



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



Instituto
de Biociências
Campus do Litoral Paulista



SANTANA OLIVEIRA

**VIVENDO FORA D'ÁGUA: Plasticidade histológica da pele e brânquias de
Atlantirivulus santensis durante a exposição ao ar.**

São Vicente - SP

2025

SANTANA OLIVEIRA

**VIVENDO FORA D'ÁGUA: Plasticidade histológica da pele e brânquias de
Atlantirivulus santensis 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 Biologia Marinha.

Orientador: Dr. Rafael Mendonça Duarte

**São Vicente - SP
2025**

O48v

Oliveira, Santana

Vivendo fora d'água: Plasticidade morfológica da pele e brânquias de *Atlantirivulus santensis* durante a exposição ao ar. / Santana Oliveira. -- São Vicente, 2025

28 p. : il., tabs., fotos

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

Orientador: Rafael Mendonça Duarte

1. Estilo de vida anfíbio. 2. Tolerância à emersão. 3. Área de superfície branquial. 4. Espessura do epitélio. 5. Morfometria. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Dados fornecidos pelo autor(a).

Agradecimentos

Gostaria de expressar meu imenso agradecimento a cada um que acompanhou meu caminho até aqui. A meus avós, exemplo de amor, a meus pais, principalmente à minha mãe, que sempre me impulsionou ao aperfeiçoamento e à busca por conhecimento, à minha tia, a quem devo a sede do saber. Agradeço também à primeira família que construí no ambiente acadêmico: Manoella, Maysha e Allan, obrigada por me acompanharem de perto à cada alto e baixo durante todo nosso percurso,. à todos os meus amigos e companheiros, à Maria, por todo amor e incentivo e à Beatriz, por estar sempre com ao meu lado e com muito amor em todos os altos e baixos desses anos.

Meu imenso agradecimento ao LECTA e aos meus companheiros de laboratório, que sempre demonstraram companheirismo, ao meu orientador Rafael Mendonça Duarte por todos ensinamentos e direcionamentos durante minha trajetória acadêmica, à Susana Braz Mota pela gentileza e sabedoria passada à cada oportunidade, ao projeto Peixes de Poças, pelos campos, risadas e aprendizados ao Yan Negreiros por me iniciar nessa interessante jornada da ictiologia, assim como ao Instituto Biopesca pelo espaço concedido para realização das amostras histológicas. Ressalto também o meu agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), que possibilitou que o presente trabalho fosse realizado e à Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - UNESP, em especial ao Instituto de Biociências - Campus litoral Paulista pela estrutura fornecida durante os anos de graduação.

Abstract

Over 90 species of freshwater fishes exhibit an amphibious lifestyle that comprises the ability to emerge and spend certain periods out of water as a normal part of their life. Many species from the Rivulidae (Cyprinodontiformes) are highly adapted for the maintenance of the homeostasis during emersion. *Atlantirivulus santensis* is a Rivulidae endemic from the Coastal Plain of South-Central São Paulo Coastline (Itanhaém-SP), it habits the margin of streams and temporary floated spaces, characterized by the extreme environmental conditions, such as hypoxia, low pH and high dissolved Organic Carbon. However, the tolerance of the species and their physiological adjustment associated with their tolerance to air exposure are yet to be deeply studied. That way, this research is intended to analyze the role of the gills and skin of *Atlantirivulus santensis* during air exposure. For this, we will measure the survival over emersion index, such as alterations in the morphology of the skin and gills. We intend to contribute to the understanding of the physiological mechanisms that allowed the establishment and colonization of new temporary habitats with high challenges for keeping the homeostasis. Our results brought data about the physiological maintenance of *Atlantirivulus santensis*. It was a positive correlation between the weight of fish and the resistance to emersion, where it was found that heavier individuals demonstrate higher capacity to the resistance to emersion. Furthermore, essential characteristics of the morphology of the gills and skin suffered changes during emersion, such as the reduce in lamellar length and increase in interlamellar mass and thickening of the skin epidermis. Those adaptations, essential to the maintenance of homeostasis in terrestrial environments, demonstrate a noticeable morphological plasticity of this fish species. The gill and skin of *Atlantirivulus santensis* exhibit strong capacity of remodeling as an answer to the environmental stress, regarding survival in adverse conditions. After returning to the aquatic habitat, the reversion of those morphological alterations was verified, showing an efficient regulatory mechanism. Those results suggest that *A. santensis* has a noticeable capacity of morphophysiological adjustment, allowing the adaptation to semi-terrestrial environments through transitory structural modifications.

Keywords: Amphibious lifestyle, emersion tolerance, gill surface area, epidermal thickness, morphometry, physiological adaptation.

Resumo

Pouco mais de 90 espécies de peixes de água doce apresentam o estilo de vida “anfíbio” que se caracteriza pela capacidade de emergir e passar certos períodos fora da água, como parte normal de sua história de vida. Dentre estas se destacam diversas espécies da família Rivulidae (Cyprinodontiformes), que são amplamente adaptadas à manutenção da homeostase dos animais durante a emersão. *Atlantirivulus santensis* é um rivulídeo endêmico da sub-bacia do Rio Preto na Planície Costeira do Litoral Centro-Sul (Itanhaém/SP), que habita a região marginal dos riachos, e ambientes alagados temporários, que são caracterizados por suas condições ambientais extremas, como hipóxia, baixo pH e alta concentração de carbono orgânico dissolvido. No entanto, a tolerância da espécie e ajustes fisiológicos associados à sua tolerância à exposição ao ar ainda não foram profundamente estudados. Assim, esse trabalho pretende analisar o papel das brânquias e da pele na tolerância de *A. santensis* durante exposição ao ar. Para tanto, foram mensurados a taxa de sobrevivência após a emersão, alterações na morfologia do epitélio branquial e cutâneo. Pretendemos assim contribuir para o entendimento dos mecanismos fisiológicos que levaram ao estabelecimento do estilo de vida anfíbio em *A. santensis*, e que auxiliam a espécie a colonizar novos ambientes temporários com condições ambientais altamente desafiadoras à manutenção da homeostase. Nossos resultados trouxeram dados sobre a manutenção fisiológica de *Atlantirivulus santensis*. Foi encontrada uma correlação positiva entre o peso dos animais e sua capacidade de resistência à emersão, onde foi demonstrado que indivíduos com maior peso apresentam maior capacidade de resistência à emersão. Além disso, características essenciais da morfologia das brânquias e pele sofreram alterações durante a emersão, como a redução do comprimento lamelar e aumento da massa interlamelar, assim como o espessamento da epiderme. Essas adaptações, essenciais para a manutenção da homeostase em ambientes terrestres, demonstram notável plasticidade morfológica da espécie. As estruturas branquiais e a epiderme de *A. santensis* exibem capacidade de remodelação em resposta ao estresse ambiental, garantindo a sobrevivência em condições adversas. Após o retorno ao ambiente aquático, verificou-se a reversão dessas alterações, evidenciando um mecanismo fisiológico regulatório eficiente. Esses resultados sugerem

que

A. santensis possui uma notável capacidade de ajuste morfofisiológico, permitindo sua adaptação a ambientes semi-terrestres por meio de modificações estruturais transitórias.

Palavras-chave: Estilo de vida anfíbio, Tolerância à emersão, Área de superfície branquial, Espessura do epitélio, Morfometria, Adaptação fisiológica

Sumário

Introdução	8
Objetivos	12
Geral	12
Específicos	12
Material & métodos	13
Coleta e manutenção dos animais	13
Determinação da tolerância à exposição ao ar	14
Avaliação das respostas morfométricas das brânquias e pele	14
Análises histológicas	15
Análises estatísticas	16
Resultados e discussão	16
Conclusão	22
Referências Bibliográficas	23

Introdução

Atualmente já foram descritas mais de 30.000 espécies de peixes que vivem nos mais diversos e extremos ambientes, sendo a grande maioria encontrada exclusivamente no meio aquático durante todos os estágios de vida. Contudo, pouco mais de 200 espécies de peixes (>1%) apresentam a capacidade de emergir e passar certos períodos fora da água, como parte normal de sua história de vida (Gordon et al., 1969; revisto por Turko et al., 2021). Para essas espécies a emersão pode estar relacionada a diferentes aspectos biológicos como a alimentação/forrageamento, reprodução, evitar a predação, competição, migração, secas temporárias do ambiente e depleção da qualidade da água (e.g. hipóxia ou acúmulo de produtos nitrogenados) (Wright & Turko, 2016). Assim, essas espécies são reconhecidas por apresentar estilo de vida “anfíbio” (*Amphibious lifestyle*) (Turko & Wright, 2015; revisto por Turko et al., 2021), uma característica que evoluiu de forma independente múltiplas vezes em diferentes linhagens de Osteichthyes, o que permitiu a elas ocuparem nichos ecológicos indisponíveis para as espécies obrigatoriamente aquáticas (Turko & Wright, 2015; Wright & Turko, 2016).

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).

Uma vez emersos os peixes com estilo de vida anfíbio enfrentam desafios únicos, quando comparados às espécies exclusivamente aquáticas, exigindo um alto nível de complexidade adaptativa que envolve uma grande plasticidade de respostas comportamentais, fisiológicas e bioquímicas (Wright, 2021; Turko et al., 2021). Nesse sentido, os principais desafios encontrados por essas espécies estão relacionados a (i) locomoção, devido a menor viscosidade e densidade do ar; (ii) alimentação, em função de distúrbios nos sistemas sensoriais adaptados ao meio aquático; (iii) balanço hídrico e iônico, devido a dessecação e perdas iônicas através da pele; (iv) manutenção das trocas gasosas e metabolismo, em virtude do colapso da delicada estrutura

filamentos branquiais no ambiente aéreo; e (v) excreção de nitrogênio, uma vez que a forma não ionizada da amônia (NH_3) é relativamente tóxica e consideravelmente mais solúvel em água do que no ar (Ong et al., 2007; Turko & Wright, 2015; Wright, 2021). Portanto, o estilo de vida anfíbio requer profundas adaptações fisiológicas, particularmente sobre as funções branquiais, voltadas para a manutenção do balanço hídrico, trocas gasosas, excreção de nitrogênio e regulação iônica (Sayer, 2005; Turko & Wright, 2015).

Nesse sentido, uma das espécies com estilo de vida anfíbio mais bem estudada é o rivulídeo *Kryptolebias marmoratus*, uma espécie eurialina com ampla distribuição em ambientes costeiros salobros do continente americano, que pode sobreviver por longos períodos no ambiente terrestre apresentando marcadas adaptações à emersão. Por exemplo, Ong e colaboradores (2007) demonstraram que essa espécie é capaz de sobreviver por 7 dias fora d'água, apresentando grande habilidade de remodelar – reversivelmente – a estrutura dos filamentos branquiais. Durante a emersão foi observado a proliferação de grupos celulares nos espaços interlamelares das lamelas secundárias, o que resultou em significativa redução da área de superfície respiratória, mas que auxiliaram os animais no controle das perdas evaporativas de água e proteção da estrutura branquial (Ong et al., 2007). Contudo, o aumento da altura da massa interlamelar, e consequente redução da área de superfície branquial, resultou em menores taxas de consumo de oxigênio e aumento da pressão parcial crítica de oxigênio (P_{crit}), sugerindo um custo respiratório significativamente maior para a espécie durante a emersão (Turko et al, 2012). No entanto, após o retorno de 7 dias à água, as alterações morfológicas foram revertidas e a estrutura do epitélio branquial foi similar ao observado nos animais mantidos na água (grupo controle) (Ong et al., 2007).

Com a redução da eficiência das funções branquiais durante a exposição ao ar o aparato cutâneo (pele) se torna o principal órgão responsável pelas trocas gasosas (O_2 e CO_2), balanço hídrico e iônico e excreção de nitrogênio de *K. marmoratus* (Urbina et al., 2014; Dong et al., 2021; Wright, 2021). Assim, enquanto na maioria dos peixes a pele atua apenas como uma barreira entre o meio externo e interno, nas espécies de estilo de vida anfíbio ela se torna uma eficiente superfície de troca (Wright, 2021) Por exemplo, estudos histológicos e de transcriptoma têm evidenciado uma alta plasticidade da superfície cutânea durante a emersão. Após 1h de exposição ao ar, Dong e colaboradores (2021) evidenciaram uma rápida remodelação na estrutura morfológica e na

expressão de genes na pele de *K. marmoratus*, o que foi associado a um maior controle da permeabilidade do epitélio (com aumento das junções paracelulares, desmossomos e junções aderente, e diminuição do conteúdo de colágeno), evitando a perda de água pela evaporação. A exposição prolongada ao ar (7 dias) também estimulou a angiogênese na proximidade da superfície cutânea (Dong et al., 2021), e o aumento no número e área de superfície dos ionócitos. Além disso, foi observada nos ionócitos uma maior expressão de genes relacionados a proteínas de transporte de amônia do tipo rhesus (Rh proteins) e da bomba protônica (V-type H⁺-ATPase) (Dong et al., 2021), proteínas que são associadas a excreção de amônia nas brânquias dos peixes no ambiente aquático (Wright & Wood, 2009). Assim, os estudos com *K. marmoratus* vem demonstrando que a plasticidade de respostas morfofuncionais das brânquias e da pele, e sua alta capacidade de remodelagem, é crítica para o estabelecimento do estilo de vida anfíbio em peixes, e que espécies com alta plasticidade fenotípica apresentam vantagens adaptativas fundamentais para a colonização de novos ambientes.

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). Esses riachos de águas pretas possuem 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 santensis*, sendo encontradas apenas nos corpos d'água dessa bacia (Ferreira et al., 2014).

A espécie *A. santensis* 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). Espécimes de *A. santensis* são reconhecidamente de pequeno porte atingindo no máximo – em fêmeas maduras sexualmente – 6,5cm (Huber, 1996). Embora *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). Isso ocorre, pois, estas espécies dependem 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. santensis* pode ser considerada potencialmente ameaçada. Adicionalmente, após revisão genética da taxonomia da família Rivulidae utilizando espécimes encontrados em 12 diferentes planícies litorâneas, foram identificadas apenas 3 populações em pontos de coleta no Litoral Sul que foram geneticamente próximas de *A. santensis*, indicando que sua distribuição é ainda mais restrita e que populações antes consideradas como *A. santensis* podem, na verdade, ser espécies distintas (Ywamamoto, 2019).

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). Por ser exclusiva de ambientes lênticos de águas pretas, também ocupando poças temporárias marginais, é esperado que *A. santensis* apresente diversas adaptações comportamentais, fisiológicas e bioquímicas às condições naturais de hipóxia e emersão (como durante a seca dos ambientes de poças em que vivem). Contudo, pouco se sabe até o momento sobre o grau de tolerância de *A. santensis* à exposição ao ar, e dos ajustes fisiológicos associados à

capacidade dessa espécie em colonizar ambientes temporários com condições ambientais tão severas e extremas.

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. santensis* 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. Dessa forma, esse trabalho vem analisando o papel das brânquias e da pele na tolerância de *A. santensis* durante exposição ao ar. Para tanto, experimentos em laboratório já foram realizados onde foi determinado a sobrevivência da espécie após a emersão, e a influência da massa corpórea nessa tolerância, além da retirada de amostras de brânquias e pele dos peixes para a determinação de alterações na morfologia do epitélio branquial e cutâneo de *A. santensis* após a exposição ao ar, e após o retorno dos animais ao ambiente aquático.

Objetivos

Geral

Considerando, portanto, a ampla lacuna de conhecimento acerca da espécie, e da vasta oportunidade deixada pelas já efetuadas pesquisas em outras espécies do gênero rivulidae, buscamos primeiramente avaliar a influência do peso corpóreo sobre o tempo de sobrevivência de *A. santensis* durante exposição ao ar. Além disso, foram avaliadas as alterações morfofisiológicas dos principais tecidos relacionados à trocas gasosas na espécie (brânquia e pele), que demonstram alto nível de adaptação às condições de hipóxia, ao hábito saltatório, e de exposição ao ar em *A. santensis*.

Específicos

- Determinar a influência do peso corpóreo sobre a taxa de sobrevivência de *A. santensis* durante a exposição ao ar;
- Verificar alterações morfométricas, relacionadas ao comprimento lamelar, espessura lamelar e altura do espaço interlamelar, nas brânquias de *A. santensis* após a exposição ao ar por 7 dias, e sua recuperação em água;
- Avaliar a presença de alterações morfométricas na superfície da pele de *A. santensis* após a exposição ao ar por 7 dias, e sua recuperação em água.

Material & métodos

Coleta e manutenção dos animais

Os exemplares de *Atlantirivulus santensis*, com uma média de peso de $0,59 \pm 0,28$ g (média $\pm$ desvio padrão) 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 (Hogar, 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) Exemplos de *Atlantirivulus santensis* coletados na área de estudo.

Determinação da tolerância à exposição ao ar

Primeiramente foi realizado um teste para determinar a tolerância de *A. santensis* à exposição ao ar. Para tanto, utilizamos a metodologia descrita por Ong e colaboradores (2007) para avaliar a plasticidade de respostas à emersão em outras espécies de Rivulidae, como o *K. marmoratus*, utilizando uma câmara úmida controlada e individualizada (Ong et al., 2007; Turko et al., 2012). Neste teste, foram acondicionados individualmente quinze exemplares de *A. santensis* em câmaras fechadas (N=15), 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 (Figura 2). Esta câmara permaneceu fechada e os indivíduos foram observados diariamente, sendo mantidos em temperatura constante (temperatura aproximada do local de coleta), adicionando água ao substrato de algodão conforme a necessidade. A água foi depositada de forma que o substrato mantenha a câmara úmida, mas não permita que as brânquias de *A. santensis* sejam submersas ao longo do teste. Os animais foram mantidos em exposição ao ar por 7 dias (180 horas) e a sobrevivência dos indivíduos foi contabilizada durante o período. Os dados obtidos a partir da exposição ao ar e o peso dos indivíduos foram tabulados e realizada a análise estatística de regressão, com o intuito de verificar a influência do peso no tempo de sobrevivência.



Figura 2. Câmaras individualizadas durante o período de teste de exposição ao ar de *A. santensis*.

Avaliação das respostas morfométricas das brânquias e pele

Em seguida, foi realizado um teste para avaliar a plasticidade morfológica e peptidômica das brânquias e pele de *A. santensis* expostos ao ar. Nesse experimento 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 aclimação, um grupo experimental expostos 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 distribuídos igualmente entre os tratamentos). A exposição dos indivíduos ao ar foi realizada utilizando o mesmo protocolo descrito acima (Ong et al., 2007). Após atingir o tempo determinado de exposição a cada tratamento, os indivíduos foram anestesiados e eutanasiados em solução tamponada 0,2% de triclaína metanosulfato (MS-222), pesados e medidos. O mesmo procedimento foi realizado com os animais mantidos nos aquários do grupo controle. Após esse procedimento, as brânquias e amostras de pele dos animais foram removidas com auxílio de tesouras e pinças de inox, sendo uma parte das amostras fixadas em solução ALFAC (para 100ml: 85ml de álcool 80%, 10ml de formol e 5ml de ácido acético glacial) para as análises histológicas, enquanto a outra porção das amostras foram imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e mantidas em freezer -80°C até o momento das análises peptidômicas.

Análises histológicas

Para as análises histológicas, as brânquias foram emblocadas em Paraplast, cortadas em ultramicrotomo (5µm) e coloridas com Hematoxilina-Eosina para leitura em microscopia de luz. Para cada animal foram determinados três campos ópticos onde foram medidos a altura da massa

celular interlamelar (h), o comprimento da lamela (l) e a largura da lamela (w) (Ong et al., 2007). Já as amostras de pele, após a coloração, foram utilizadas para a determinação da espessura das camadas de derme e epiderme do epitélio cutâneo de *A. santensis*. A morfometria das amostras foi realizada a partir do Software AxioVision 2.0.®. As fotografias foram feitas através da câmera AxioCam Mrc5, acoplada a um microscópio óptico. As fotografias foram padronizadas em modelos de arestas, de forma que as imagens não se sobreponham em nenhuma fotografia. Para pele, as imagens foram feitas nas amostras verticais do tecido de forma que fosse possível visualizar a derme e a epiderme a partir da lente objetiva 100x, sendo realizadas 3 fotos por amostra. Para as brânquias, as amostras foram fotografadas da forma supracitada, a partir de uma lente objetiva 40x e foram registradas 5 fotos por amostra. Os dados obtidos foram tabulados para a análise estatística.

Para as análises histológicas, as brânquias foram emblocadas em Paraplast, cortadas em ultramicrotomo (5µm) e coloridas com Hematoxilina-Eosina para leitura em microscopia de luz. Para cada animal foram determinados três campos ópticos onde serão medidos a altura do espaço interlamelar (h), o comprimento da lamela (l) e a largura da lamela (w), determinando a área de superfície branquial segundo Ong e colaboradores (2007). Já as amostras de pele, após a coloração, serão utilizadas para a determinação da espessura do epitélio cutâneo de *A. santensis*.

Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas a partir do programa SigmaPlot. A relação entre peso e tolerância à exposição ao ar foi medida através de uma transformação logarítmica considerando uma escala exponencial, foi calculado a relação entre tempo de exposição ao ar (Y), e Peso (X), de acordo com a equação $Y = aW^b$, usando a transformação logarítmica ($\log Y = b \cdot \log W + \log a$). Diferenças entre os parâmetros morfométricos brânquias e a espessura das camadas cutâneas dos peixes expostos aos diferentes tratamentos foram analisados por meio de uma Análise de Variância de um fator, utilizando o teste a posteriori de Holm-Sidak ($P < 0,05$).

Resultados e discussão

A exposição ao ar pode ser considerada como hipóxia aguda, à qual causa uma cascata de efeitos fisiológicos (Cook et al., 2015). A figura 3 apresenta a relação entre o peso corpóreo e o

tempo de sobrevivência durante a exposição ao ar de indivíduos de *A. santensis*. Após o experimento foi possível observar um padrão na curva de sobrevivência em relação ao peso dos indivíduos, demonstrando que indivíduos com maior peso apresentam maior tolerância à exposição ao ar. Considerando uma escala exponencial, foi calculado a relação entre tempo de exposição ao ar (Y), e Peso (X), de acordo com a equação $Y = aW^b$, usando a transformação logarítmica ($\log Y = b \cdot \log W + \log a$). O coeficiente de relação entre peso e tolerância à exposição ao ar ($R^2 = 0,79$) obtido é forte. Assim, os resultados para o grau de tolerância à exposição ao ar relacionado ao peso indicam que quanto maior a massa do indivíduo maior a sua capacidade de sobrevivência ao estresse ambiental da emersão. Apesar de necessária a investigação específica, hipóteses sólidas sugerem que a maior quantidade de massa do indivíduo geralmente relaciona-se com a maior capacidade para a balancear o equilíbrio enzimático do metabolismo através de reservas lipídicas, utilizando-se da glicólise e outras atividades anaeróbicas, dessa forma gerando a energia necessária para a sobrevivência (Almeida-Val et al., 2000).

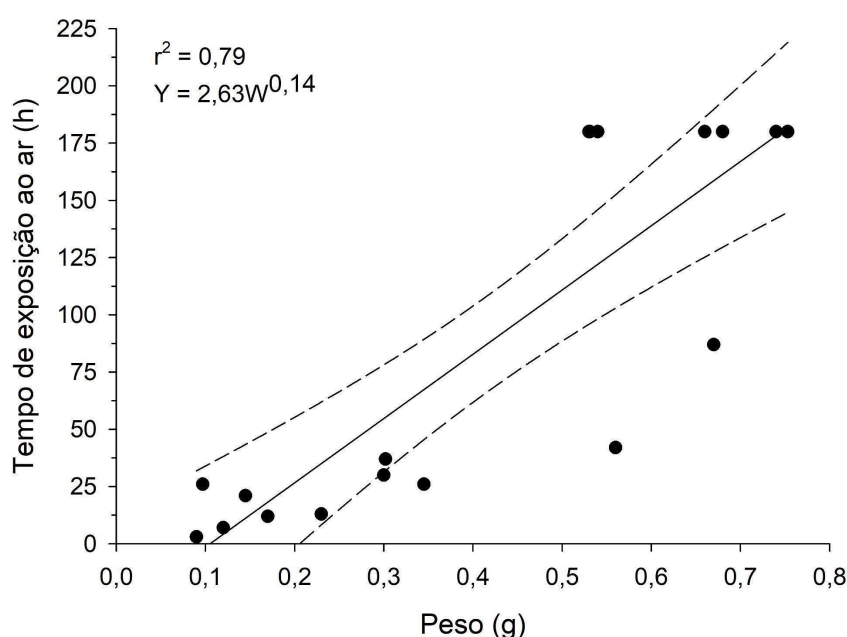


Figura 3. Relação entre peso (gramas) e tempo de exposição ao ar (horas) em *A. santensis*. O tempo de sobrevivência ao ar (Y) foi analisado em relação ao peso corpóreo (X) de acordo com a equação da regressão $Y = bX^a$, onde os valores de “a” e “b” foram calculados pelo software SigmaPlot 14.5. (N=18).

Em nossas análises foram observadas pronunciadas modificações na morfometria das brânquias e pele (Figura 4 e 5) de *A. santensis* após a exposição ao ar. A largura das lamelas secundárias não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos ($P = 0,078$) (Figura 4A). Por outro lado, o comprimento lamelar foi significativamente reduzido nos peixes expostos ao ar por 7 dias, em comparação com os animais do grupo controle e em recuperação por 7 dias em água ($P = 0,004$) (Figura 4B), indicando uma grande capacidade em remodelar o comprimento das lamelas secundárias em função das condições experimentais. Já a massa celular interlamelar (ILCM) dos peixes expostos ao ar foi significativamente aumentada em relação ao grupo controle ($P = 0,008$), enquanto nos animais em recuperação o ILCM não diferiu significativamente em relação aos demais tratamentos (Figura 4C). A figura 5 apresenta as fotomicrográfiás das brânquias de *A. santensis* expostos aos diferentes tratamentos, onde é possível observar as lamelas secundárias bem definidas e não fusionadas nos peixes do grupo controle, indicando uma alta área de superfície de troca com o meio externo (Figura 4A). Por outro lado, nos animais expostos ao ar é possível observar a perda da estrutura lamelar, com profunda proliferação da massa celular interlamelar e quase completa oclusão do espaço interlamelar (Figura 4B). Já nos peixes em recuperação foi observado o aumento do comprimento das lamelas secundárias, mas não a regressão do ILCM, sugerindo que a área de superfície respiratória estaria reduzida comparada aos animais do grupo controle (Figura 4C). Essa adaptação na morfologia branquial muito possivelmente surge como uma maneira de proteger as lamelas secundárias de exposição que podem causar danos às brânquias - ou seja, protegendo de ressecamento, corpos estranhos e patógenos - assim como ferramenta de sustentação branquial, permitindo que as lamelas secundárias se mantenham separadas e abertas de forma que as trocas gasosas necessárias para a respiração continuem.

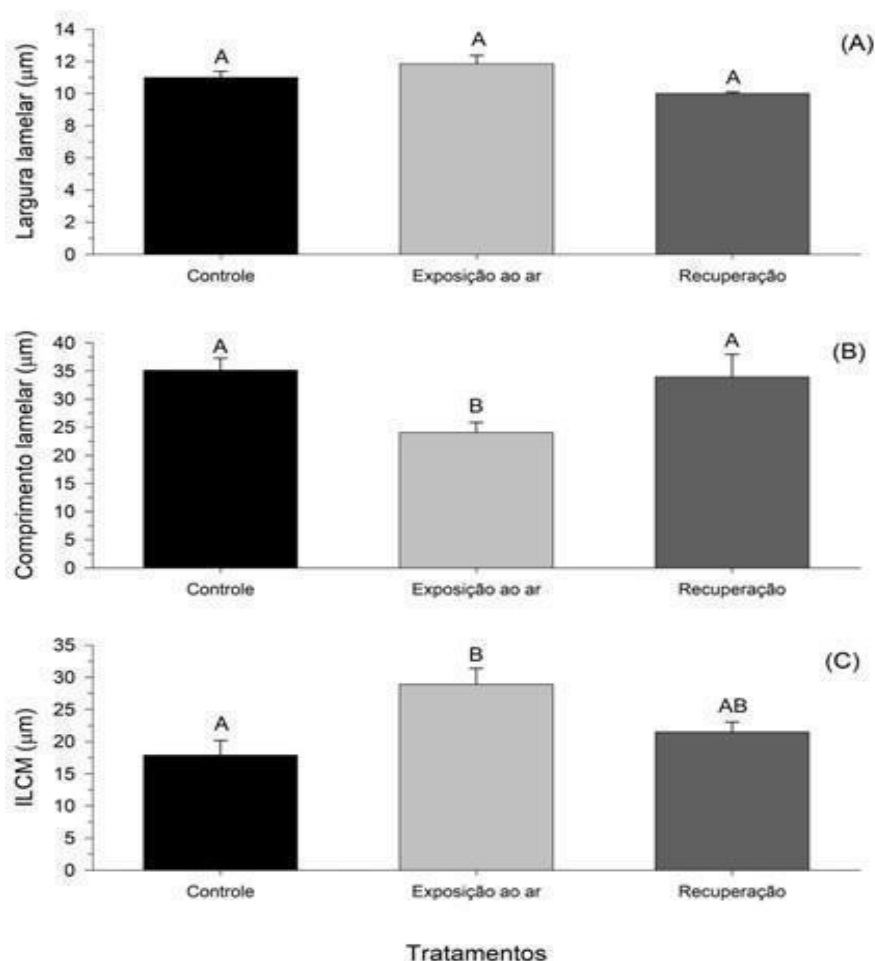


Figura 4. Respostas morfométricas lamelares das brânquias de *Atlantirivulus santensis* mantidos em água do riacho Panema (barras pretas), após exposição ao ar por 7 dias (barras cinza-claro) e recuperação por 7 dias em água (barras cinza-escuro). (A) largura das lamelas secundárias, (B) comprimento lamelar e (C) tamanho da massa celular interlamelar (ILCM). Letras diferentes representam diferenças estatísticas significativas nas medidas lamelares entre os tratamentos (Anova one way, Holm-Sidak com $P < 0,05$).

O remodelamento das brânquias é alvo de grande curiosidade dentro da fisiologia comparada por promover um ajuste dinâmico na morfologia tecidual como resposta às mudanças ambientais (Turko et al., 2017; Ong et al. 2007; Kimura et al. 2023). Contudo, esse processo é pouquíssimo estudado morfologicamente, principalmente quando tratamos de peixes Neotropicais. Atualmente, se sabe que uma das principais alterações morfofisiológicas que ocorrem em relação à morfologia branquial são alterações cartilaginosas e ósseas dos arcos

branquiais, alterações na área de superfície das lamelas e a mais representativa sendo alterações no ILCM (Interlamellar Cell Mass, ou Massa Celular Interlamelar), sendo considerado o “tipo clássico de remodelamento branquial”. O ILCM demonstrou alterações em 24 espécies dentro de 9 ordens, sendo considerada a capacidade de remodelamento branquial mais distribuída entre espécies (Gilmour, & Turko, 2024).

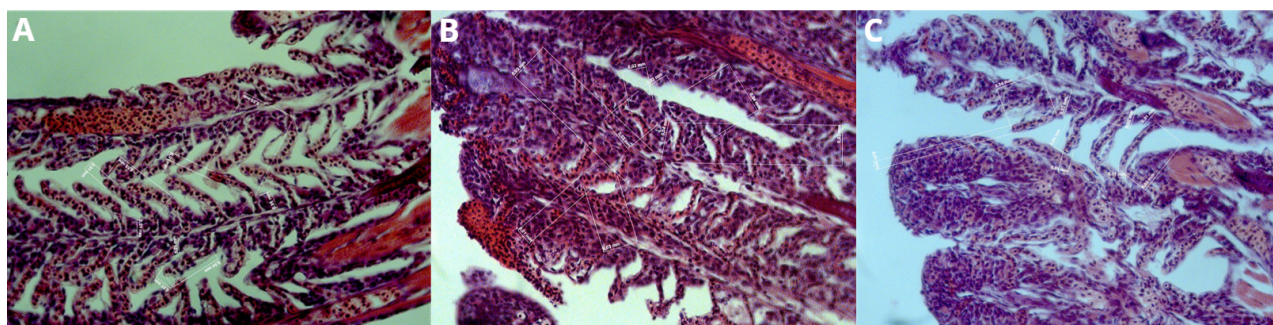


Figura 5. Amostras fotografadas em um microscópio óptico com uma lente objetiva 40x da lamela secundária de *A. santensis* nas três condições de aclimação: A - Aclimação na condição “controle”, indivíduos aclimatados em água com condições normais, B - Aclimação em exposição ao ar por 7 dias e C - Recuperação por 7 dias em água após 7 dias de exposição ao ar.

Apesar de essenciais para a sobrevivência desses indivíduos durante condições extremas, como a exposição ao ar, o remodelamento branquial parte de uma conjunta ação fisiológica, que busca alcançar o equilíbrio osmótico necessário para a sobrevivência, essa delicada dinâmica é definida como compromisso osmorregulatório. Wood & Randall (1973) definem como o principal desafio da estrutura branquial manter os níveis de O_2 enquanto minimiza a perda indesejável de íons e água. Alterações de grande impacto, como o remodelamento de tecidos, causam mudanças agudas no funcionamento geral dos órgãos impactados. O aumento do ILCM, por exemplo, apesar de prover maior suporte para a maior força gravitacional exercida sobre as brânquias, evitando que as lamelas colabem, também reduz a área de troca gasosa promovida pelo comprimento da lamela secundária. Sendo assim, este remodelamento trata-se de um sensível equilíbrio de necessidade e otimização fisiológica (Tzaneva et al. 2011).

Por exemplo, a espécie *Kryptolebias marmoratus* exposta por 7 dias ao ar demonstrou mudanças estruturais importantes categorizada como plasticidade branquial, sendo observado aumento significativo no ILCM – mas sem alterar o comprimento e largura das lamelas secundárias. Em conjunto, essas alterações estruturais de remodelamento branquial são entendidas como estratégias para prevenção do colapso e coalescência das lamelas secundárias, além de auxiliar na prevenção de perda de água pela superfície respiratória durante a emersão (Ong et al., 2007; Turko et al., 2017). Esses dados coincidem com os obtidos no nosso trabalho, demonstrando uma possível similaridade quanto aos mecanismos utilizados por *K. marmoratus* e *A. santensis* para a sobrevivência durante a exposição ao ar.

Em relação a pele, a epiderme apresentou diferença significativa em relação à morfometria ($P = 0,010$), sendo observado aumento significativo da espessura da epiderme nos peixes expostos ao ar, em comparação aos animais do grupo controle e recuperação. Por outro lado, a espessura da derme não apresentou diferença estatística significativa ($P = 0,517$) em nenhum dos tratamentos (Figura 6 e 7). Em *K. marmoratus*, foram observadas alterações na estrutura, indicando um remodelamento do tecido epitelial durante a exposição ao ar, com espessamento da epiderme dorsal e afinamento da derme ventral (Heffell et al., 2018; Dong, et. al, 2021). Segundo esses autores, quando a água fica indisponível e os peixes emergem, eles modificam a derme ventral, reduzindo sua espessura. Um afinamento da pele ventral reduziria a distância difusiva entre o corpo ventral e o substrato úmido, e o espessamento da epiderme dorsal faria o oposto auxiliando no controle das perdas evaporativas de água (Heffell et al., 2018). Estas alterações são um quadro aparentemente reversível onde, geralmente, o remodelamento cutâneo ocorre em uma perspectiva de equilíbrio osmótico para a otimização de transporte de íons e água pelos tecidos, sendo necessária uma proteção extra durante a exposição ao ar. Quando pensamos nas consequências fisiológicas para um indivíduo aquático que precisam ser superados para a sobrevivência na aclimação terrestre, a perda de água é um dos principais fatores a serem considerados. Pensando nisso, o espessamento da epiderme exercido provavelmente pela adição de colágeno no tecido deve ser exercido de forma rápida e eficaz, permitindo uma maior capacidade de retenção de água, ao mesmo passo que evita ressecamento durante a exposição ao ar, sendo uma estratégia vantajosa e observada amplamente em peixes anfíbios. (Dong et al., 2021; Wright, 2013).

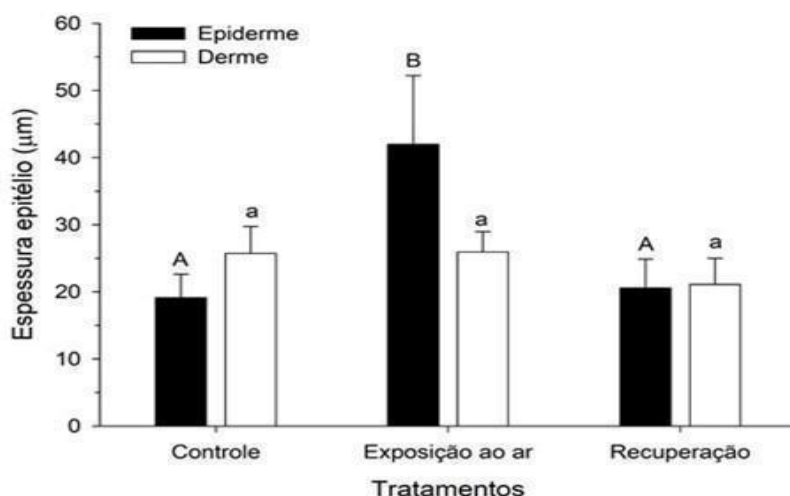


Figura 6: Espessura do epitélio muscular de *A. santensis* mantidos em água do riacho Panema, após exposição ao ar por 7 dias e recuperação por 7 dias em água. Barras pretas representam a espessura da epiderme, enquanto as barras brancas representam a derme. Letras maiúsculas diferentes representam diferenças estatísticas significativas na espessura da epiderme entre os tratamentos, enquanto letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas significativas na espessura da derme (Anova one way, Holm-Sidak com $P < 0,05$).

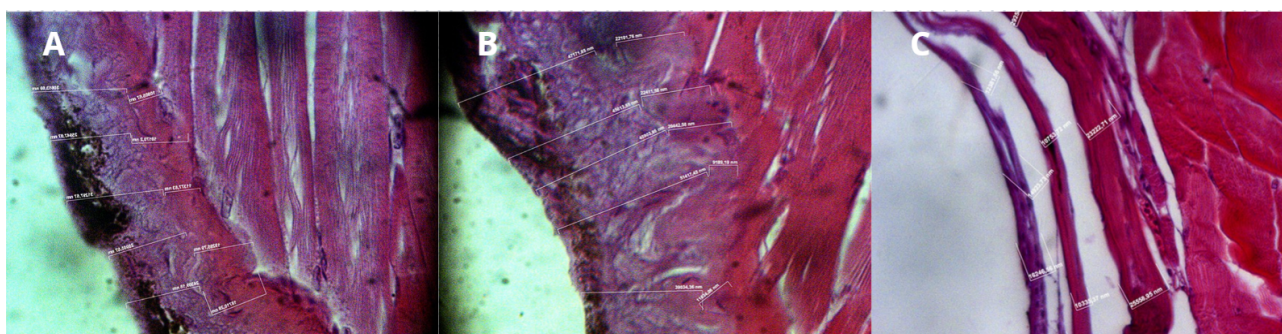


Figura 7. Fotografias ópticas na lente de aumento 100x da espessura da epiderme de *A. santensis*, sendo A - Tratamento controle (Aclimação de 7 dias na água), B - Tratamento de exposição (Aclimação de 7 em exposição ao ar em câmaras úmidas), e C - Recuperação de 7 dias na água após 7 dias de exposição

Conclusão

Foi observado uma forte correlação positiva entre o peso de *Atlantirivulus santensis* com o tempo de sobrevivência durante a emersão, onde indivíduos maiores apresentaram maior capacidade de sobrevivência em ambientes aéreos. Após a exposição ao ar por 7 dias *A. santensis* demonstrou grande habilidade de remodelagem dos epitélios branquiais e cutâneo à pressão encontrada no ambiente aéreo, como visto pela redução do comprimento lamelar e aumento da massa interlamelar branquial, e espessamento da epiderme. Em conjunto, essas respostas sugerem uma grande plasticidade nas respostas fisiológicas brânquias de *A. santensis* voltadas à emersão, tal como observado por diversos estudos conduzidos com a espécie *Kryptolebias marmoratus*, evidenciando também o papel da remodelagem cutânea que parece estar relacionada a evitar o ressecamento no ambiente terrestre e possível auxílio respiratório durante a exposição ao ar. Além disso, a espécie também demonstrou alta capacidade de recuperação ao estresse gerado pela emersão, apresentando características morfológicas dos tecidos branquiais e cutâneo similares ao observado nos animais do grupo controle mantido em água, corroborando com a hipótese de alta plasticidade morfofisiológica da espécie que é fundamental para a sua sobrevivência em ambientes aquáticos temporários.

Compreender as necessidades fisiológicas de *Atlantirivulus santensis* é essencial para a compreensão do estilo de vida único deste grupo. O grupo dos rivulídeos apesar de amplamente distribuídos pelo globo, possuem especificidades que corroboram com a delicadeza do ciclo de vida vivenciado pelas espécies, dessa forma sendo o único grupo de peixes que possuem um PAN específico para a sua preservação (O Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Peixes Rivulídeos Ameaçados de Extinção – PAN Rivulídeos) criticamente ameaçadas pela atividade humana. Preservar ambientes temporários como poças, pampas e alagados é essencial para a preservação dos ciclos necessários durante a vida desses indivíduos.

Referências Bibliográficas

- Almeida-Val VMF, Val AL, Duncan WP, Souza FCA, Paula-Silva MN, 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. Part B* 125, 219-226.
- Cook, K. V., Lennox, R. J., Hinch S. G., Cooke S. J. (2015), FISH Out of WATER: How Much Air is Too Much?, *Fisheries*, 40:9, 452-461
- Dong, Y., 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. *The company of Biologists*. Vol 224. doi:10.1242/jeb.235515
- Ferreira F. C., da Silva A. T., Gonçalves C.S., Petrere M. (2014) Disentangling the influences of habitat structure and limnological predictors on stream fish communities of a coastal basin, southeastern Brazil. *Neotrop Ichthyol* 12:177–186.
- 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 S. M., Boetius I., Evans D. H., McCarthy R., Oglesby L. C. (1969). Aspects of the physiology of terrestrial life in amphibious fishes I. The mudskipper, *Periophthalmus sobrinus*. *J Exp Biol* 50: 141- 149.
- Huber, J.H. (1996). Updated checklist of taxonomic names, collecting localities and bibliographic references of oviparous cyprinodont fishes (antherinomorpha, pisces). *Laboratoire d’Ichtyologie générale et appliquée, Muséum national d’Histoire naturelle*.
- Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., Fonseca, G. A. B., Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403:57–63.

- Martin, K.L. (2013). Theme and variations: amphibious air-breathing intertidal fishes. *J Fish Biol*, 84: 577-602.
- 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*.
- 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. Elsevier. Volume 2019, 10-18pp. <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). 2012. 63 f. 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>
- Turko, A. J., Earley, R. L., Wright, P. A. (2012), Behaviour drives morphology: voluntary emersion patterns shape gill structure in genetically identical mangrove rivulus. *Animal Behaviour*, Volume 82, Pages 39-47, <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2011.03.001>.
- 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*. Volume 34, 307-3014pp. <https://doi.org/10.1152/physiol.00012.2021>

- Urbina M. A., Meredith A. S., Glover C. N., Forster M. E. (2014). The importance of cutaneous gas exchange during aerial and aquatic respiration in galaxiids. *J Fish Biol.* 84(3):759-73. doi: 10.1111/jfb.12303
- Wilson, E. O. Introduction. In: Reaka, M. L.; Wilson, D. E. & Wilson, E. O. *Biodiversity II: understanding and protecting our biological resources.* Joseph Henry Press, Washington. Pp. 1-3.
- Wright, P. A. (2021). *Cutaneous respiration and osmoregulation in amphibious fishes.* Elsevier. Volume 253. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2020.110866>.
- Wright, P. A., Turko, A. J. (2016). Amphibious fishes: evolution and phenotypic plasticity. *Journal of Experimental Biology.* 219 (15): 2245–2259. <https://doi.org/10.1242/jeb.126649>
- Wright, P. A., Wood, C. M. (2009). A new paradigm for ammonia excretion in aquatic animals: role of Rhesus (Rh) glycoproteins. *Journal of Experimental Biology.* Volume 212, 2303–2312pp. <https://doi.org/10.1242/jeb.023085>.
- Ywamamoto, E. V. (2019). Revisão taxonômica e biogeográfica de *Atlantirivulus santensis* Köhler, 1906 (Rivulidae, Cyprinodontiformes). Repositório UNESP - Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, Botucatu.