduos foram aleatoriamente selecionados para a extração do tecido branquial com auxílio de pinças, tesouras e bisturis e imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido em ultra freezer à -80°C, para evitar a degradação das proteínas presentes nos tecidos. Os 8 indivíduos restantes foram realocados em aquários de 40L, onde permaneceram por sete dias adicionais com água do próprio local de coleta, com aeração constante, filtragem e troca parcial de água diária. O regime alimentar foi realizado *ad libitum* com ração flocada Nutricom ®, sendo suspensa 24h após a exposição ao ar e suspenso 24h antes da extração das amostras. Ao término dos sete dias, o tecido branquial desse grupo - bem como o grupo controle que se manteve durante todo o período imerso em água - foi também coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e mantido em ultra freezer à -80°C para as análises posteriores.



Figura 2. Esquema representativo das câmaras úmidas de exposição utilizadas para os experimentos de emersão de *A. peruibensis*.

3.3. Avaliação das respostas proteômicas à exposição ao ar.

Para as análises proteômicas foram utilizadas amostras de tecido branquial de 24 indivíduos de três tratamentos distintos (N = 8 por tratamento): controle (Sem exposição ao ar), exposição (Sete dias de exposição ao ar) e recuperação (Sete dias de exposição ao ar e sete dias de recuperação em água). Após o experimento, as amostras de tecido branquial foram retiradas e imediatamente congeladas em ultra-freezer a -80°C. Para análise das respostas do proteoma, as amostras foram retiradas ultra-freezer (-80°C) e imediatamente posicionadas em um recipiente com gelo a fim de preservar a temperatura dos tecidos e evitar a desnaturação das proteínas presentes. Durante o descongelamento das amostras, houve a perda de algumas delas devido à rápida despressurização pela diferença térmica. Assim, um total de 6 amostras foram perdidas, sendo: Uma do grupo controle, três do grupo de recuperação e duas do grupo de exposição.

Para a extração de proteínas das brânquias as amostras foram ressuspensas em tampão Ureia-Tris (8 M ureia, 40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 30 mM NaCl, 1 mM ortovanadato de sódio, 1 mM CaCl₂ e solução contendo coquetel de inibidores de protease). A quebra celular foi realizada por sonicação (Qsonica Q55), com amplitude de 50 Hz, utilizando 15 pulsos de 3 segundos, repetidos quatro vezes, mantendo-se as amostras em gelo. Após a quebra, os homogenatos foram centrifugados a 14.000 rpm por 40 minutos a 4 °C. 25 microgramas de proteína foram precipitados

com acetona na proporção 4:1 (v/v), incubados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas e centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. O pellet proteico foi ressuspense em 20 μL de ureia 8 M.

A seguir, para digestão das proteínas, as amostras foram diluídas com solução de ureia 8 M até a concentração final de 4 M. Ditioneitol (DTT) foi adicionado até concentração final de 5 mM, seguido de incubação a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 60 minutos. Em seguida, iodoacetamida (IAA) foi adicionada até a concentração final de 15 mM, com incubação por 60 minutos à temperatura ambiente, no escuro. O excesso de IAA foi neutralizado com adição de DTT até a concentração final de 10 mM. A digestão proteica foi realizada com tripsina (Promega, Madison, WI, EUA) na proporção 1:50 (enzima:proteína), durante a noite, a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Para a marcação isotópica, as soluções contendo as proteínas digeridas foram equilibradas em TEAB 0,1 M e destinadas à marcação isotópica com formaldeído e cianoborohidreto, utilizando formas leves e pesadas associadas a cada uma das amostras separadamente. Os marcadores utilizados foram: 28 Da (três amostras do grupo controle), 30 Da (uma amostra do grupo controle), 32 Da (três amostras do grupo exposição) e 36 Da (três amostras do grupo recuperação).

Ao final da marcação, as amostras foram acidificadas com ácido fórmico e agrupadas, formando três corridas experimentais, sendo uma contendo quatro isótopos distintos e as demais contendo três isótopos distintos. As amostras foram então dessalinizadas, com ajuste do pH final entre 2 e 4 utilizando TFA a 50%, e os peptídeos foram aplicados em colunas C18 (OASIS, Waters, UK), conforme descrito por Correa et al. (2021). Após essas etapas, as amostras foram destinadas à análise em HPLC acoplado a espectrômetro de massas Fusion Lumos Orbitrap (Thermo Fisher®), na instalação de espectrometria de massas do Instituto Carlos Chagas — Fiocruz, Paraná (Correa et al., 2021; Teixeira et al., 2019).

3.4. Análise por LC-MS/MS

As amostras de peptídeos tripticos foram ressuspensas em 10 a 15 μL de ácido fórmico a 0,1%, e o equivalente a 5 μg de cada amostra foi analisado. O sistema cromatográfico utilizado foi um UltiMate 3000 (Thermo Fisher®, Waltham, MA, EUA), conectado on-line a um espectrômetro de massas Fusion Lumos Orbitrap (Thermo Fisher®), no centro de espectrometria de massas RPT02H/Instituto Carlos Chagas-Fiocruz, Paraná. A mistura de peptídeos foi separada

cromatograficamente em uma coluna com 15 cm de comprimento e 75 μm de diâmetro interno, empacotada in house com resina ReproSil-Pur C18-AQ 3 μm (Dr. Maisch GmbH HPLC), utilizando taxa de fluxo de 250 nL/min e gradiente de 5% a 38% de acetonitrila em ácido fórmico a 0,1% ao longo de 120 minutos.

O Fusion Lumos Orbitrap foi operado no modo de aquisição dependente de dados (DDA), alternando automaticamente entre aquisições MS de varredura completa e MS/MS, com exclusão dinâmica de 60 s. As varreduras completas (300–1500 m/z) foram adquiridas no Orbitrap com resolução de 120.000 em m/z 200. Os íons mais intensos, capturados em um tempo de ciclo de 2 s, foram selecionados, excluindo-se aqueles sem atribuição ou com estado de carga 1+. Os íons selecionados foram isolados e fragmentados por HCD (dissociação colisional de energia mais alta), com energia de colisão normalizada de 30%, e analisados com resolução de 50.000 em m/z 200.

As condições gerais de espectrometria de massas incluíram voltagem de spray de 2,3 kV, ausência de fluxo de gás de suporte ou auxiliar, temperatura do capilar aquecido de 175 °C, controle automático de ganho (AGC) preditivo ativado e nível de RF da lente S ajustado para 30%. As funções de varredura do espectrômetro de massas e os gradientes de solvente de nano-LC foram controlados pelo software Xcalibur 4.1 (Thermo Fisher®).

3.5. Identificação de proteínas e peptídeos e análises estatísticas

Os arquivos de dados brutos (.raw) gerados pelo espectrômetro de massas foram analisados utilizando banco de dados do UniProt, com auxílio do software PEAKS Studio (versão 8.5; Bioinformatics Solutions, Waterloo, ON, Canadá) (Ma et al., 2003; Zhang et al., 2012). Os parâmetros de pesquisa incluíram: especificidade enzimática para tripsina; tolerância de massa do precursor ajustada para ± 15 ppm e tolerância de massa dos íons de fragmentação de $\pm 0,5$ Da. As modificações variáveis consideradas foram oxidação de metionina (+15,99 Da), acetilação (+42,01 Da) e as modificações correspondentes aos marcadores isotópicos utilizados na etapa de marcação. A carbamidometilação (+57,02 Da) foi definida como modificação fixa. Os peptídeos identificados foram classificados de acordo com sua confiança local média, sendo selecionados os melhores espectros para anotação e filtrados por uma taxa de falsa descoberta (FDR) $\leq 1\%$. As proteínas enriquecidas do proteoma intracelular foram submetidas à quantificação relativa considerando os marcadores isotópicos e os resultados foram apresentados em mapas de calor utilizando módulos específicos do software PEAKS Studio.

O Database STRING é uma ferramenta funcional que permite, através da inserção dos dados de análise proteica e associa os grupos de proteínas à Ontologia gênica. Nossos dados, portanto, foram tabulados, diferenciados através dos tratamentos (Controle, exposição e recuperação) para a obtenção da relação da expressão das diferentes funções proteicas nos diferentes tratamentos. O FDR (False Discovery Rate) foi calculado com base em um modelo estatístico que leva em consideração a quantidade de espectros de massas que são interpretados de maneira errada, e é frequentemente expresso como uma porcentagem. Por exemplo, o FDR de 1% significa que, para cada 100 identificações de peptídeos ou proteínas, uma é provavelmente uma falsa descoberta. O resultado dessas análises foi novamente tabulado considerando os nomes das proteínas juntamente com o exponencial de expressão das mesmas. A partir dessa tabela, foi possível a elaboração de um Heatmap através do software de acesso livre Rstudio ®.

A relação entre as proteínas analisadas assim como suas funções foram categorizados a partir do database STRING 12.0, utilizando o teste multiparâmetro de hipóteses variadas de Benjamini-Hochberg, através da transformação logarítmica $-\log$ do False Discovery Rate (FDR) das expressões demonstradas nas análises. Os *Heatmaps* foram produzidos manualmente através do software de acesso livre Rstudio, utilizando a base de amostras protéicas alinhadas à Ontologia gênica, e associando essas proteínas com a expressão obtida através dos resultados do HPCL, leitura realizada pelo Instituto Fiocruz (Paraná).

4. Resultados e discussão

O experimento de proteômica realizado nas brânquias de *A. peruibensis* teve como objetivo a quantificação relativa das proteínas utilizando marcação isotópica com demetilação reductiva de aminas. A estratégia de marcação envolveu o uso de isótopos pesados e leves de formaldeído e cianoborohidreto, com o objetivo de identificar variações quantitativas nas proteínas associadas a diferentes condições experimentais. O protocolo experimental incluiu três corridas no espectrômetro de massas. Na primeira corrida, foram utilizadas duas amostras do grupo controle, marcadas com os isótopos D28 e D30, da exposição ao ar com o marcador D32 e da recuperação com o D36. Nas corridas subsequentes, a estratégia foi mantida, utilizando uma amostra controle marcada com D28, uma amostra exposta ao ar marcada com D32 e uma amostra submetida à recuperação marcada com D36.

Os resultados obtidos nas três corridas foram analisados com um FDR de 1% (False Discovery Rate), e utilizando o critério de $-10\lg p \geq 20$, com pelo menos um peptídeo único por proteína. Na Corrida A, foram identificadas 3064 proteínas, correspondendo a 1794 sequências distintas, agrupadas em 696 proteínas e 372 grupos de proteínas. Na Corrida B, foram detectadas 2733 proteínas, com 1932 sequências distintas, resultando em 754 proteínas distribuídas em 408 grupos. Já na Corrida C, foram identificadas 2827 proteínas, com 1912 sequências distintas, agrupando 696 proteínas em 370 grupos (Figura 3A). Utilizando os números de acesso de proteínas obtidos a partir do banco de dados Identical Protein Groups (IPG) do NCBI, filtrados com o termo de busca "Rivulus", que resultou em um total de 37.798 sequências, foram realizadas três corridas independentes (A, B e C). Os acessos identificados em cada corrida foram submetidos a uma ferramenta de análise de diagrama de Venn, com o objetivo de identificar acessos comuns e exclusivos entre os conjuntos. A análise revelou um total de 1083 acessos distintos entre as três corridas, dos quais 423 estavam presentes simultaneamente nas corridas A, B e C, indicando um núcleo conservado de proteínas compartilhadas entre as corridas analisadas (Figura 3).

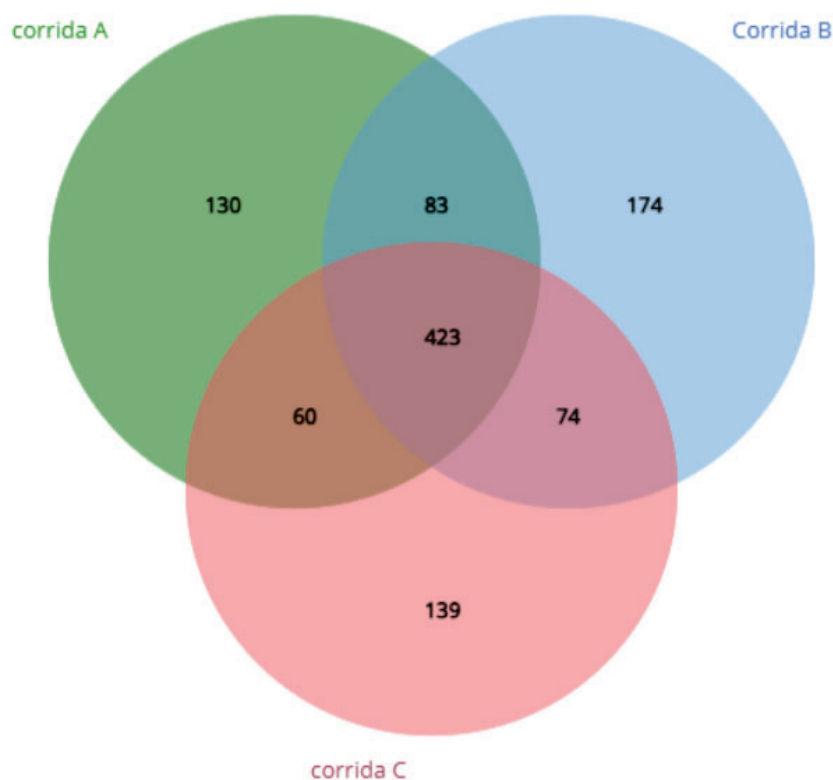


Figura 3. Diagrama de Venn comparando em corridas o grupo de referência *Kryptolebias marmoratus* quanto a presença de proteínas nas brânquias com os resultados marcados de *A. peruibensis*.

Para realizar suas funções, as proteínas se ligam, regulam e cooperam entre si. Entender essa complexa relação é desafiador, porém, essencial para a descrição dos processos celulares dos organismos analisados (Alberts et al., 2002). O database STRING v12.0 é uma ferramenta que compila, marca e integra associações de proteínas através de uma análise comparativa das informações oferecidas e dados conhecidos de sistemas similares, com o objetivo de criar redes para a compreensão física e funcional das interações entre as proteínas (Szklarczyk, D; et. al, 2014). Essas funções podem ser separadas em alguns grupos essenciais, uma divisão amplamente utilizada para analisar as funções das ligações de proteínas é a Ontologia gênica, onde as proteínas são associadas à três principais funções: Funções moleculares, Componentes celulares e Processos Biológicos. Para uma leitura mais eficaz da análise dos resultados proteicos, foi realizada uma tabulação a partir do software de acesso livre RStudio®, utilizando os resultados da expressão das proteínas a partir dos resultados HPLC e da Ontologia Gênica.

As figuras 4 a 6 apresentam a expressão proteica de grupos moleculares através da Ontologia Gênica (*Gene Ontology - GO*), amplamente utilizada na saúde humana para previsão de patologias e entendimento de estruturas biológicas básicas nos metabolismos. O uso da GO na fisiologia comparada tem crescido exponencialmente para análise de respostas moleculares à diversos estressores ambientais, como poluentes, temperaturas elevadas e exposição ao ar (Xiao et al., 2025).

Em nossa análise, foi possível observar (Figura 4) que proteínas associadas à processos biológicos como produção metabólica de ATP e metabólitos e energia não apresentaram alteração significativa durante a exposição ao ar, porém demonstraram um aumento considerável durante a recuperação. As proteínas associadas com a organização de filamentos do citoesqueleto e responsáveis pela estruturação e desestruturação de estruturas citoesqueléticas apresentaram uma expressão significativamente maior durante a emersão, mantendo ainda uma expressão mais marcante na exposição quando comparada ao grupo controle. O grupo de proteínas associadas ao processo metabólico de trifosfatos de ribonucleosídeos de purina e difosfatos de nucleosídeos não apresentou aumento durante o estresse causado pela emersão, porém apresentou um aumento marcante da sua expressão durante a recuperação. O grupo de proteínas associado a metabólitos de ribonucleotídeos de purina, essenciais para a construção de purina (construção de DNA e RNA) e proteínas associadas à processos glicolíticos apresentaram uma redução significativa durante o estresse por emersão, e um marcante aumento, obtendo valores mais altos que os iniciais (grupo

controle) durante a recuperação durante 7 dias em água. O grupo de proteínas associados com a obtenção de energia metabólica através do carboidrato (carbohydrate catabolic process) e processos envolvidos na contração muscular não demonstraram alterações durante a exposição, mas apresentou uma expressão levemente mais acentuada durante a recuperação. Proteínas associadas aos processos metabólicos do piruvato, presentes no final do processo da glicólise, fornecendo energia para o metabolismo de forma anaeróbica pela produção de lactato sofreu redução significativa durante a exposição ao ar, e demonstrou aumento exponencial durante o tratamento de recuperação. Os grupos de proteínas associado a processos de organização de fibras supramoleculares, filamentos de actina e organização citoesquelética e filamentos intermediários de organização não apresentaram acentuadas modificações, mas houve um leve aumento na expressão durante a exposição, e um leve queda de expressão durante a recuperação, porém, não foi observado o retorno aos padrões do grupo controle durante a queda, demonstrando uma expressão intermediária entre os grupos de exposição e controle. Os grupos de processo metabólico de organofosforados e processo biossintético da fosfocreatina apresentaram uma diminuição marcante da sua expressão durante a exposição e retornaram às características originais do grupo controle, demonstrando uma plasticidade na expressão das proteínas associadas em 7 dias de emersão subsequentes de 7 dias de recuperação em água.

A figura 5 representa a riqueza de proteínas associadas a funções moleculares durante a emersão e recuperação. Funções como enovelamento de fibras actinas não apresentaram alterações durante a exposição ao ar, porém, o enovelamento de actinas e proteínas citoesqueléticas aumentou durante a emersão. O enovelamento de pequenas moléculas, assim como a atividade estrutural molecular apresentaram menor expressão durante o tratamento de exposição.

A figura 6 apresenta as expressões das proteínas relacionadas aos componentes celulares durante os tratamentos. Durante o estresse realizado durante a exposição ao ar, houve um aumento da miosina, sarcomeros e fibras contrateis, havendo plasticidade molecular relacionada à essas epressões, uma vez que a recuperação em água durante 7 dias restabeleceu a conformação original da expressão dessas proteínas. A expressão de miofibrila, filamentos intracelulares de queratina, estruturação anatômica intracelular e filamentos intermediários apresentaram um marcante aumento durante a exposição e não retornaram às características do grupo controle após a recuperação por 7 dias em água. Componentes do citoesqueleto de actina não apresentaram alterações significativas durante os tratamentos, porém, complexos de troponina apresentaram

expressões marcantes durante a exposição associadas ao aumento da expressão de miosinas, demonstrando uma resposta dinâmica e adaptativa do metabolismo. Fibras supramoleculares e componentes celulares do citoesqueleto diminuíram durante a exposição ao ar e mantiveram padrão similar durante a emersão e a recuperação.

O acúmulo de oxigênio ofertado pelo ar atmosférico oferece risco aos tecidos expostos visto que o excesso de acúmulo de espécies reativas ao oxigênio - *Reactive Oxygen Species ROS* - carregam subprodutos metabólicos tóxicos, ocasionando danos oxidativos que a longo prazo causam danos fisiológicos severos (Sun et al., 2024; Zhao et al., 2025; Xiao et al., 2025). O aumento na expressão de processos biológicos como fibras supramoleculares, filamentos de actina e organização citoesquelética e filamentos intermediários de organização estrutural (Figura 4), funções moleculares como enovelamento de actina e enovelamento de proteínas citoesqueléticas (Figura 5) e componentes celulares como filamentos intermediários, de queratina e estruturas anatômicas estruturais (Figura 6), podem destacar os efeitos cumulativos do estresse oxidativo durante a emersão, sendo um indicativo de lesão ou quebra de estruturas essenciais, como observado em lesões histopatológicas nos tecidos branquiais de rivulídeos durante a exposição. (Del Rio et al., 2005; Dong et al., 2021; Moore & Roberts, 1998; Oliveira, et al., 2025; Ong et al., 2007, Xiao et al., 2025).

Rivulídeos apresentam uma alta capacidade de plasticidade fisiológica. *Kryptolebias marmoratus* demonstra alta capacidade de remodelamento morfológico branquial durante o estresse ambiental fornecido pela exposição ao ar. *Atlantirivulus peruibensis* também demonstra alta capacidade de remodelamento branquial à nível histológico. A nível molecular, a diminuição da expressão de proteínas como componentes de fibras supramoleculares, citoesqueleto, funções associadas com o enovelamento de pequenas moléculas (Figura 5), e o aumento de processos associados a organização do citoesqueleto, e organização de filamentos intermediários (Figura 4), podem indicar uma alta demanda de remodelamento estrutural durante a exposição ao ar. Esse processo é custoso e pode levar a uma demanda aumentada de energia, que pode afetar os processos metabólicos, porém, *A. peruibensis* demonstrou alta eficiência na manutenção desses processos. (Mukherjee et al., 2023; Oliveira, et al., 2025; Ong et al., 2007, Xiao et al., 2025)

Espécies com estilo de vida anfíbio, como *Scartelaos histophorus*, um gobiidae da família dos *Mudskippers*, apresentou um aumento acentuado dos processos catalíticos durante condições hipóxicas, o que foi associado com um sobrecarregamento do metabolismo anaeróbico como

defesa antioxidante. Processos catalíticos como fosforilação de nucleotídeos difosfatos, processos biossintéticos de fosfocreatina, processos metabólicos de piruvato, processos metabólicos organofosforados - figura 4 - apresentam uma menor expressão durante a exposição, podendo indicar uma eficaz defesa antioxidante, alterando as vias metabólicas para formas anaeróbicas de obtenção de energia como processos glicolíticos, essencial para a longa sobrevivência apresentada durante a emersão. Algumas adaptações demonstraram um comportamento dinâmico das vias metabólicas, como o aumento de componentes celulares relacionados à troponina - regulam as interações actina/miosina através de moléculas de cálcio, uma via que demonstra extrema importância para a regulação de íons durante a exposição ao ar - convergentes com o aumento de componentes de miosina, sarcômero e fibras contráteis (Figura 5), somado a estabilidade de vias de actina, como componentes de citoesqueleto de actina e proteínas associadas à funções de ligação de filamentos de actina (Figuras 5 e 6) em todos os tratamentos demonstram uma compensação das vias metabólicas, ou seja, um ajuste dinâmico do metabolismo energético. (Adeva-Andany et al., 2014; Xiao et al., 2025; You et al., 2014).

Por fim, as respostas moleculares observadas em *A. peruibensis* demonstraram vias eficazes para sobrepujar o estresse ofertado pela exposição ao ar, sendo uma resposta sólida para os meios que permitem uma adaptação ecológica-comportamental dos ambientes limítrofes e instáveis em que habita. Sua habilidade de sobreviver durante períodos de seca em poças marginais e capacidade de explorar ambientes terrestres e aquáticos é amplamente suportada pela sua capacidade de plasticidade fisiológica, porém, a exposição prolongada ao ar atmosférico prejudica suas funções branquiais normais em água, o que pode resultar em elevado estresse oxidativo. A espécie demonstrou um eficaz mecanismo de obtenção e manutenção metabólica em regime anaeróbio e um eficaz remodelamento das suas estruturas essenciais como forma de contornar um considerável custo fisiológico durante o estresse da emersão. A expressão de proteínas associadas à danos em estruturas e tecidos confirma o custo fisiológico alto da exposição ao ar, mantendo expressão considerável durante o tratamento de recuperação e podendo indicar que 7 dias de recuperação em água não foram suficientes para restabelecer a morfologia e estrutura essencial das brânquias e garantir suas funções normais, mantendo a necessidade de obtenção de energia por vias metabólicas não oxidativas. Apesar da lacuna de análises histopatológicas que ressaltem os danos ocasionados pelo estresse oxidativo e demais custos fisiológicos altos associados à exposição ao ar em *A. peruibensis*, os dados moleculares apresentados no presente trabalho podem ser fortemente associados à danos nesses tecidos.

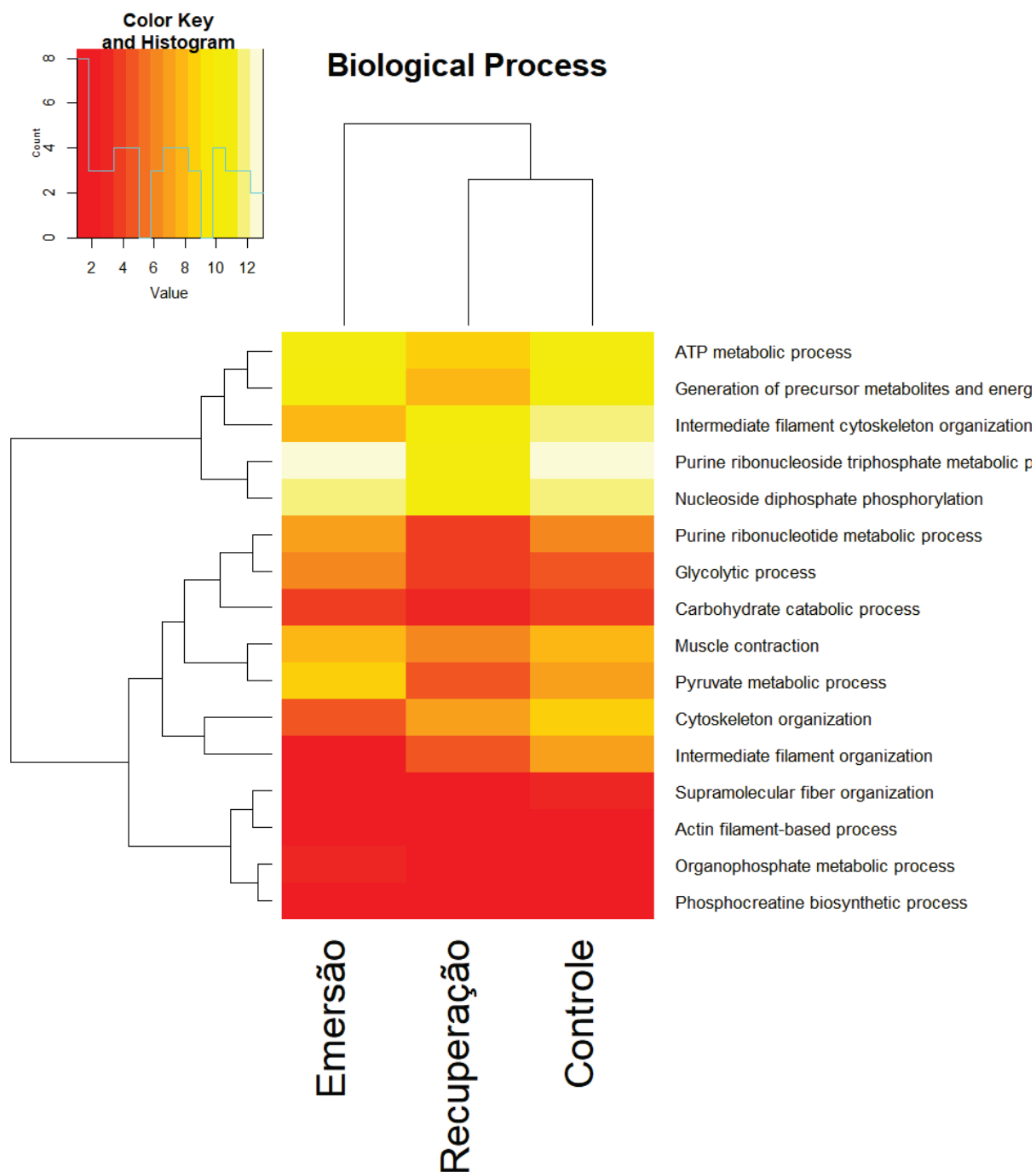


Figura 4. Heatmap de expressão de proteínas relacionadas aos processos biológicos nas brânquias de *Atlantirivulus peruibenses* do grupo controle, e expostos ao ar por 7 dias e subsequente recuperação em água por 7 dias.

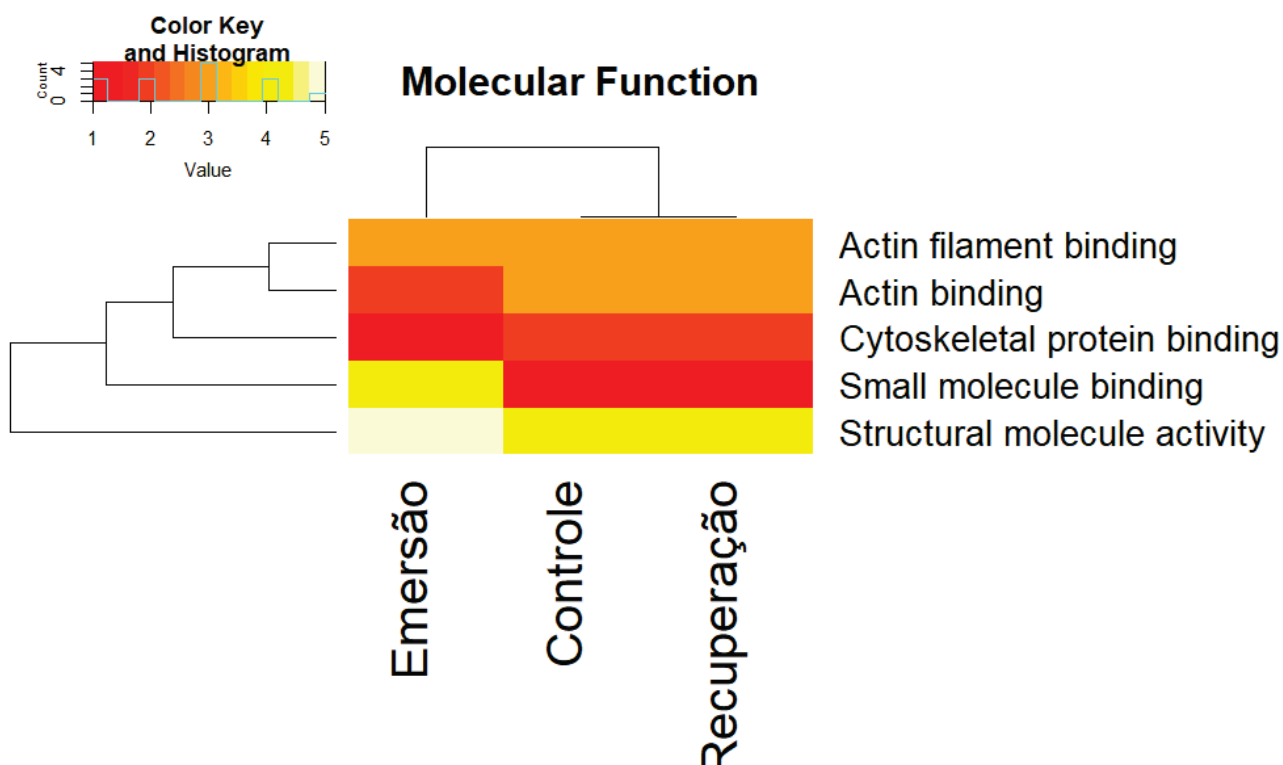


Figura 5. Heatmap de expressão de proteínas relacionadas às funções moleculares nas brânquias de *Atlantirivulus peruibenses* do grupo controle, e expostos ao ar por 7 dias e subsequente recuperação em água por 7 dias.

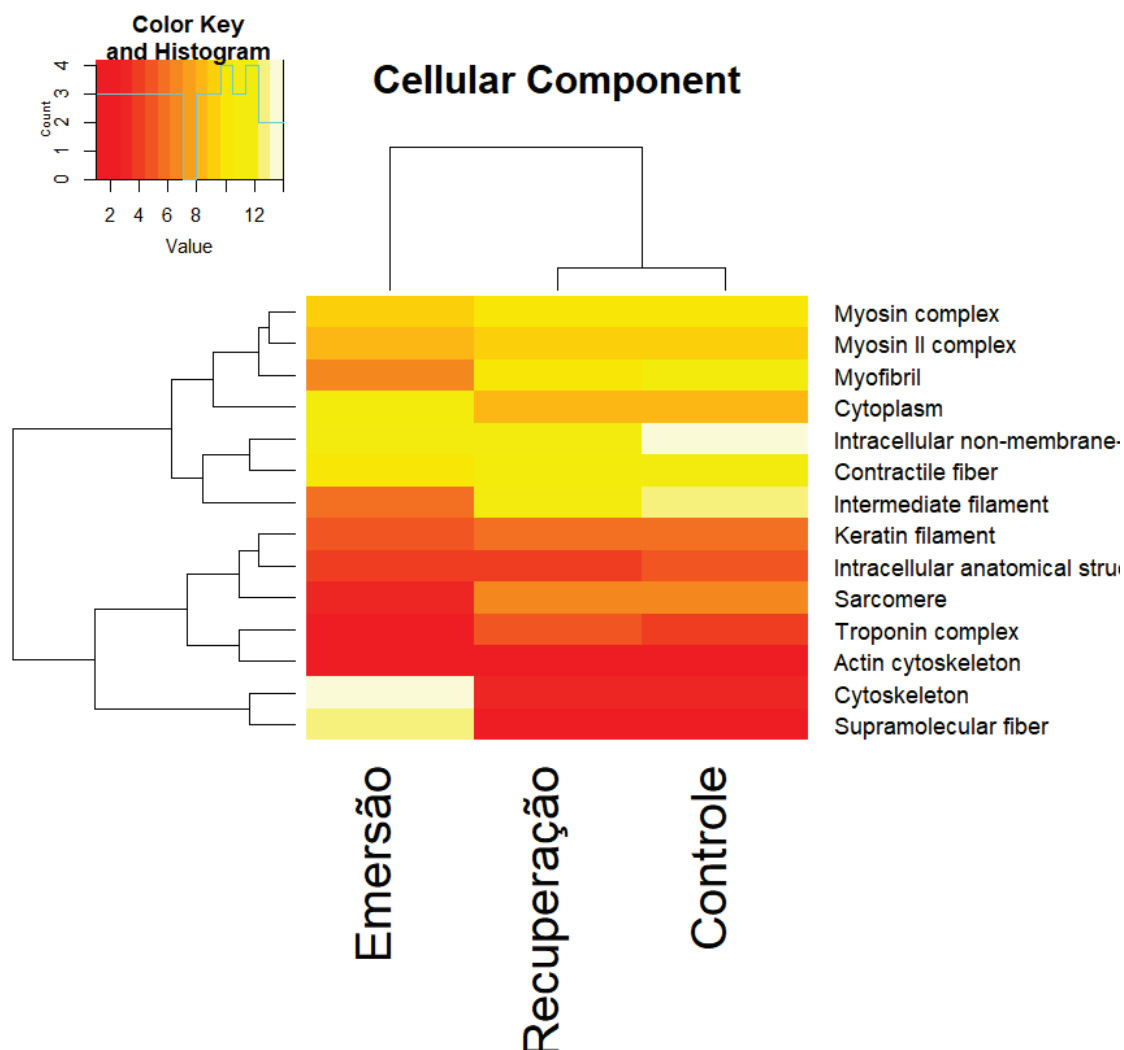


Figura 6. Heatmap de expressão de proteínas relacionadas aos componentes celulares nas brânquias de *Atlantirivulus peruibenses* do grupo controle, e expostos ao ar por 7 dias e subsequente recuperação em água por 7 dias.

5. Conclusão

O presente estudo demonstrou que as respostas proteômicas foram fortemente influenciadas pela exposição ao ar no Rivulidae *Atlantirivulus peruibensis*, endêmico de ambientes extremos e temporários como poças marginais de riachos de água preta. Durante a exposição ao ar atmosférico, as expressões proteicas demonstraram possíveis lesões, provavelmente pelo aumento do estresse oxidativo devido à maior disponibilidade de moléculas de oxigênio no ar atmosférico.

Foram observadas alterações em vias moleculares que indicam possível remodelamento estrutural de tecidos. Verificou-se a diminuição da expressão de proteínas associadas a componentes de fibras supramoleculares, ao citoesqueleto (Processos Biológicos) e a funções relacionadas ao enovelamento de pequenas moléculas (Funções Moleculares). Em contrapartida, houve aumento de processos ligados à organização do citoesqueleto (Processos Biológicos) e de filamentos intermediários (Funções Moleculares), sugerindo elevada demanda por remodelamento estrutural nos indivíduos de *A. peruibensis* durante a exposição ao ar por 7 dias.

Durante a exposição ao ar foram também observadas alterações em vias relacionadas ao remodelamento estrutural e à dinâmica metabólica, com redução de processos energéticos aeróbicos, como metabolismo de piruvato, biossíntese de fosfocreatina e metabolismo de compostos organofosforados, e aumento de mecanismos associados à glicólise e à reorganização do citoesqueleto (Processos Biológicos). Paralelamente, o aumento de componentes contráteis como troponina, miosina e estruturas sarcoméricas (Componentes Celulares), aliado à manutenção de vias ligadas ao citoesqueleto de actina e proteínas de ligação a filamentos de actina (Funções Moleculares e Componentes Celulares), sugere ajuste estrutural e metabólico coordenado, favorecendo a homeostase iônica e a eficiência energética durante a emergência.

Considerando a alta fragilidade de ambientes alagáveis temporários às mudanças climáticas e atividades antrópicas como aumento de temperatura média, fragmentação de habitats e poluição, nossos resultados destacam a importância do monitoramento de mudanças climáticas e a análise conjunta e profunda de estratégias para a conservação de populações de peixes anfíbios, que possuem um estilo de vida único e complexo.

Estudos direcionados à danos histopatológicos das brânquias e a análise da expressão proteômica em outros tecidos essenciais, como pele, fígado e rins de *Atlantirivulus peruibensis* são

essenciais para validação dos resultados obtidos neste trabalho, bem como a elucidação das demais implicações evolutivas e adaptativas em espécies com estilo de vida anfíbio.

Referências

Adeva-Andany M., Lopez-Ojén, M., Funcasta-Calderón R., Ameneiros-Rodríguez E., Donapetry-García C., Vila-Altesor M., Rodríguez-Seijas J. (2014). Comprehensive review on lactate metabolism in human health. *Mitochondrion* (Amst.). <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.05.007>.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., et al. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; Protein Function. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26911/>

Almeida-Val V. M. F, Val A. L., Duncan W. P., Souza F. C. A., Paula-Silva M. N., Land S. (2000). Scaling effects on hypoxia tolerance in the Amazon fish *Astronotus ocellatus* (Perciformes: Cichlidae): contribution of tissue enzyme levels. *Comparative Biochemistry and Physiology*. 10.1016/s0305-0491(99)00172-8.

Axlid E. G., Lewis P. D., Carroll T. J., & Minicozzi M. R. (2023). Functional and Behavioral Trade-Offs between Terrestrial and Aquatic Locomotion in the Amphibious Fish *Kryptolebias marmoratus*. *Integrative and comparative biology*. <https://doi.org/10.1093/icb/icad003>.

Barros G. M., Gama L. F., Mello F. R., Corrêa C. N., Fiametti L. O., Montenegro H., Ottoni C. A., Castro, L. M. (2025). Molecular Insights into the Marine Gastropod *Olivancillaria urceus*: Transcriptomic and Proteopeptidomic Approaches Reveal Polypeptides with Putative Therapeutic Potential. *Int. J. Mol. Sci.* <https://doi.org/10.3390/ijms26083751>

Cook K. V., Lennox R. J., Hinch S. G., Cooke S. J. (2015), FISH Out of WATER: How Much Air is Too Much?. *Fisheries*. <https://doi.org/10.1080/03632415.2015.1074570>.

Correa A. R., Heylen D., Aerts J., Thas O., Hooyberghs J., Ertaylan G. & Valkenborg J. (2021). Towards Building a Quantitative Proteomics Toolbox in Precision Medicine: A Mini-Review. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.723510>.

Del Rio D., Stewart A. J., Pellegrini N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metab. Cardiovasc. Dis.* <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2005.05.003>.

Dong Y. W., Blanchard T. S., Noll A., Vasquez P., Schmitz J., Kelly S. P., Wright P. A., Whitehead A. (2021). Genomic and physiological mechanisms underlying skin plasticity during water to air transition in an amphibious fish. *J. Exp. Biol.* <https://doi.org/10.1242/jeb.235515>.

Ferreira F. & Petrere M. (2009). The fish zonation of the Itanhaem river basin in the Atlantic Forest of southeast Brazil. *Hydrobiologia*. 636. 11-34. 10.1007/s10750-009-9932-4.

Gordon M. W. (1969). Neuronal Plasticity and Memory. *American Journal of Orthopsychiatry*. <https://doi.org/10.1111/j.1939-0025.1969.tb02453.x>.

Heffell Q., Turko A. J. & Wright P. A. (2018). Plasticity of skin water permeability and skin thickness in the amphibious mangrove rivulus *Kryptolebias marmoratus*. *Journal of Comparative Physiology*. <https://doi.org/10.1007/s00360-017-1123-4>

Junk W. J., Wantzen K. M. (2004). The Flood Pulse Concept: New Aspects, Approaches and Applications—An Update. Max-Planck-Institute for Limnology.

Martin K. L. (2013). Theme and variations: amphibious air-breathing intertidal fishes. *J Fish Biol.* <https://doi.org/10.1111/jfb.12270>

Moore K., Roberts L. J. (1998). Measurement of lipid peroxidation. *Free Radic. Res.* <https://doi.org/10.3109/10715769809065821>.

Mukherjee S., Horka P., Zdenkova K., Cermakova E. (2023). Parvalbumin: a major fish allergen and a forensically relevant marker. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes14010223>.

Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:57–63.

Oliveira, S., Duarte, R. M. (2025). Vivendo fora d'água: plasticidade histológica da pele e brânquias de *Atlantirivulus santensis* durante a exposição ao ar. [S.l.]: Universidade Estadual Paulista (Unesp).

Ong K. J., Stevens E. D., & Wright P. A. (2007). Gill morphology of the mangrove killifish (*Kryptolebias marmoratus*) is plastic and changes in response to terrestrial air exposure. *Journal of Experimental Biology*. <https://doi.org/10.1242/jeb.002238>

Onukwufor J. O., & Wood C. M. (2018). The osmorepiratory compromise in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): The effects of fish size, hypoxia, temperature and strenuous exercise on gill diffusive water fluxes and sodium net loss rates. Comparative biochemistry and physiology. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2018.02.002>

Ponzetto J. M. (2012). Relações filogenéticas e filogeografia molecular das espécies de peixes anuais do gênero *Simpsonichthys* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Rio Claro.

Sayer M. D. J. (2005). Adaptation on amphibious fish for surviving life out of water. Fish and Fisheries. <https://doi.org/10.1111/j.1467-2979.2005.00193.x>

Sun Z., Zhao L., Peng X., Kang B., (2024). A comparative study on the toxic effects of lead pollution and nanoplastic-lead mixed pollution on red drum and their detoxification strategies. J. Hazard. Mater. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136018>.

Szklarczyk D., Nastou K., Koutrouli M., Kirsch R., Mehryary F., Hachilifl R., Hu W., Peluso M., Huang Q., Fang T., ; Doncheva N. T., Pyysalo S., Bork P., Jensen L. G. & Mering C. V. (2014). The STRING database in 2025: protein networks with directionality of regulation. Nucleic Acids Res. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1000>.

Teixeira C. M. M., Correa C. N., Iwai L. K., Ferro E. S., Castro L. M. (2019). Characterization of Intracellular Peptides from Zebrafish (*Danio rerio*) Brain. Zebrafish. <https://doi.org/10.1089/zeb.2018.1718>.

Tunnah L., Robertson C. E., Turko A. J., Wright P. A. (2021). Acclimation to prolonged aquatic hypercarbia or air enhances hemoglobin-oxygen affinity in an amphibious fish. Comparative Biochemistry and Physiology. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110848>.

Turko A. J., Wright P. A. (2015). Evolution, ecology and physiology of amphibious killifishes (Cyprinodontiformes). Journal of Fish Biology. Volume 81, 815-835pp. <https://doi.org/10.1111/jfb.12758>.

Turko A. J., Rossi G. S., Wright, P. A. (2021). More Than Breathing Air: Evolutionary Drivers and Physiological Implications of An Amphibious Lifestyle Fishes. American Physiology Society. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2021>.

Villén J., & Gygi S. P. (2008). The SCX/IMAC enrichment approach for global phosphorylation analysis by mass spectrometry. Nature protocols. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.150>

Wilson, E. O. Introduction. In: Reaka, M. L.; Wilson, D. E. & Wilson, E. O. (1997). Biodiversity II; understanding and protecting our biological resources. Joseph Henry Press, Washington. Pp. 1-3.

Wright P. A., Turko A. J. (2016). Amphibious fishes: evolution and phenotypic plasticity. Journal of Experimental Biology. <https://doi.org/10.1242/jeb.126649>

Wright P. A. (2021). Cutaneous respiration and osmoregulation in amphibious fishes. Elsevier. Volume 253. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110866>.

Xiao D., Wang R., Zhang P., Riyanti, Zhao L & Song N. (2025). Molecular and physiological adaptations of *Scartelaos histophorus* to air exposure: Implications for amphibious fish survival, Environmental Research. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2025.121922>.

You X., Bian C., Zan Q., et al., 2014. Mudskipper genomes provide insights into the terrestrial adaptation of amphibious fishes. Nature. <https://doi.org/10.1038/ncomms6594>.

Ywamoto E. V., Nielsen D. T. B, Oliveira C. (2025). Two new species of *Atlantirivulus* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Atlantic Forest biome, São Paulo State, Brazil. Neotrop. ichthyol. <https://doi.org/10.1590/1982-0224-2024-0110>

Zhao X., Jiang W. Y., Liu J. J., Yan W. J. Zhang Y. H., Zhang Z., Zhang P. D. (2025). Unraveling the impact of PFOA toxicity on *Zostera marina* using a multi-omics approach: insights from growth, physiological, transcriptomic, and metabolomic signatures. J. Hazard. Mater. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.137024>.