

***Insights* sobre a conquista do mar pelos mamíferos: proteômica comparativa do rim de *Artocephalus australis* e *Canis lupus familiaris* e sua função na osmorregulação**

CAMILA MORAIS HIME

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY

RIBEIRO – UENF

MARÇO, 2024

Insights sobre a conquista do mar pelos mamíferos: proteômica comparativa do rim de *Artocephalus australis* e *Canis lupus familiaris* e sua função na osmorregulação

CAMILA MORAIS HIME

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Dr. Salvatore Siciliano

Coorientadora: Dr^a. Aline M. A. Martins

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF

MARÇO, 2024

Insights sobre a conquista do mar pelos mamíferos: proteômica comparativa do rim de *Artocephalus australis* e *Canis lupus familiaris* e sua função na osmorregulação

CAMILA MORAIS HIME

Dissertação apresentada ao Centro de Biociências e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em: 04 DE MARÇO DE 2024

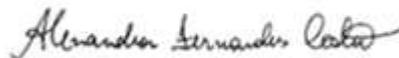
Comissão Examinadora



Dr. Maurício Tavares (Doutor em Biologia Animal) – UFRGS



Dr^a. Raphaela Menezes (Doutora em Patologia Molecular) – UNB



Dr^a. Alexandra Costa (Doutora em Ecologia Aquática) – Instituto Bicho D'água



Dr^a. Aline M. de A. Martins (Doutora em Biotecnologia) – Scripps Research –
Coorientadora



Dr. Salvatore Siciliano (Doutor em Ciências Biológicas) – UENF –
Orientador

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – (CAPES) – com a bolsa concedida pelo Código de Financiamento 001.

Ao meu orientador, Dr. Salvatore Siciliano pela oportunidade de realizar o meu trabalho em um excelente programa de pós-graduação.

À minha coorientadora Dr^a. Aline Martins pela confiança, dedicação e apoio durante a caminhada da pós-graduação. Também, por todo o suporte emocional e a parceria construída ao longo desses anos.

Aos meus pais por realizarem os meus sonhos comigo sempre com apoio e liberdade para percorrer os caminhos que escolho.

Ao Thiago, por sempre estar presente e me mostrar que posso ir além do que acredito ser capaz.

A todos que se empenharam para um trabalho que não era deles, especialmente Raphaela Menezes, Mickaella Martins, Reynaldo Melo e Davi Emanuel.

Aos amigos que fiz no Rio: Mayara (*in memoriam*), Mariane, Mariana, Raísa e Carlos pela amizade e carinho que desenvolvemos.

Aos amigos de Brasília, que dividem a vida comigo há tantos anos e sempre estão lá para me alegrar.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas da UnB, pela convivência e incentivo desde a iniciação científica. Em especial ao professor Carlos André, por me receber novamente e me ajudar tanto.

À equipe do Hospital Veterinário da UnB pelo apoio e contribuição na pesquisa, em nome do professor Márcio Botelho.

À equipe do CECLIMAR-UFRGS, pela contribuição e a oportunidade de novas experiências, e aos queridos Maurício Tavares, Derek, Rushell, Kayra, Seu Luiz e Lucas Kollet.

Ao meu pai, pela ajuda financeira para que eu pudesse realizar o melhor trabalho possível.

À Universidade Estadual do Norte Fluminense e seu corpo docente.

SUMÁRIO

Lista de figuras	i
Resumo	iii
Abstract	iv
1. Introdução	1
1.1. Um breve histórico sobre a evolução dos mamíferos marinhos	1
1.1.1. Adaptações no curso da evolução	1
1.1.2. Adaptações fisiológicas da função renal e osmorregulação	2
1.2. Comparação entre carnívoros	6
1.2.1. Filogenia dos carnívoros	6
1.2.2. Pinípedes no litoral do Rio Grande do Sul	7
1.3. Estudos moleculares	9
1.3.1. Genômica e proteômica nos estudos em mamíferos marinhos	9
1.3.2. Seleção e adaptação	10
1.4. A espectrometria de massas como ferramenta	11
1.4.1. Espectrometria de massas com mobilidade iônica	12
2. Objetivo	13
3. Hipótese	13
4. Materiais e Métodos	13
4.1. Desenho experimental	13
4.2. Local de coleta	14
4.3. População da pesquisa	16
4.3.1. Critérios de Inclusão	16
4.3.2. Critérios de Exclusão	16
4.4. Histologia dos tecidos renais	17
4.5. Preparo de amostras para espectrometria de massas	18
4.6. Quantificação de proteínas	18

4.7.	Digestão trípica de proteínas em solução	19
4.8.	Dessalinização de peptídeos	20
4.9.	Análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas	20
4.10.	Bioinformática	21
4.10.1.	DIA-NN	21
4.10.2.	MS-DAP.....	22
4.10.3.	Anotações funcionais.....	23
5.	Resultados.....	23
5.1.	Análise histológica dos tecidos	23
5.2.	Caracterização do perfil de proteínas.....	24
5.2.1.	<i>Canis lupus familiaris</i>	24
5.2.2.	<i>Arctocephalus australis</i>	26
5.2.3.	Comparação entre espécies	27
5.3.	Descrição das proteínas mais relevantes pelo DEqMS.....	35
6.	Discussão	40
7.	Conclusão.....	56
8.	Referências.....	56
ANEXO	64

Lista de figuras

- Figura 1.** Representação de rim A. não lobulado B. rim de *Arctocephalus australis* lobulado com falsos renículos. _____ 5
- Figura 2.** Filogenia da ordem Carnivora destacando os caníformes. Figura adaptada de Castelló (2018). _____ 7
- Figura 3.** Representação esquemática do fluxo de trabalho: (1) As amostras foram sistematicamente recolhidas de cachorros e lobos-marinhos (para este, seguindo o protocolo de degradação de Geraci e Lownsbury (1993). (2) Renículos e tecidos renais retirados da parte apical do rim direito. (3) Preparo de amostras para a proteômica de acordo com protocolos consolidados. (4) As proteínas fracionadas em gradientes de UHPLC e analisadas por LC-MS/MS. (5) Análise bioinformática feita a partir de softwares dedicados à proteômica. (6) Outras análises como mapas de interação e correlação ontológica (Gene Ontology – GO). _____ 14
- Figura 4.** Local de coleta. Mapa indicando as regiões litorâneas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram realizadas as coletas dos pinípedes. _____ 15
- Figura 5.** Corte histológico de rins coletados. HE. 10x. A. Renículo de *A. australis*. B. Tecido renal de *C. familiaris*. C. Glomeruloesclerose. D. Espessamento da cápsula de Bowman. E. Cilindros hialinos e glomeruloesclerose. F. Insuficiência Renal Crônica. _____ 24
- Figura 6.** Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de cachorros. Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra de cachorro quando comparado com banco de dados de cachorro. _____ 25
- Figura 7.** Anotações Gene Ontology (GO) nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse. _____ 25
- Figura 8.** Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de lobos-marinhos. Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra de lobo-marinho-sul-americano quando comparado com banco de dados de leão-marinho-da-Califórnia. _____ 26
- Figura 9.** Anotações Gene Ontology (GO) nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse. _____ 27
- Figura 10.** Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de lobos-marinhos (L42 a L68) e cachorros (C3 a C21). Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra quando comparado com banco de dados canino. _____ 28
- Figura 11.** Comparação do número de identificações de proteínas das duas espécies quando comparadas ao banco de dados de cachorro doméstico. _____ 30
- Figura 12.** Análise PCA (Principal Component Analysis) apresentando o agrupamento de amostras do mesmo lote experimental, excluindo a sensibilidade de um subconjunto pequeno de proteínas diferencialmente abundantes. _____ 30
- Figura 13.** Volcano plot da diferença de expressão de proteínas entre achados em lobos-marinhos em relação às amostras de cachorro. O gráfico mostra os pontos correspondentes a cada proteína, onde o eixo x representa o log₂ do fold change e o eixo y é o -log₁₀ do valor de p. Proteínas com fold change maior que 1 ou menor que -1 e p menor que 0.05 foram classificadas como UP (para cima: maior em lobos) ou DOWN (para baixo: maior em cachorros). _____ 31
- Figura 14.** Anotações GO para proteínas reguladas positivamente nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos das proteínas positivamente

reguladas em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris* utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse. _____ 32

Figura 15. A. Vias relacionadas à função biológica das proteínas reguladas positivamente em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris*. B. Rede de interação de termos enriquecidos. Legenda MCODE (Molecular Complex Detection) para a descrição de vias enriquecidas. _____ 33

Figura 16. Rede de interação proteína-proteína em relação à função molecular e componentes MCODE (Molecular Complex Detection) identificados pelas proteínas positivamente reguladas em *Arctocephalus australis* quando comparada com *Canis lupus familiaris*. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$). _____ 33

Figura 17. Anotações GO para proteínas reguladas positivamente nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos das proteínas negativamente reguladas em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris* utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse. _____ 34

Figura 18. A. Vias relacionadas à função biológica das proteínas reguladas negativamente em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris*. B. Rede de interação de termos enriquecidos. Legenda MCODE (Molecular Complex Detection) para a descrição de vias enriquecidas. _____ 34

Figura 19. Rede de interação proteína-proteína em relação à função molecular e componentes MCODE (Molecular Complex Detection) identificados pelas proteínas negativamente reguladas em *Arctocephalus australis* quando comparada com *Canis lupus familiaris*. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$). _____ 35

Figura 20. Via metabólica de glicose, lactato e piruvato, por meio da via da glicólise e gliconeogênese. E o metabolismo do ciclo do ácido cítrico. _____ 42

Figura 21. Ação do rim e do fígado na situação de jejum prolongado, onde o rim é um regulador ativo dos níveis plasmáticos de glicose e garante o fornecimento adequado de glicose para os glóbulos vermelhos, imunócitos e cérebro. _____ 43

Figura 22. Esquema da bradicardia no mergulho onde há um controle da vasoconstrição das artérias e o fluxo sanguíneo é redirecionado para órgãos vitais, incluindo cérebro, coração e glândulas suprarrenais. _____ 50

Figura 23. Esquema da geração de espécies reativas de oxigênio a partir da hiperosmolaridade, a atividade da NADH oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial. _____ 54

Resumo

A osmorregulação é essencial para a sobrevivência dos mamíferos marinhos, que enfrentam desafios significativos ao viver em ambientes hipersalinos. Suas adaptações incluem rins reniculados e estratégias para minimizar a ingestão de água salgada, com a maioria da água vindo de fontes metabólicas e dietéticas. Por isso, o rim desses animais representa um importante órgão a ser estudado para a compreensão dos mecanismos moleculares desse processo. Na amostragem e preparação, as amostras de rins de *Arctocephalus australis* e *Canis lupus familiaris* foram cuidadosamente coletadas e preparadas para a análise proteômica. As proteínas foram extraídas e os peptídeos foram obtidos por digestão triptica. Em seguida, as amostras foram submetidas à análise utilizando o sistema Evosep, um sistema de cromatografia líquida de ultra-alto rendimento (UHPLC) acoplado a um espectrômetro de massas timsTOF Pro 2 (Bruker Daltonics). As análises estatísticas foram feitas com auxílio dos *softwares* DIA-NN, RStudio e ferramentas *on-line*. Investigamos o perfil proteômico renal de *Canis lupus familiaris* e *Arctocephalus australis*, utilizando a biblioteca espectral gerada a partir dos dados do timsTOF Pro 2. A exploração do perfil proteômico renal dessas espécies revelou diferenças significativas na expressão proteica. A análise diferencial destacou as proteínas QDPR, LOC119870648, RTCB, PRDX5, BPNT1, RBP1, TKFC, HNRNPAB, ADSS1 e PTGR3, como as dez mais importantes. Estas proteínas e as vias metabólicas correlatas foram divididas em quatro tópicos de discussão, abordando o contexto renal dos animais marinhos e como as adaptações discutidas proporcionam *insights* sobre a evolução da osmorregulação em mamíferos marinhos. Além disso, os resultados demonstram a importância dos efetores moleculares na adaptação evolutiva e modulação gênica e estabelecem uma base sólida para investigações futuras sobre os mecanismos do sistema renal de mamíferos marinhos. Essas descobertas representam contribuições significativas para a compreensão das estratégias adaptativas complexas dos mamíferos marinhos diante de condições ambientais osmoticamente estressantes e destacam a relevância do rim na conquista do ambiente marinho.

Abstract

Osmoregulation is essential for the survival of marine mammals facing significant challenges in hypersaline environments. Their adaptations include reniculated kidneys and strategies to minimize saltwater intake, with the majority of water sourced from metabolic and dietary sources. Therefore, the kidneys of these animals are crucial organs for studying the molecular mechanisms of this process. During sampling and preparation, kidney samples from *Arctocephalus australis* and *Canis lupus familiaris* were meticulously collected and processed for proteomic analysis. Proteins were extracted, and peptides were obtained through trypsin digestion. Subsequently, the samples were analyzed using the Evosep system, an ultra-high-performance liquid chromatography (UHPLC) coupled with a timsTOF Pro 2 mass spectrometer (Bruker Datonics). Statistical analyses were conducted using DIA-NN, RStudio, and online tools. We investigated the renal proteomic profile of *Canis lupus familiaris* and *Arctocephalus australis*, utilizing the spectral library generated by the data from timsTOF Pro 2. The exploration of the renal proteomic profile of these species revealed significant differences in protein expression. The differential analysis highlighted the proteins QDPR, LOC119870648, RTCB, PRDX5, BPNT1, RBP1, TKFC, HNRNPAB, ADSS1, and PTGR3 as the top ten effectors. These proteins and related metabolic pathways were divided into four discussion topics, addressing the renal context of marine animals and how the discussed adaptations provide insights into the evolution of osmoregulation in marine mammals. Furthermore, the results demonstrate the importance of molecular effectors in evolutionary adaptation and gene modulation, establishing a solid foundation for future investigations into the mechanisms of the renal system in marine mammals. These findings contribute significantly to understanding the complex adaptive strategies of marine mammals in osmotically stressful environmental conditions and underscore the relevance of the kidney in conquering the marine environment.

1. Introdução

1.1. Um breve histórico sobre a evolução dos mamíferos marinhos

1.1.1. Adaptações no curso da evolução

1 As adaptações morfológicas e fisiológicas são mecanismos fundamentais para
2 a sobrevivência e sucesso reprodutivo dos organismos ao longo do processo
3 evolutivo. Essas adaptações podem ocorrer em diversos níveis de organização
4 biológica, como é o caso da morfologia e fisiologia de órgãos e sistemas. As
5 adaptações morfológicas referem-se às modificações na forma e estrutura do corpo
6 dos organismos, enquanto adaptações fisiológicas referem-se às modificações em
7 processos químicos e físicos no interior do organismo, permitindo que eles se
8 adaptem a diferentes condições ambientais.

9 Na evolução dos vertebrados, a transição da água para a terra é considerada
10 como tendo ocorrido apenas uma única vez, enquanto as transições da terra para a
11 água são mais frequentes (Vermeij e Motani, 2018; Farina et al., 2023). As adaptações
12 aquáticas em mamíferos evoluíram independentemente em diferentes graus em
13 várias linhagens. Mamíferos aquáticos são, por definição, animais que têm como
14 *habitat* a água, ou dependem dela para sobreviver. Sendo totalmente aquáticos, ou
15 semi-aquáticos, respectivamente (Pough et al., 2008). Para mamíferos, com apenas
16 duas exceções (*Ornithorhynchus anatinus* e *Chironectes minimus*), todas as
17 adaptações aquáticas ocorreram para os placentários (Farina et al., 2023).

18 A adaptação semi-aquática ocorre em seis ordens diferentes: Monotremata
19 (monotremados), Didelphimorphia (gambás), Afrosoricida (toupeiras-douradas e
20 tenrecos), Eulypotyphla (insetívoros), Carnivora (carnívoros) e Rodentia (roedores).
21 Para as espécies totalmente aquáticas são quatro linhagens distintas: pinípedes da
22 ordem Carnivora (morsa, leões-marinhos, lobos-marinhos e focas) e a lontra-marinha
23 (*Enhydra lutris*); Sirenia (peixes-boi e dugongos); e Cetacea (botos, baleias e
24 golfinhos) da ordem Cetartiodactyla (Thewissen e Bajpai, 2001; Berta, 2018; Farina et
25 al., 2023). De acordo com as descobertas de Farina et al. (2023), embora seja difícil
26 determinar as relações causais e o momento exato do surgimento de diferentes
27 características adaptativas, as adaptações aquáticas em mamíferos estão associadas
28 a tamanhos corporais relativamente maiores. Essa associação pode ser explicada
29 pela influência das restrições de termorregulação e pela dieta mais carnívora.

30 Ademais, algumas das adaptações morfológicas dos mamíferos marinhos são:
31 (1) a perda gradual dos membros posteriores. Cetáceos e sirênios possuem
32 nadadeiras e caudas propulsoras, para permitir um movimento mais fluido na água.
33 As focas, lobos e leões-marinhos têm apenas nadadeiras dianteiras e patas traseiras,
34 que podem ser usadas para andar ou se arrastar na terra; (2) o formato do corpo
35 hidrodinâmico, para permitir movimentos rápidos e ágeis com mínima resistência à
36 água; (3) a ausência ou redução de pêlos e o espessamento da camada de gordura
37 subcutânea, conhecida como *blubber*, que os ajuda a manter o calor corporal,
38 armazenar energia para períodos de escassez de alimentos e na flutuabilidade; (4) a
39 evolução de um sistema respiratório que permite longos mergulhos; e (5) o sistema
40 esquelético com costelas flexíveis para a otimização do sistema respiratório
41 proporcionando maior flexibilidade e colapso dos pulmões; e o tecido espesso no
42 ouvido médio pode suportar a elevada pressão em grandes profundidades (Spoor et
43 al., 2002; Berta et al., 2006; Thewissen et al., 2007; Uhen, 2007; Pough et al., 2008;
44 Wursig e Perrin, 2009; Berta, 2017; Farina et al., 2023).

45 Diversas adaptações fisiológicas também merecem destaque, como: (1) a
46 capacidade de controlar a pressão sanguínea durante mergulhos profundos; (2) a
47 capacidade de armazenar oxigênio em órgãos e músculos durante mergulhos; (3) um
48 mecanismo de termorregulação que permite a manutenção da temperatura corporal;
49 e (4) as adaptações renais para a tolerância aos níveis de sal (Kooyman e Ponganis,
50 1998; Berta et al., 2006; Pough et al., 2008; Kooyman, 2009; Wursig e Perrin, 2009;
51 Berta, 2017; Fahlman et al., 2017).

1.1.2. Adaptações fisiológicas da função renal e osmorregulação

52 Há aproximadamente 50 milhões de anos (Gatesy e O'Leary, 2001; Thewissen
53 et al., 2007), os mamíferos encontraram no estresse osmótico um grande obstáculo a
54 ser enfrentado (Rash e Lillywhite, 2019; Ruan et al., 2015). As transições de sistemas
55 terrestres ou de água doce para sistemas marinhos muitas vezes passavam por
56 *habitat* estuarinos, que proporcionavam ainda acesso à água doce. A partir disso, as
57 radiações adaptativas a *habitat* totalmente marinhos acabaram sendo restringidas por
58 essa necessidade de acesso à água doce e pela dificuldade da adaptação da fisiologia
59 a diferentes fontes de água, que não as de habitual obtenção (Rash e Lillywhite, 2019).

60 A maioria dos mamíferos marinhos é hiposmótico em relação à água do mar
61 (Pedro et al., 2015), e assim como para os animais terrestres, a ingestão de água do
62 mar os deixa em constante risco de desidratação por gerar um aumento na excreção
63 de água e soluto, resultando na perda da água corporal (Ortiz, 2001; Ridgway e Venn-
64 Watson, 2010; Rash e Lillywhite, 2019). A homeostase fisiológica então se torna
65 crucial para a sobrevivência dos mamíferos marinhos e depende da regulação do
66 volume, distribuição e composição iônica da água no organismo (Hochachka e
67 Somero 2002).

68 Esses atributos são mantidos por um equilíbrio adequado dos fluxos de água
69 entre o organismo e o ambiente, pois a osmorregulação é essencial para manter o
70 equilíbrio homeostático em um ambiente com alta concentração de sal. As respostas
71 à desidratação variam entre os diferentes grupos, mas geralmente são mais rápidas
72 em animais endotérmicos (Rash e Lillywhite, 2019) e, qualquer interrupção nesse
73 sistema de controle pode resultar em um desequilíbrio interno e até mesmo causar a
74 morte do animal (Xu et al., 2013).

75 Mamíferos e aves marinhas não bebem água salgada rotineiramente, apenas
76 quantidades mínimas de água do mar são ingeridas com os alimentos e absorvidas
77 do vapor d'água no ar exalado, tendo assim apenas água molecular disponível para o
78 funcionamento de seu metabolismo (Fetcher, 1939; Ortiz, 2001; Pough et al., 2008).
79 Ao contrário de muitos outros vertebrados aquáticos (peixes, répteis e aves marinhas),
80 os mamíferos não possuem glândulas salinas excretoras dedicadas ao auxílio da
81 manutenção da homeostase (Fetcher, 1939). Por isso, o equilíbrio hídrico em
82 mamíferos totalmente marinhos é atribuível à água metabólica e dietética (Fetcher,
83 1939; Ortiz, 2001; Ridgway e Venn-Watson, 2010; Rash e Lillywhite, 2019).

84 Como extrair a água necessária da água salgada por ingestão é
85 fisiologicamente custoso, essa não parece ser a estratégia adotada pelos mamíferos,
86 a não ser em caso de extrema desidratação ou estresse térmico (Ortiz, 2001; Costa,
87 2018). Além disso, a adaptação a longos períodos de jejum demonstram a capacidade
88 osmorregulatória dos mamíferos marinhos, pois a manutenção do equilíbrio hídrico e
89 eletrolítico durante jejum de alimentos e água requer o desenvolvimento de
90 mecanismos para conservação dos sais e da água a fim de manter a homeostase
91 interna (Ortiz, 2001; Atkinson et al., 2009; Costa, 2018).

92 Nos mamíferos em geral, os rins funcionam como o principal órgão responsável
93 pela excreção da água ingerida e produzida metabolicamente, dos sais e resíduos
94 nitrogenados. Internamente, o rim dos mamíferos é dividido em uma região externa
95 conhecida como córtex, que envolve uma região interna chamada medula. A medula
96 renal desempenha um papel crucial na produção de urina concentrada de sal
97 originário do filtrado glomerular cortical por meio das longas alças de Henle. Portanto,
98 quanto mais longa for a alça na região medular, maior é a capacidade do rim de
99 concentrar sais. Em mamíferos terrestres, a espessura relativa da medula tem sido
100 associada à capacidade de concentração máxima da urina, tornando-se um indicador
101 anatômico dessa capacidade (Beuchat, 1996).

102 Slijper (1958) descreveu os rins dos mamíferos marinhos como relativamente
103 grandes em comparação a outros mamíferos, dando destaque a importância dos rins
104 desses animais na osmorregulação, na eliminação de metabólitos nitrogenados e no
105 controle da pressão sanguínea. Além disso, acredita-se que o rim lobulado, ao
106 encurtar os ductos renais para reduzir a interferência da pressão elevada com o fluxo
107 da urina, também seja resultado da adaptação renal em relação ao aumento do corpo
108 e ao comportamento de mergulho (Pfeiffer, 1997; Maluf e Gassman, 1998; Ortiz,
109 2001).

110 Os cetáceos e pinípedes possuem rins reniculados (Fig. 1) semelhantes aos
111 dos ursos e lontras, enquanto nos sirênios, o rim é considerado superficialmente
112 lobulado com córtex contínuo, pois não possui renículos verdadeiros (Maluf, 1989).
113 No geral, cada renículo possui características anatômicas e funcionais de um rim,
114 geralmente inseridos em um único cálice e agrupados dentro da cápsula renal (Suzuki
115 et al., 2008; Sarmiento et al., 2012) sendo caracterizados por quatro componentes
116 principais: medula (ou região medular), córtex renal, papila e cálice, tendo irrigação
117 independente e podendo filtrar, concentrar, coletar e transportar urina, como é
118 encontrado em mamíferos terrestres (Tettamanti et al., 2004; Sarmiento et al., 2012).

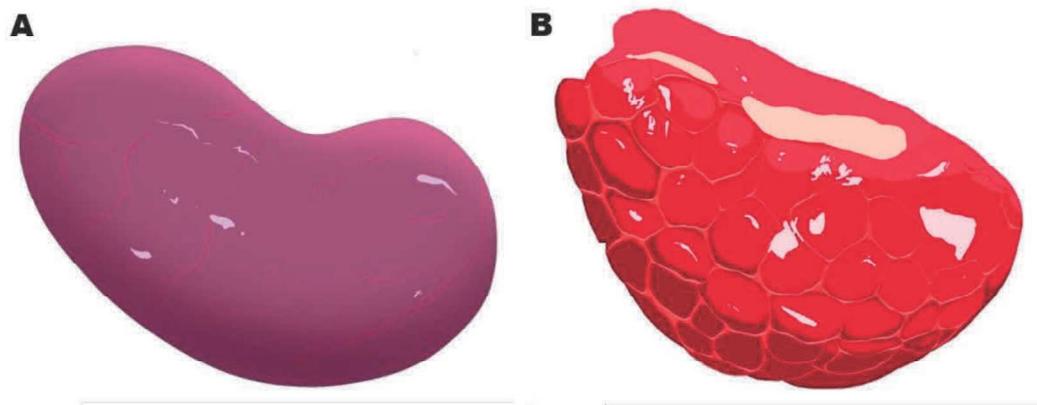


Figura 1. Representação de rim A. não lobulado B. rim de *Arctocephalus australis* lobulado com falsos renículos.

119 Devido à sua morfologia reniculada e ao aumento da espessura medular, os
120 rins desempenham um papel fundamental na excreção de sal e na conservação de
121 água (Hedges et al., 1979), e as características morfológicas dos rins como o tamanho
122 e as centenas de renículos (Bester, 1975; Vardy e Bryden, 1981; Maluf e Gassman,
123 1998), estão associadas à capacidade de reter água. A maior quantidade de renículos
124 parece ser um dispositivo evolutivo direcionado para garantir a quantidade máxima de
125 córtex renal e o número máximo de néfrons, sem a inconveniência de um rim grande
126 (Cave, 1967).

127 Esta característica torna esse tipo de rim uma estrutura singular, porém,
128 segundo Bester (1975), ainda sem a capacidade de concentrar urina e eletrólitos
129 compatível com suas características anatômicas. A espessura medular é necessária
130 para produzir uma urina altamente concentrada, resultando na excreção do excesso
131 de sal, reduzindo assim a perda de água (Ortiz, 2001; Berta et al., 2006). Há
132 considerável variabilidade interespecífica na espessura do córtex, mas nenhuma
133 evidência convincente de que essa variabilidade esteja relacionada ao *habitat*
134 (Beuchat, 1996).

135 Até o momento, os estudos sobre os mecanismos osmorregulatórios têm se
136 concentrado na estrutura renal (Bester, 1975; Hedges et al., 1979; Pfeiffer, 1997;
137 Vardy e Bryden, 1981; Sarmiento et al., 2012), nas concentrações de íons no soro e
138 na urina (Beuchat, 1996; Birukawa et al., 2005; Smoll et al., 2020) e nos experimentos
139 de beber, jejuar e pós alimentação (Ortiz, 2001; Ortiz et al., 1998, Ortiz et al., 2002,

140 Ortiz et al., 2003, Ortiz et al., 2006, Ortiz et al., 2007, Ortiz et al., 2010; Ridgway e
141 Venn-Watson, 2010).

142 Esses estudos contribuíram significativamente para a compreensão da
143 regulação de água e eletrólitos e da função renal em mamíferos marinhos. No entanto,
144 a base molecular dos mecanismos osmorregulatórios ainda é pouco explorada e
145 compreendida, especialmente em relação à adaptação desses animais aos diferentes
146 ambientes marinhos. E embora os estudos citados possam ter abordado aspectos
147 fisiológicos e bioquímicos da osmorregulação em diferentes espécies de mamíferos
148 marinhos, eles ainda não fornecem uma compreensão completa dos mecanismos
149 moleculares subjacentes.

1.2. Comparação entre carnívoros

150 Para um estudo sistemático e descritivo da base molecular da osmorregulação
151 em mamíferos marinhos quando comparados com mamíferos terrestres, foram
152 escolhidos o cão doméstico *Canis lupus familiaris* Linnaeus, 1758 e o lobo-marinho-
153 sul-americano *Arctocephalus australis* (Zimmermann, 1783), uma vez que essa
154 espécie poderia ser considerada como um grupo modelo da ordem Carnivora para
155 estudos de biologia comparada (Higdon et al., 2007; Hassanin et al., 2021; Tian et al.,
156 2021), e linhas de culturas de células de rim canino (MDKC) são amplamente
157 utilizadas para estudos que abrangem a osmorregulação de mamíferos como em
158 Sheikh-Hamad et al., (1997) e Kwon et al., (1995).

1.2.1. Filogenia dos carnívoros

159 A ordem Carnivora é composta por 296 espécies existentes, atualmente
160 divididas em duas subordens. Uma delas é a Caniformia (Fig. 2), que inclui nove
161 famílias, incluindo Canidae (espécies semelhantes a cães) e Otariidae (lobos e leões-
162 marinhos) (Hassanin et al., 2021). Tradicionalmente, a classificação biológica
163 baseava-se em critérios morfológicos e comportamentais, separando carnívoros
164 terrestres e aquáticos. No entanto, descobertas bioquímicas mostraram que os
165 pinípedes, carnívoros adaptados à vida aquática, compartilham uma origem comum
166 com os carnívoros terrestres (Wynen et al., 2001).

167 Nesse contexto, a escolha de comparar cães com lobos-marinhos apresenta
168 uma grande oportunidade de explorar as relações evolutivas entre as proteínas de
169 carnívoros terrestres e aquáticos (Fig. 2). Porém, o lobo-marinho-sul-americano,

170 embora seja alvo de estudos de diversas áreas, carece significativamente de
171 investigações moleculares aprofundadas. A ausência de um proteoma disponível para
172 a espécie traz a necessidade de abordagens diferentes para compreender suas
173 relações evolutivas.

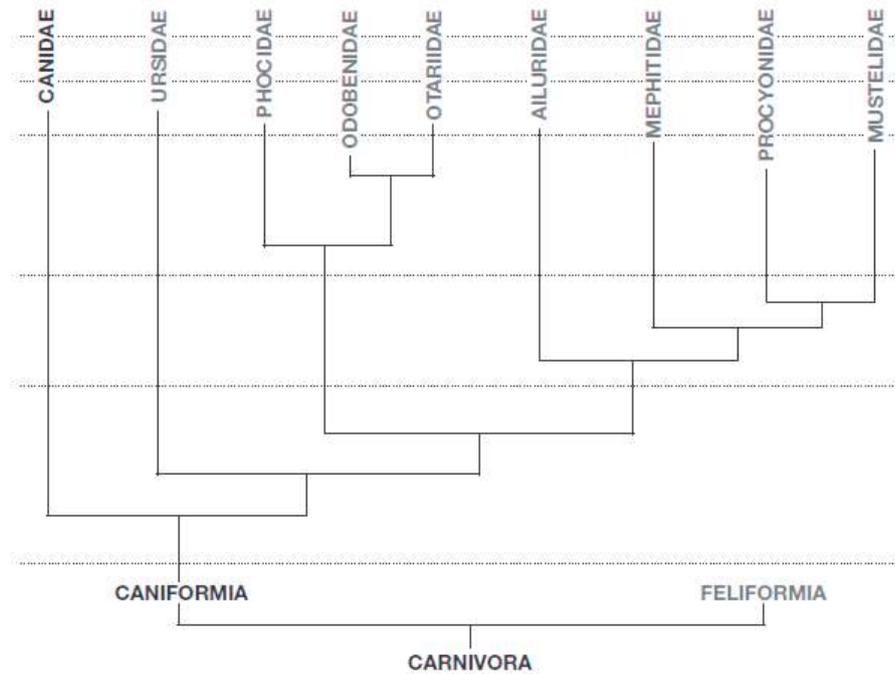


Figura 2. Filogenia da ordem Carnivora destacando os caníformes. Figura adaptada de Castelló (2018).

174 Portanto, a escolha estratégica de utilizar os dados moleculares de leões-
175 marinhos-da-Califórnia *Zalophus californianus* (Lesson, 1828) no estudo se deu por
176 ser um otarídeo próximo do lobo-marinho-sul-americano com o proteoma disponível
177 mais completo. Essa proximidade filogenética comprovada em artigos (Wynen et al.,
178 2001; Berta et. al, 2006; Higdon et al., 2007; Mead, 2019; Hassanin et al., 2021) pode
179 estabelecer uma base sólida para compreender algumas alterações proteômicas
180 dentro da ordem Carnivora como um todo.

1.2.2. Pinípedes no litoral do Rio Grande do Sul

181 O grupo dos pinípedes possui espécies de mamíferos que habitam ambientes
182 marinhos e terrestres em todo o mundo. Eles são classificados em três famílias:
183 Otariidae (lobos-marinhos e leões-marinhos), Phocidae (focas verdadeiras) e
184 Odobenidae (morsas). Parte do ciclo de vida dos pinípedes, como a alimentação,
185 ocorre na água, enquanto outra parte, como a reprodução, troca de pêlos e descanso,
186 ocorre em terra (Boyd et al., 2010; Berta, 2018).

187 No Brasil, muitos pinípedes são encontrados principalmente no litoral do Rio
188 Grande do Sul (RS). Devido à sua localização geográfica, o litoral do RS recebe muitos
189 indivíduos, principalmente de leão-marinho-do-sul (*Otaria flavescens*) e de lobo-
190 marinho-sul-americano. Durante o inverno, a Ilha dos Lobos abriga a maior
191 concentração desses animais, que a utilizam como local de repouso e alimentação

192 Os indivíduos são migrantes oriundos das colônias de reprodução no Uruguai
193 e visitam o litoral do RS anualmente mais comumente entre Julho e Outubro
194 (Cárdenas-Alayza, 2018). É época em que também são encontrados grande número de
195 espécimes mortos, geralmente jovens de primeiro ano de vida com uma massa abaixo
196 da média esperada para o tamanho (Silva et al., 2014). O aparecimento das carcaças
197 desses animais segue padrões bem definidos ao longo das estações do ano e é
198 bastante comum. Além disso, grande parte é resultado de causas naturais que afetam
199 os animais (Tavares et al., 2021).

200 O lobo-marinho-sul-americano, pertencente ao gênero *Arctocephalus*,
201 considerado o mais diverso dentre os otarídeos. Como outros membros desse grupo,
202 são sexualmente dimórficos e se reproduzem em terra, são sociáveis e costumam
203 viver em grupos, tanto na água quanto na terra (Cárdenas-Alayza, 2018). O nome de
204 sua espécie "australis" refere-se à sua distribuição em ambientes costeiros e
205 oceânicos da América do Sul, incluindo o Brasil (Pavés et al., 2016; Cárdenas-Alayza,
206 2018; Heckel & Schramm, 2021;). Eles apresentam uma dieta diversa que inclui
207 peixes, lulas e crustáceos (Berta, 2018; Cárdenas-Alayza, 2018). Esses animais
208 apresentam adaptações para a vida marinha como as modificações corporais e os
209 rins reniculados.

210 A espécie de interesse neste trabalho, o lobo-marinho-sul-americano, evoluiu
211 de ancestrais terrestres durante o período do Mioceno, cerca de 20-30 milhões de
212 anos atrás (Rybczynski et al., 2009; Berta, 2017, 2018). Estudos anteriores sobre
213 esses animais são numerosos e focados em áreas muito diferentes (Bester, 1975;
214 Vardy e Bryden, 1981; Ortiz, 2001; Le Bas, 2003; Beck et al., 2007; Higdon et al.,
215 2007; Atkinson et al., 2009; Rybczynski et al., 2009; Churchill et al., 2014; Fahlman et
216 al., 2017; Rash e Lillywhite, 2019; da Silva et al., 2020; Martín-Orti et al., 2022;
217 Molpeceres-Diego et al., 2023), mas ainda não há referências em relação à evolução
218 de seus sistemas de ormorregulação. A maioria do conhecimento sobre esses animais
219 é baseado em necropsias de animais encalhados ou mantidos em cativeiro. No

220 entanto, estudos moleculares da espécie, como sequenciamento de genomas e
221 caracterização de proteomas ainda são escassos, principalmente pela dificuldade de
222 obtenção e armazenamento de amostras.

1.3. Estudos moleculares

1.3.1. Genômica e proteômica nos estudos em mamíferos marinhos

223 A área da genômica evolutiva tem experimentado avanços significativos nas
224 últimas décadas, graças ao desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento e
225 análise de DNA. Desde a descoberta da estrutura do DNA em 1953, o número de
226 estudos genômicos publicados aumentou rapidamente, o que estimulou melhorias nas
227 abordagens moleculares e de bioinformática (Baer e Millar, 2016). Esses avanços
228 permitiram a geração e análise de uma grande quantidade de dados genômicos a
229 partir de um único fragmento do genoma, possibilitando a identificação de genes
230 responsáveis por características específicas e, assim, contribuindo para a
231 compreensão da evolução e diversidade biológica.

232 Nos últimos anos, a genômica evolutiva tem sido particularmente importante
233 para o estudo da evolução dos cetáceos. A descoberta de fósseis de mamíferos
234 terrestres que compartilhavam características com os cetáceos modernos levantou
235 questões sobre a origem desses animais. Dentre esses fósseis, alguns como o
236 *Pakicetus* (Gingerich et al., 1983) e o *Rodhocetus* (Gingerich et al., 1994)
237 apresentavam características exclusivas das baleias e dos *Artiodactyla* (mamíferos de
238 dedos pares). Estudos moleculares (Milinkowitch et al., 1993) foram capazes de
239 fornecer evidências genéticas da relação entre os artiodáctilos e os cetáceos, mesmo
240 quando as semelhanças físicas entre eles eram mínimas.

241 Além disso, contribuíram para diversas descobertas em relação às múltiplas
242 adaptações morfológicas e fisiológicas que permitiram a exploração de diferentes
243 nichos na transição da terra para a água. Por exemplo, as mudanças de expressão
244 do gene *Homeobox* (*Hox*) e sua regulação em mamíferos totalmente aquáticos e, em
245 cetáceos, alguns genes como o *Sonic hedgehog* (*Shh*), que estão relacionados com
246 a redução dos membros posteriores em tetrápodes, gradualmente deixou de ser
247 expresso na linhagem assim como mudanças nos receptores tipo Toll (TLRs)
248 associadas a diferenças na resposta imune dessas espécies em comparação com

249 espécies terrestres (Foote et al., 2015; Nery et al., 2016; Tian et al., 2019; Farina et
250 al., 2023).

251 O desenvolvimento de abordagens genéticas moleculares no início dos anos
252 1990 e de métodos ômicos após os anos 2000 incentivou ainda mais estudos
253 moleculares de cetáceos para abordar questões fundamentais de evolução, ecologia
254 e comportamento. A crescente utilização de métodos moleculares na pesquisa com
255 cetáceos é um reflexo da importância dessas abordagens na compreensão da
256 genética da adaptação. No entanto, para uma compreensão mais completa da
257 genética da adaptação, é necessário não apenas identificar os genes e vias genéticas
258 envolvidas, mas também incluir análises de diferentes biomoléculas efetoras,
259 associadas a dados ambientais e comportamentais. Essa abordagem mais ampla
260 permitirá uma compreensão mais completa da evolução e adaptação dos organismos,
261 contribuindo para uma visão mais completa da diversidade biológica e dos processos
262 evolutivos que a moldaram.

263 Para isso, a proteômica é uma excelente ferramenta para o estudo da evolução.
264 No entanto, ainda pouco explorada na área de mamíferos marinhos, provavelmente
265 por conta da dificuldade de obtenção de materiais biológicos em boas condições para
266 análises. Alguns trabalhos na área já publicados tem como foco os cetáceos como em
267 Altelaar et al. (2013), Holm et al. (2016) e Kershaw et al. (2018), e líquido cerebral de
268 pinípedes (Neely et al., 2015).

1.3.2. Seleção e adaptação

269 Um objetivo central da biologia evolutiva é explicar como a diversidade
270 biológica surge e se mantém na natureza, e para essa área, os métodos de
271 sequenciamento genômico, e suas aplicações, já são bem conhecidos. Embora o DNA
272 codifique o funcionamento do organismo, a execução das informações é realizada
273 pela atividade das proteínas e os complexos estruturais que elas formam, fazendo
274 delas efetoras do código genético. Porém, tem crescido entendimento de que as
275 análises genômicas não são suficientes para explicar os fenótipos, particularmente
276 para estudos da grande maioria das espécies para as quais genomas sequenciados
277 ainda não estão disponíveis (Braga Emidio et al., 2015; Baer e Millar, 2016) e porque,
278 já é aceito que, na maioria dos casos, têm se encontrado baixas correlações entre os
279 níveis quantitativos de mRNA e proteína em diferentes organismos (Liu et al., 2016;
280 Wegler et al., 2020).

281 A influência da diversificação pós-transcricional nos processos evolutivos pode
282 fornecer uma nova base para os elementos de adaptações evolutivas (Baer e Millar,
283 2016). Portanto, os estudos proteômicos podem ser vistos como oportunidades para
284 compreender os eventos relativos às variações funcionais dos processos moleculares
285 que agem como parte dos processos evolutivos. Dentro deste cenário, alguns estudos
286 filogenéticos utilizando-se da abordagem proteômica como ferramenta para entender
287 a evolução de características de interesse, como por exemplo a tradução de proteínas
288 que dirigem a formação dos organismo ao longo do tempo (Baer e Millar, 2016).

289 Dessa forma, este trabalho tem como objetivo, por meio de abordagem
290 proteômica, avaliar e caracterizar diferenças moleculares de proteínas presentes em
291 rins de cachorros domésticos como grupo externo para controle e renículos de lobo-
292 marinho-sul-americano como modelo de organismo adaptado ao ambiente marinho.
293 A escolha deste último grupo se deve por serem importantes representantes de
294 animais com escasso acesso à água doce – portanto, submetidos a um estresse
295 hídrico – e dos determinantes evolutivos funcionais que levaram à adaptação da
296 osmorregulação neste ambiente. Os resultados deste trabalho podem auxiliar na
297 compreensão de como a expressão destas proteínas afeta o fenótipo renal destes
298 animais, bem como as características morfofuncionais no sistema renal e na
299 osmorregulação desses indivíduos.

300 **1.4. A espectrometria de massas como ferramenta**

301 A espectrometria de massas (do inglês *mass spectrometry - MS*) é uma técnica
302 que se baseia na formação de íons na fase gasosa, permitindo a identificação
303 qualiquantitativa de proteínas e fragmentos. Após a introdução de abordagens de
304 ionização suave, como a espectrometria de massas por dessorção/ionização assistida
305 por matriz (MALDI) e a ionização por *eletrospray* (ESI), a MS foi classificada como
306 uma ferramenta analítica excepcional na identificação, caracterização e quantificação
307 de proteínas e suas modificações pós-traducionais. Essa ferramenta de alta precisão
308 e especificidade é utilizada para diversas finalidades, incluindo a avaliação da
309 diversidade e função de proteínas (Altelaar et al., 2013). Os princípios básicos da MS
310 envolvem a comparação e quantificação das diferenças na expressão de proteínas
311 entre várias condições, e a utilização dessas informações para identificar os genes
312 que as codificam (Karr, 2008). Por ser uma tecnologia altamente precisa e acurada na

313 identificação e caracterização de peptídeos, a MS é uma ferramenta importante para
314 a compreensão da função celular dos organismos.

315 A abordagem mais comum utiliza a proteômica *shotgun* (McDonald e Yates,
316 2002), que é a análise inferencial de proteoformas a partir de peptídeos, que são
317 geralmente identificados por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de
318 massas (*Liquid chromatography–mass spectrometry – LC-MS/MS*), usando aquisição
319 independente de dados (*Data Independent Acquisition – DIA*), aquisição dependente
320 de dados (*Data Dependent Acquisition – DDA*) ou uma combinação de ambas as
321 estratégias (Schubert et al., 2017).

322 Na abordagem *bottom-up* utilizada com o método de aquisição de dados
323 independentes (DIA), usada nesse estudo, o objeto de análise são os peptídeos
324 gerados a partir da digestão proteica. Neste procedimento, todos os peptídeos
325 contidos na amostra, são situados dentro de janelas predefinidas de isolamento de
326 massas, e são sujeitos a fragmentação simultânea. Tal metodologia permite a
327 avaliação concomitante de múltiplos peptídeos em um único espectro, apresentando
328 diversas vantagens para a quantificação relativa de proteínas e suas modificações
329 associadas.

330 1.4.1. Espectrometria de massas com mobilidade iônica

331 A espectrometria de mobilidade iônica (IMS, do inglês *Ion Mobility*
332 *Spectrometry*) um método que separa moléculas na fase gasosa com base na sua
333 seção de choque de colisão (CCS) (Kanu et al., 2008), que é uma medida da
334 probabilidade de uma molécula sofrer colisões com outras moléculas de gás, durante
335 a fase gasosa em sua passagem pelo espectrômetro. A IMS quando acoplada à MS
336 e combinada com a cromatografia líquida (LC) resulta na proteômica *shotgun* LC-IMS-
337 MS/MS, uma estratégia promissora para analisar amostras complexas (Helm et al.,
338 2014) principalmente porque ela atua como uma dimensão adicional de separação
339 além da relação massa/carga (m/z).

340 A IMS é uma técnica analítica que tem sido aplicada nas últimas décadas
341 principalmente na área de química analítica. Somente recentemente é que o potencial
342 da IMS-MS tem sido explorado para a separação, identificação e quantificação de
343 peptídeos e proteínas. Nesse estudo, utilizamos o espectrômetro timsTOF Pro 2
344 (Bruker), que combina a espectrometria de mobilidade iônica com íons aprisionados

345 (do inglês, *Trapped Ion Mobility Spectrometry* - tims) (Fernandez-Lima et al., 2011) e,
346 é impulsionado pela tecnologia de acumulação paralela e fragmentação serial (do
347 inglês, *Parallel Accumulation Serial Fragmentation* - PASEF®) (Meier et al., 2015,
348 2018).

2. Objetivo

Compreender e caracterizar as proteínas presentes nos rins de *Arctocephalus australis* com relação à sua funcionalidade na otimização da osmorregulação em ambientes marinhos.

Objetivos específicos

- Comparar os proteomas dos tecidos renais entre as espécies selecionadas para o estudo;
- Caracterizar as proteínas relevantes com o fenótipo relacionado às adaptações ao ambiente marinho, quando comparadas a um modelo terrestre controle;
- Investigar a relevância dos rins reniculados como vantagem adaptativa na função renal dos mamíferos marinhos.

3. Hipótese

A expressão diferente das proteínas presentes nos rins de lobos-marinhos confere a estes organismos uma vantagem adaptativa ao ambiente marinho.

4. Materiais e Métodos

4.1. Desenho experimental

349 A seguir, na figura 3, apresenta-se o desenho experimental do trabalho.

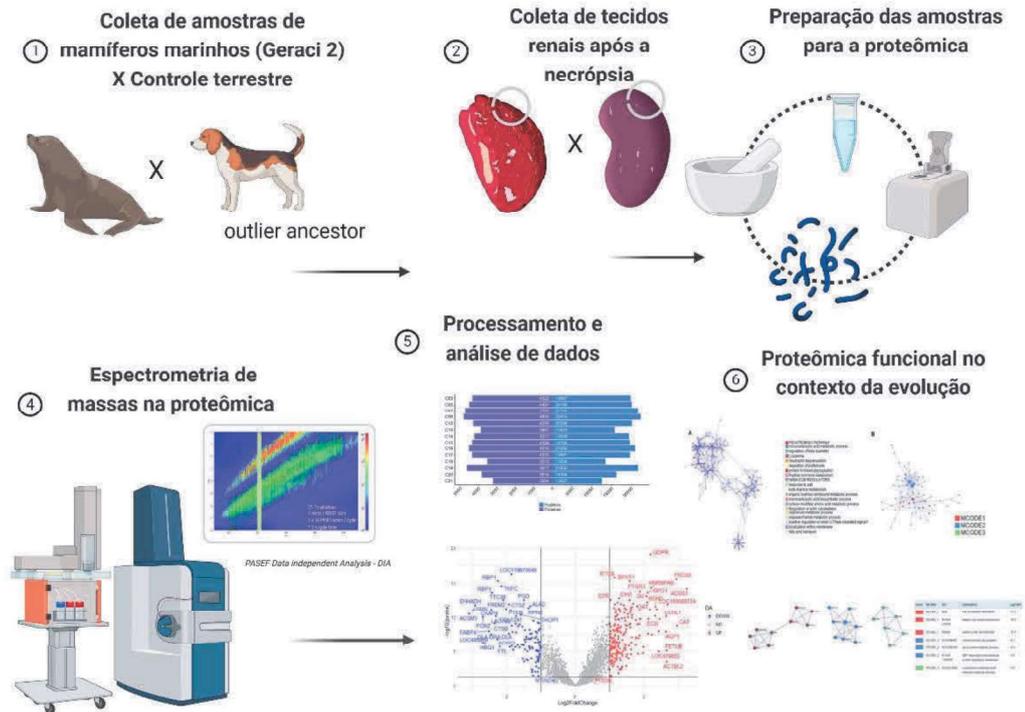


Figura 3. Representação esquemática do fluxo de trabalho: (1) As amostras foram sistematicamente recolhidas de cachorros e lobos-marinhos (para este, seguindo o protocolo de degradação de Geraci e Lownsbury (1993)). (2) Renículos e tecidos renais retirados da parte apical do rim direito. (3) Preparo de amostras para a proteômica de acordo com protocolos consolidados. (4) As proteínas fracionadas em gradientes de UHPLC e analisadas por LC-MS/MS. (5) Análise bioinformática feita a partir de softwares dedicados à proteômica. (6) Outras análises como mapas de interação e correlação ontológica (*Gene Ontology* – GO).

4.2. Local de coleta

350 Para obtenção das amostras *Arctocephalus australis*, duas áreas foram
 351 monitoradas todas as terças e quintas-feiras, entre 08 e 29 de agosto de 2022, ao
 352 longo do litoral norte do estado do Rio Grande do Sul. Nessa região, todos os anos,
 353 durante o inverno, encaham espécimes de primeiro ano de vida, geralmente
 354 acometidos por causas naturais. A primeira área de monitoramento compreendeu 80
 355 km de praias entre o município de Torres – RS (29° 21' S, 49° 44' W) e Imbé – RS
 356 (29° 58' S, 50° 7' W), e a segunda, 50 km de praias entre o município de Tramandaí –
 357 RS (29° 58' S, 50° 7' W) até Palmares do Sul – RS (30° 24' S, 50° 17' W) (Fig. 4). No
 358 total foram percorridos aproximadamente 130 km de praias do litoral do Rio Grande
 359 do Sul a cada dois monitoramentos. Os levantamentos na praia foram realizados
 360 usando uma caminhonete 4x4 a uma velocidade média de 40 km/h, com no mínimo,
 361 dois observadores varrendo toda a extensão da faixa de areia exposta. Já para as
 362 amostras de controle terrestre, foram feitas coletas em janeiro e fevereiro de 2023 em
 363 parceria com o Laboratório de Patologia Veterinária do Hospital Veterinário da
 364 Universidade de Brasília (HVET/UNB), localizado na Asa Norte, Brasília – DF.

365 A amostragem dos espécimes foi realizada de acordo com as normas
366 estabelecidas pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO)
367 do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Ministério do Meio
368 Ambiente, Brasil, sob a autorização nº. 20185, obtida pelo Doutor Maurício Tavares
369 do Centro de Estudos Costeiros, Limnológicos e Marinhos da Universidade Federal
370 do Rio Grande Do Sul (CECLIMAR/UFRGS). Para a espécie terrestre, foi seguida a
371 resolução normativa nº. 30 de 2 de fevereiro de 2016 do Conselho Nacional de
372 Controle de Experimentação Animal.

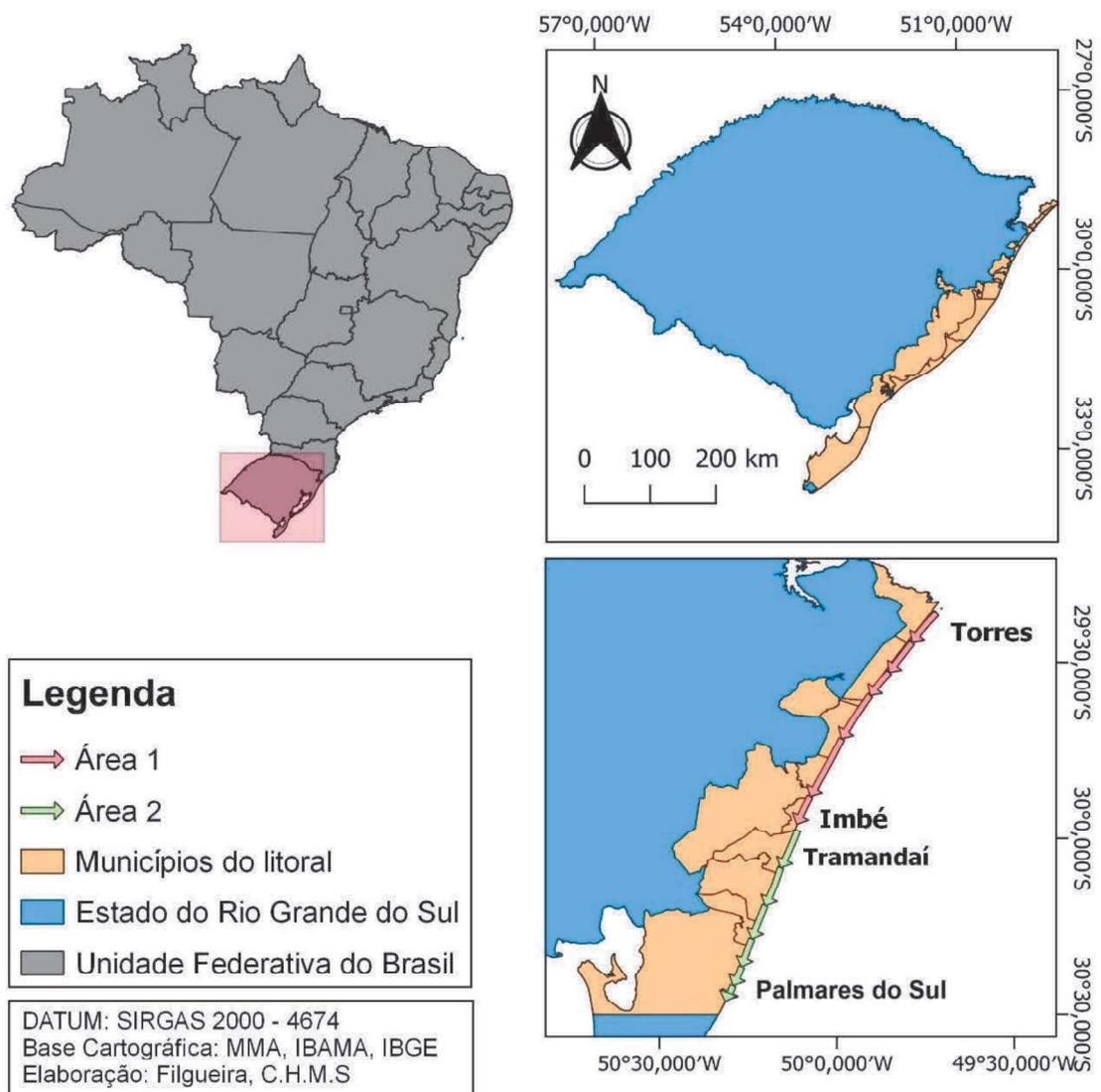


Figura 4. Local de coleta. Mapa indicando as regiões litorâneas do Estado do Rio Grande do Sul onde foram realizadas as coletas dos pinípedes.

4.3. População da pesquisa

373 Os rins dos exemplares de pinípedes foram retirados inteiros dos animais
374 encontrados encalhados frescos durante as atividades de monitoramento de praia ou
375 de animais recém-mortos no centro de reabilitação do CECLIMAR/UFRGS. Todas as
376 carcaças encontradas foram classificadas seguindo o padrão proposto por Geraci e
377 Lounsbury (1993), onde o grau de decomposição varia de 1 a 5 (Geraci e Lounsbury,
378 1993). As necropsias foram realizadas por métodos convencionais descrito em Geraci
379 e Lounsbury (1993) para pinípedes. A idade relativa dos lobos-marinhos foi estimada
380 de acordo com o comprimento corporal, medido em linha reta da ponta do focinho à
381 extremidade da cauda. As amostras de rins do grupo controle foram coletadas de cães
382 eutanasiados por várias razões médicas e levados para necropsia no Laboratório de
383 Patologia Veterinária da Universidade de Brasília (LPV-HVET/UnB). Tanto para os
384 renículos quanto para os tecidos renais, as alíquotas foram coletadas sempre do polo
385 cranial do rim direito e acondicionadas em tubos de criopreservação estéreis, sendo
386 preservados congelados a -20 °C até o armazenamento em -80 °C, segundo
387 modificação do protocolo Viana et al. (2018).

4.3.1. Critérios de Inclusão

- ✓ Código Geraci & Lounsbury (2): Para os animais encontrados encalhados nas praias durante o monitoramento, apenas foram considerados os animais que estavam recém-mortos, no máximo em estágio final de *rigor mortis*, antes do relaxamento completo;
- ✓ A idade relativa dos lobos-marinhos foi estimada com base no comprimento corporal;
- ✓ Para os animais coletados do centro de reabilitação e hospital veterinário foram considerados apenas os jovens que foram resfriados ou necropsiados logo após a morte.

4.3.2. Critérios de Exclusão

- ✓ Sinais de autólise do rim e renículos durante a necropsia;
- ✓ Lesões histológicas identificadas nas análises de tecidos.
- ✓ Após a aplicação de critérios de inclusão e exclusão, o total de animais processados resultou em 15 lobos-marinhos e 14 cachorros (Tabela 1). Estes

critérios foram estabelecidos para garantir a reprodutibilidade, a confiabilidade e a homogeneização das amostras e dados analisados no estudo comparativo.

Tabela 1. Dados dos animais coletados

Registro	Sexo	Comprimento (cm)	Lesões
MM242	M	164	Não
MM251	F	77,3	Não
MM253	M	92	Não
MM254	M	109,2	Não
MM255	F	87,3	Não
MM256	M	89	Não
MM257	M	90,5	Não
MM258	M	96,5	Não
MM259	M	88,4	Não
MM260	F	88,5	Não
MM261	F	88,5	Não
MM262	M	89,5	Não
MM263	M	105	Não
MM264	M	92,5	Não
MM268	M	91	Não
P01-23 C1	M	72	Sim
P02-23 C2	M	44	Sim
P03-23 C3	F	56	Não
P04-23 C4	F	94	Sim
P05-23 C5	M	127	Não
P06-23 C6	M	73	Sim
P07-23 C7	F	58	Não
P08-23 C8	F	65	Não
P09-23 C9	F	70	Sim
P10-23 C10	M	65	Sim
P11-23 C11	M	82	Não
P12-23 C12	F	78	Não
P13-23 C13	M	65	Não
P14-23 C14	M	86	Não
P15-23 C15	F	88	Não
P16-23 C16	M	93	Não
P17-23 C17	M	38	Não
P18-23 C18	F	43	Não
P19-23 C19	M	57	Não
P20-23 C20	F	70	Não
P21-23 C21	M	42	Não

388

4.4. Histologia dos tecidos renais

389 Avaliações histopatológicas foram feitas para a confirmação de que nenhuma
 390 amostra apresentava alguma afecção. A avaliação foi feita no laboratório de Patologia
 391 Veterinária do HVET/UNB. Todas as amostras avaliadas na análise histológica foram

392 fixadas em formalina tamponada a 10%, incluídas em parafina, processadas
393 rotineiramente e coradas com hematoxilina e eosina (HE) para avaliação
394 microscópica.

4.5. Preparo de amostras para espectrometria de massas

395 A massa das amostras de rins/renículos foi aferida em balança analítica de
396 precisão e estabelecida em 200mg de tecido. Após. As mesmas foram maceradas em
397 nitrogênio líquido com cadinho e pistilo. Uma lavagem foi realizada no cadinho e pistilo
398 a cada maceração para evitar contaminação cruzada entre os espécimes. As
399 amostras maceradas foram ressuspensas em solução de TEAB (do inglês
400 *Triethylammonium bicarbonate buffer*) 0.02 M e inibidor de protease 1x livre de EDTA
401 (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*) e submetidas à sonicação em *Tip*
402 *Sonicador* Q125 (QSonica) com intensidade a 40 % do potencial em 3 ciclos de 10
403 segundos cada. Os concentrados proteicos foram ressuspensos com nova solução
404 TEAB 0.02 M e ureia menor que 2 M (pH 7,9) seguido de incubação por 25 minutos a
405 300 rpm e centrifugação a 21 °C por oito minutos a 3500 g e em seguida, quantificados
406 utilizando o método baseado em ácido bicinconínico (BCA) após o perfil proteico ser
407 verificado em gel poliacrilamida (SDS-PAGE).

408 Para confirmar o grau de integridade das amostras, após a etapa de sonicação,
409 ensaios adicionais foram realizados em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) 12 %. As
410 proteínas do rim foram separadas usando um sistema de eletroforese vertical Mini-
411 PROTEAN® Tetra Cell conforme manual da BioRad. Os géis foram corados com azul
412 brilhante de Coomassie.

4.6. Quantificação de proteínas

413 A quantificação da concentração de proteínas das amostras foi realizada a
414 partir do “Kit Micro BCA™ *Protein Assay*” para detecção colorimétrica e quantificação
415 das proteínas totais, adaptado para dosar amostras de proteínas diluídas.
416 Primeiramente, preparou-se o reagente de trabalho (do inglês *Working Reagente* –
417 WR) a partir da junção entre as soluções MA, MB e MC já inclusas no kit na proporção
418 indicada (25:24:1). Em seguida, alíquotas de 1 µL de amostra diluídas em água Milli-
419 Q® (1:499) para que fosse possível detectar dentro da faixa de sensibilidade (2-40
420 µg/mL para microplacas). Em triplicatas as amostras foram adicionadas aos poços
421 junto ao WR para atingir volume final de 200 µL. As misturas foram incubadas por 2

422 horas a 37 °C em placas de 96 poços de fundo achatado e protegidas por tampas das
423 próprias placas. Após o período de incubação, a placa foi resfriada em temperatura
424 ambiente por alguns minutos. A mensuração foi realizada no comprimento de luz a
425 562 nm (Abs_{562nm}) na leitora de microplacas ClarioStar (BMG Labtech). Após a leitura,
426 a média da Abs_{562nm} das amostras e da curva padrão foram corrigidas de acordo com
427 o valor do “blank” na curva padrão (Milli-Q® acrescido de WR). A concentração das
428 amostras foi determinada e analisada pelo *software* Mars em µg/mL.

429 A quantificação pré-digestão de proteínas foi realizada em todas as amostras
430 biológicas utilizando o ensaio com Micro BCA™. Os resultados da quantificação
431 variaram na concentração total de proteínas com uma média de 11,41993 µg/µL. Os
432 resultados obtidos para os conjuntos de amostras (cachorros e lobos-marinhos)
433 apresentaram uma correlação muito alta entre os dados. Para os cães, a leitura
434 resultou em um coeficiente de determinação (r^2) de 0,997592, enquanto para os
435 animais marinhos, a medição apresentou r^2 de 0,9917886.

4.7. Digestão triptica de proteínas em solução

436 Foram aliqüotadas 30 µg de proteína em tubos Eppendorf de baixa adsorção
437 para proteínas e peptídeos (LoBind) para o processo de digestão. Os extratos
438 proteicos foram inicialmente ressuspensos em solução de TEAB 20 mM, UREIA 8
439 M e Ditioneitol (DTT) 50 mM (pH 7,9) e incubados por 25 minutos a 55 °C e 400 rpm.
440 Sob abrigo de luz e após resfriamento, foi adicionada solução de iodoacetamida (IAA)
441 0,5 M suficiente para atingir concentração final de 14mM e incubou-se novamente por
442 40 min a 21 °C e 400 rpm. Posteriormente foi adicionada solução de DTT na
443 concentração final de 5 mM para cessar a reação de alquilação. As amostras foram
444 então diluídas na razão 1:5 com solução de TEAB 20 mM (pH 7,9), devido a
445 intolerância da enzima tripsina a altas concentrações de ureia, já considerando a
446 adição de solução de $CaCl_2$ suficiente para atingir concentração final de 1 mM e a
447 adição de tripsina (Promega) na razão 1:50. Em seguida, as amostras foram
448 encubadas por 16 horas a 37 °C e 300 rpm, e após o período de digestão, foi
449 adicionado TFA (Ácido trifluoracético) na concentração final de 0,1 % para evitar
450 clivagens inespecíficas e parar a reação. Os digestos proteicos foram dessalinizados
451 imediatamente.

4.8. Dessalinização de peptídeos

452 Os peptídeos trípticos foram dessalinizados em microcolunas *homemade* de
453 fase reversa construídas a partir de discos Empore™ SPE (Sigma-Aldrich), com
454 partículas C18 de característica hidrofóbica em ponteiros P200 (Axygen). As
455 microcolunas permitem a purificação e enriquecimento dos peptídeos a partir da
456 retirada de sal e subsequente eluição dos mesmos. Primeiramente foram realizadas
457 sequências de centrifugação a 1000 g por três minutos com 100 µL de MeOH 100%,
458 seguido de 100 µL de solução de acetonitrila 80 % (v/v) e ácido acético 0,5 % (v/v), e
459 por fim 100 µL de solução de ácido acético 0,5 % (v/v). Finalmente, os digestos
460 proteicos foram adicionados às colunas, centrifugados a 900 g durante 4 min e
461 dessalinizados duas vezes com 100µL de solução de ácido acético 0,5 % (v/v) a 1000
462 g por 3 minutos. A eluição dos peptídeos foi realizada com concentrações crescentes
463 de acetonitrila (25 %, 50 %, 80 % e 100 %), mantendo a concentração de ácido acético
464 a 0,5 % nas soluções e centrifugações de 600 g por 3 minutos. As frações foram
465 coletadas em tubos Eppendorf LoBind e os peptídeos eluídos foram liofilizados em
466 concentrador rotatório SpeedVac™ SC100 (Savant™).

4.9. Análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas

467 Um total de 500 ng de cada amostra foi carregado em colunas individuais
468 *EvoTIPS*, seguindo o protocolo do fabricante, e os peptídeos foram separados usando
469 um sistema de LC Evosep One (Evosep, Dinamarca) em um gradiente de 44 minutos
470 (um método proprietário pré-definido pela Evosep de 30 amostras por dia) em uma
471 coluna PepSep 8 (8 cm × 150 µm X 1,5 µm C18, Bruker Daltonics) a 60 °C. As fases
472 móveis foram 0,1% de ácido fórmico em água grau LC-MS (tampão A) e 0,1% de ácido
473 fórmico em 99,9% de ACN (tampão B). O sistema LC foi acoplado ao timsTOF Pro 2,
474 um espectrômetro de mobilidade iônica híbrido com armadilha e um instrumento
475 quadrupolo de tempo de voo (Bruker Daltonics) operado em modo positivo,
476 previamente calibrado para massa (m/z) e dimensão de mobilidade iônica (1/K0),
477 utilizando três íons do Agilent ESI-Low Tuning Mix (m/z 622,0289; 922,0097 e
478 1221,9906). A fonte nano-eletrospray (fonte CaptiveSpray, Bruker Daltonics) foi
479 operada a 1600 V de voltagem de capilar, 3,0 L/min de gás seco e 180 °C de
480 temperatura seca.

481 Os dados foram adquiridos no modo de aquisição dia-PASEF1 com um tempo
482 de ciclo estimado de 1,8 s. Para cobrir a faixa de massa de 400 a 1200 m/z, foram

483 utilizadas 32 janelas de isolamento com largura de 25 m/z. O tempo de rampa e o
484 tempo de acumulação foram definidos como 100 ms, e a energia de colisão aumentou
485 linearmente como uma função da mobilidade de 59 eV em $1/K0 = 1,6 \text{ Vs cm}^{-2}$ para
486 20 eV em $1/K0 = 0,6 \text{ Vs cm}^{-2}$. PASEF®

4.10. Bioinformática

487 Neste estudo, utilizamos um conjunto de *softwares* para realizar a identificação
488 e a análise dos dados proteômicos. Foi feita uma análise de enriquecimento de
489 ontologia de genes (GO) e de vias do Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
490 (KEGG). Isso permitiu identificar os principais processos biológicos, funções
491 moleculares e componentes celulares relacionados aos dados. Em seguida, foram
492 constituídas redes de interação proteína-proteína (PPI, na sigla em inglês para
493 *Protein-Protein Interaction*) para elucidar as representações gráficas das interações
494 físicas ou funcionais entre proteínas no sistema biológico.

4.10.1. DIA-NN

495 A análise dos dados brutos da proteômica foi conduzida utilizando o *software*
496 DIA-NN (Demichev et al., 2020), uma ferramenta universal para o processamento de
497 dados de DIA. Este *software* foi escolhido devido à sua capacidade de garantir
498 robustez e precisão quantitativa em experimentos de grande escala. O DIA-NN usa
499 bibliotecas espectrais ou bancos de dados para analisar os dados fornecidos.

500 Os arquivos brutos adquiridos no modo diaPASEF no timsTOF foram
501 analisados com o DIA-NN (versão 1.8.1) usando as seguintes configurações:
502 protease: Trypsin/P, missed cleavages: 1, variable modifications: 0, peptide length
503 range: 7–30, precursors change range: 1-4, precursor m/z range: 300–1800, fragment
504 ion m/z range: 200–1800, MS1 mass accuracy: 10 ppm, MS1 mass accuracy: 10 ppm.
505 As opções de excisão de M-terminal, carbamidometilação de C e oxidação de M foram
506 habilitadas e a inferência heurística de proteína desabilitada. Inferência de proteínas
507 foi feita a partir de genes, classificador de rede neural em modo de passagem dupla e
508 estratégia de quantificação LC robusto (alta precisão). Além disso, as outras
509 configurações permaneceram em modo padrão.

510 Para as análises individuais dos proteomas das espécies, geramos uma
511 biblioteca espectral baseada em aprendizado profundo a partir dos proteomas de
512 referência do UniProt canino e de leão-marinho-da-Califórnia (*Zalophus californianus*).

513 Essa biblioteca espectral foi usada para processar todos os arquivos brutos das
514 análises e gerar uma segunda biblioteca espectral mais otimizada que inclui dados de
515 mobilidade iônica. Esta nova biblioteca espectral foi usada para reanalisar todos os
516 arquivos brutos.

517 Os dados obtidos de *A. australis* foram analisados utilizando o banco de dados
518 de *Z. californianus* porque não há um proteoma disponível especificamente para a
519 espécie estudada. Dessa forma, o proteoma do leão-marinho foi utilizado como a
520 referência mais próxima para analisar e identificar as proteínas no lobo-marinho. Já
521 para o experimento combinando os dados brutos de *A. australis* e *C. familiaris*, não foi
522 utilizada a biblioteca espectral a fim de não restringir os resultados.

4.10.2. MS-DAP

523 A ferramenta "*Mass Spectrometry Downstream Analysis Pipeline* (MS-DAP)" foi
524 utilizada para análise dos dados obtidos pelo DIA-NN. O MS-DAP é um pacote de
525 código aberto desenvolvido na linguagem R, compatível com diversos *softwares* de
526 pré-processamento de dados brutos. O MS-DAP foi utilizado para conduzir a análise
527 *downstream* desses dados. Foram feitas as seguintes etapas: filtragem de peptídeos
528 mais relevantes para nossa análise, descartando aqueles que não contribuíam
529 significativamente.; normalização dos valores quantitativos para garantir que os dados
530 estivessem comparáveis entre as amostras; Análise de Expressão Diferencial (DEA,
531 do inglês *Differential Expression Analysis*) para identificar proteínas que
532 apresentavam diferenças significativas em sua expressão entre as amostras
533 analisadas. Além disso, o MS-DAP cria automaticamente relatórios de controle de
534 qualidade dos resultados, incluindo gráficos que avaliam a precisão e consistência,
535 identificando possíveis variações entre lotes para auxiliar nas conclusões estatísticas.

536 A ferramenta estatística escolhida para testar a expressão diferencial de
537 proteínas utilizada, o DEqMS (Zhu et al., 2020) foi feita para análises proteômicas
538 quantitativas. Este método oferece uma abordagem mais avançada, considerando o
539 número de peptídeos por proteína. Essa abordagem amplia a sensibilidade na
540 detecção de mudanças sutis na expressão proteica entre diferentes condições
541 experimentais, garantindo maior precisão e confiança nos resultados.

4.10.3. Anotações funcionais

542 O WebGestalt (WEB-based Gene SeT AnaLysis Toolkit) é uma ferramenta web
543 de análise de enriquecimento funcional com ênfase em fornecer figuras prontas para
544 publicação. O site conta com três métodos bem estabelecidos e complementares para
545 análise, incluindo Análise de Super-Representação (ORA), Análise de Enriquecimento
546 de Conjunto de Genes (GSEA) e Análise Baseada em Topologia de Rede (NTA). As
547 listas com os Gene IDs foram inseridas no WebGestalt para análise de enriquecimento
548 funcional. Os parâmetros padrão foram utilizados, incluindo a base de dados GO
549 (*Gene Ontology*) para categorização funcional e *pathways* de referência como KEGG
550 (88.2) e PANTHER (v3.6.1).

551 A análise funcional dos conjuntos de genes foi realizada utilizando a plataforma
552 *online* Metascape. Os conjuntos de genes de interesse foram submetidos à análise de
553 enriquecimento de genes (GSEA) fornecida pelo Metascape. As anotações biológicas
554 utilizadas incluíram informações GO, KEGG e outras fontes agregadas pela
555 plataforma. A visualização interativa dos resultados, juntamente com representações
556 gráficas de redes biológicas, foi explorada para uma compreensão mais aprofundada
557 da função biológica associada aos genes em estudo.

5. Resultados

5.1. Análise histológica dos tecidos

558 Com a avaliação microscópica, examinamos as seções transversais dos
559 tecidos renais para identificar quaisquer potenciais anormalidades histológicas que
560 pudessem influenciar as análises moleculares. Apenas os animais com tecidos em
561 condições aparentemente normais foram considerados (Fig. 5A e 5B), e os rins com
562 alterações teciduais identificadas (Fig. 5C a 5F) foram excluídos.

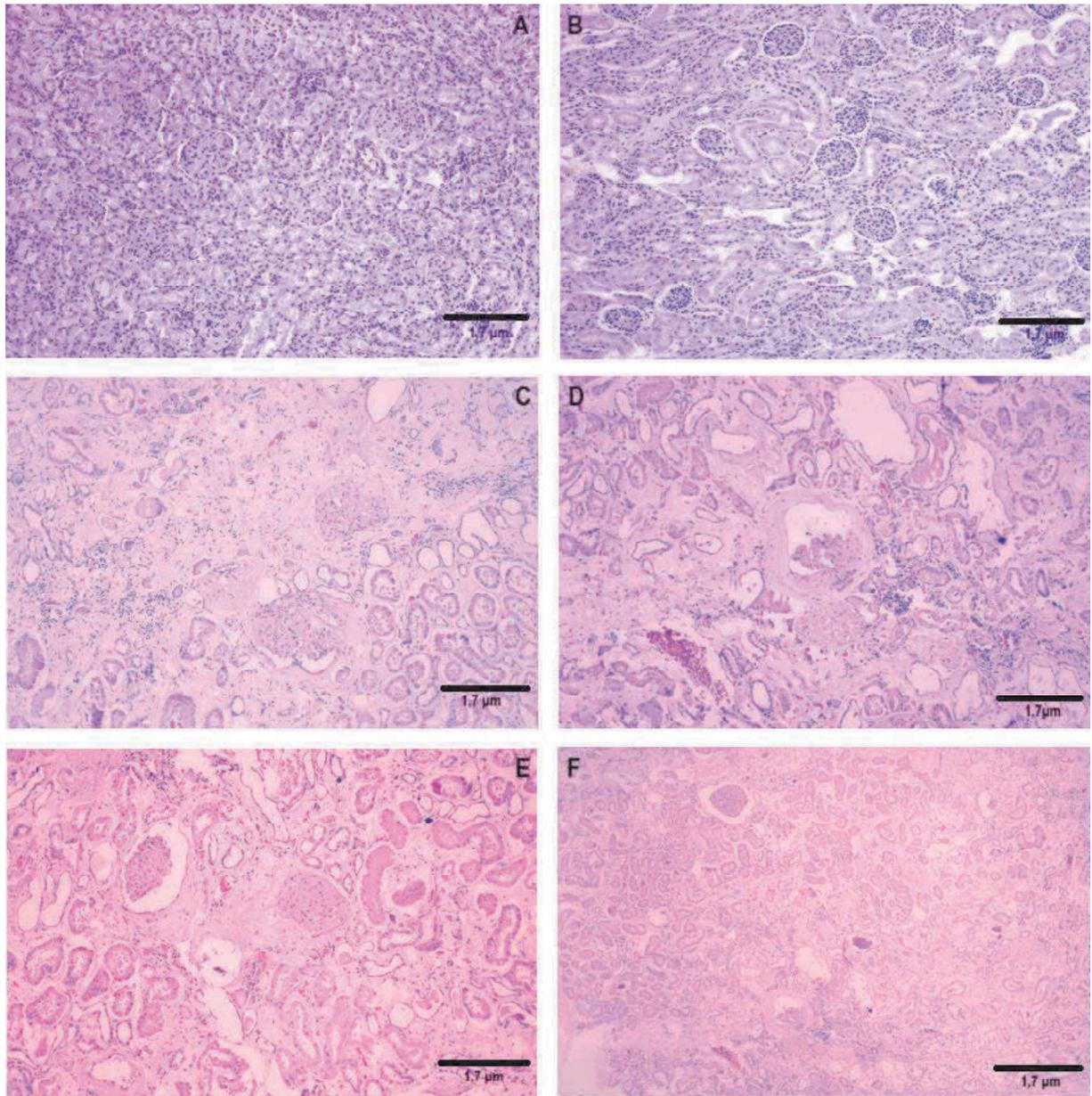


Figura 5. Corte histológico de rins coletados. HE. 10x. A. Renículo de *A. australis*. B. Tecido renal de *C. familiaris*. C. Glomeruloesclerose. D. Espessamento da cápsula de Bowman. E. Cilindros hialinos e glomeruloesclerose. F. Insuficiência Renal Crônica.

5.2. Caracterização do perfil de proteínas

5.2.1. *Canis lupus familiaris*

563 Para a caracterização do perfil proteômico renal canino, as análises foram
 564 conduzidas utilizando a biblioteca espectral gerada a partir dos dados brutos do
 565 timsTOF Pro2 e o proteoma de *Canis lupus familiaris (dog)* obtido através do Uniprot
 566 *Proteomes*, ID do organismo 9615. Foi identificada a média esperada para
 567 experimentos DIA, de peptídeos aproximadamente cinco vezes o número de proteínas

568 (Fig. 6). Para DIA: um peptídeo é tido como 'detectado' se o escore de confiança (para
 569 identificação) for $\leq 0,01$.

570

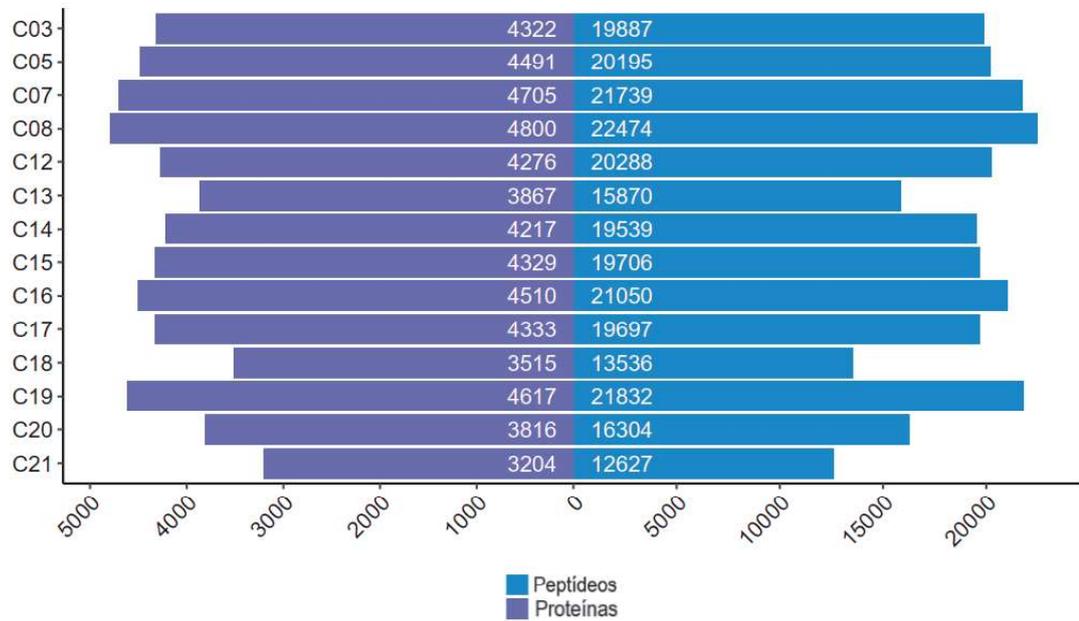


Figura 6. Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de cachorros. Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra de cachorro quando comparado com banco de dados de cachorro.

571 Nas amostras de cães, foi possível observar que a maioria das proteínas
 572 estavam associadas a processos metabólicos, presentes na membrana ou em
 573 complexos proteicos, e relacionadas a conjugados proteicos ou iônica (Fig. 7).

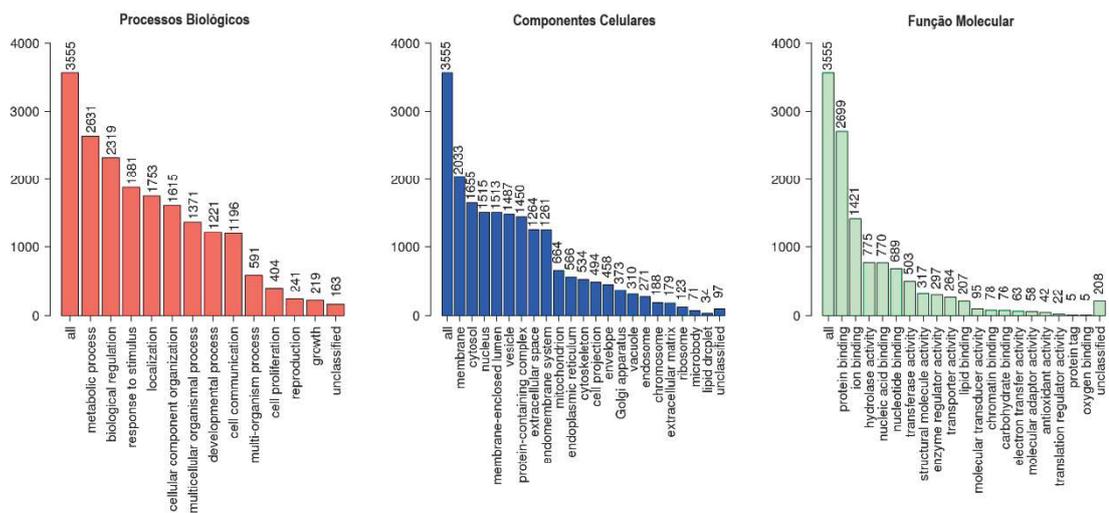


Figura 7. Anotações *Gene Ontology* (GO) nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse..

574 **5.2.2. *Arctocephalus australis***

575 Para a caracterização do perfil de proteínas dos renículos de lobo-marinho-sul-
576 americano, as análises foram feitas utilizando uma biblioteca espectral gerada a partir
577 dos dados do timsTOF Pro 2 contra o banco de dados disponível no ID de organismo
578 no Uniprot *Proteomes: 9704 Zalophus californianus (California sealion)*. Foi
579 identificada a média esperada para experimentos DIA (Fig. 8).

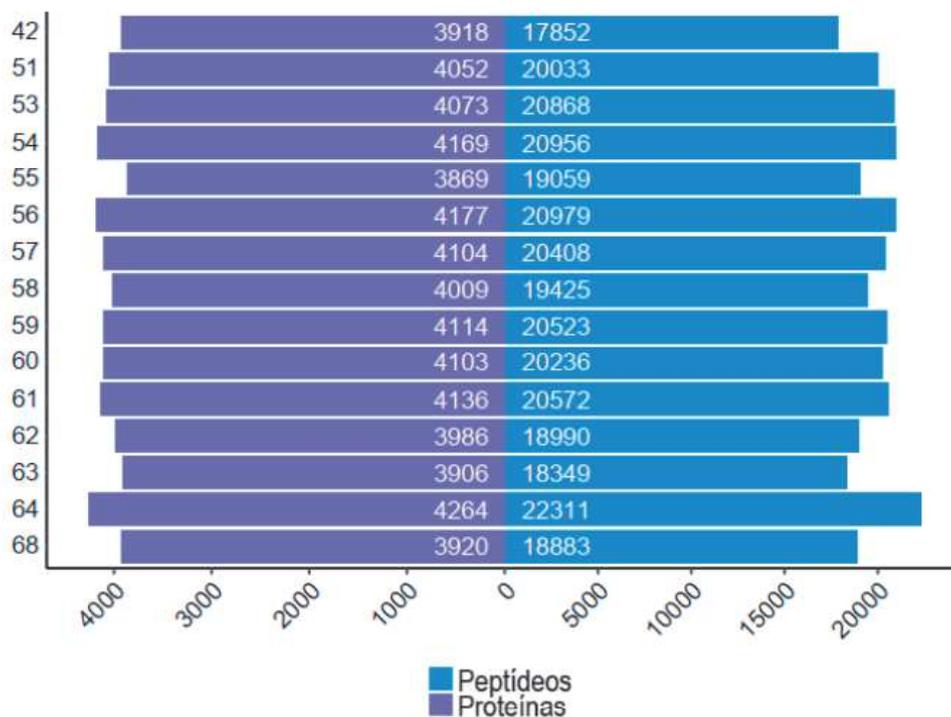


Figura 8. Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de lobos-marinhos. Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra de lobo-marinho-sul-americano quando comparado com banco de dados de leão-marinho-da-Califórnia.

580 Para os lobos-marinhos, as anotações GO indicam que a maioria das proteínas
581 analisadas também estavam associadas a processos metabólicos, presentes na
582 membrana e relacionadas a conjugados proteicos (Fig. 9).

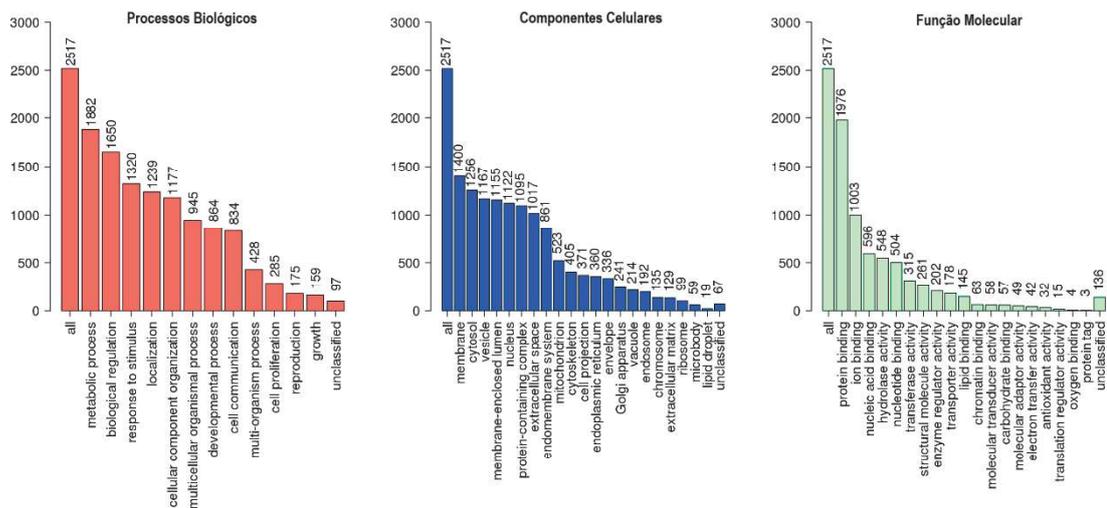


Figura 9. Anotações *Gene Ontology* (GO) nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse.

5.2.3. Comparação entre espécies

583 Para entender a expressão diferencial das proteínas entre espécies, foi feita
 584 uma análise de dados brutos dos dois grupos estudados. Essa etapa foi realizada para
 585 entender as diferenças e similaridades nas expressões proteicas entre espécies e não
 586 foi utilizada uma biblioteca espectral a fim de tentar capturar totalmente a
 587 heterogeneidade das proteínas presentes. Como esperado, a identificação de
 588 proteínas e peptídeos das amostras de cachorros foram maiores do que a de lobo-
 589 marinho quando analisadas utilizando o banco de dados canino (Figura 10). Além
 590 disso, as identificações de *A. australis* foram maiores quando comparadas com banco
 591 de dados de *Z. californianus* (Tabela 2), provavelmente devido à maior proximidade
 592 filogenética com o outro otarídeo.

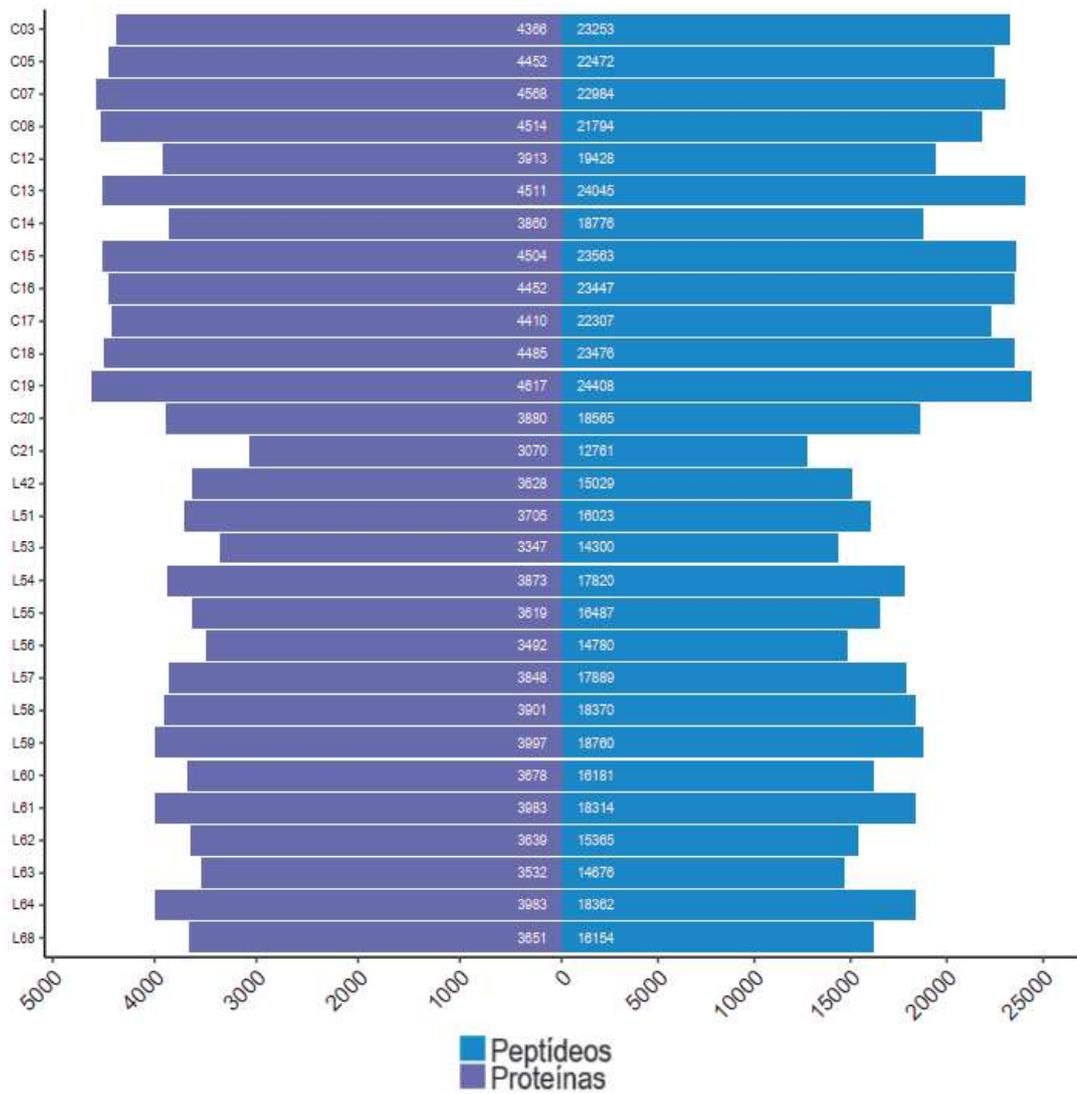


Figura 10. Número de proteínas e peptídeos identificados por amostras de lobos-marinhos (L42 a L68) e cachorros (C3 a C21). Gráfico com o número de peptídeos-alvo que são detectados por amostra quando comparado com banco de dados canino.

Tabela 2. Comparação da identificação de proteínas de *Arctocephalus australis* (Aa) contra diferentes bancos de dados (BD). Dados brutos comparados com o proteoma de *Zalophus californianus* (Zc) e com o proteoma de *Canis lupus familiaris* (Cf).

AMOSTRA	Proteínas Aa com BD de Zc	Proteínas Aa com BD de Cf	Diferença das médias
42	3918	3628	290
51	4052	3705	347
53	4073	3347	726
54	4169	3873	296
55	3869	3619	250
56	4177	3492	685
57	4104	3848	256
58	4009	3901	108
59	4114	3997	117
60	4103	3678	425
61	4136	3983	153
62	3986	3639	347
63	3906	3532	374
64	4264	3983	281
68	3920	3651	269
Média	4053.333	3725.067	328.2667

593 Com a realização de um teste t pareado para comparar as médias das
594 diferenças entre os dois grupos de dados, os resultados indicaram uma diferença
595 estatisticamente significativa entre eles ($t = 7.1628$, $GL = 14$, $p < 0.001$). A média das
596 diferenças entre os grupos de 328.27 com intervalo de confiança de 95% (229.97 a
597 426.56) indica que os valores encontrados quando comparados com proteoma de
598 leão-marinho foram significativamente maiores aos valores correspondentes ao de
599 cachorro.

600 Na identificação das proteínas utilizando todas as amostras juntas,
601 identificamos 3790 proteínas comuns a lobos e cachorros, 487 proteínas exclusivas,
602 ou não identificadas, de cachorros e 42 proteínas que foram identificadas apenas nas
603 amostras de lobos (Fig. 11).

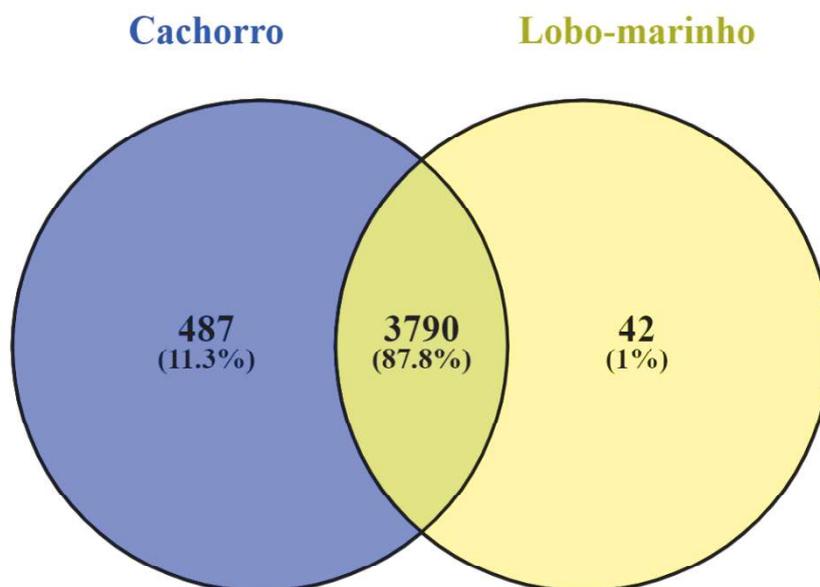


Figura 11. Comparação do número de identificações de proteínas das duas espécies quando comparadas ao banco de dados de cachorro doméstico.

604 Na análise de Componentes Principais (PCA) (Fig. 12) foi possível identificar
 605 que as amostras de cachorros ficaram posicionadas na parte superior do gráfico,
 606 enquanto as amostras de lobos se concentraram na parte inferior, claramente
 607 separadas na dimensão 2. Essa separação estatística demonstra a hipótese de
 608 distinção na expressão proteica entre esses animais.

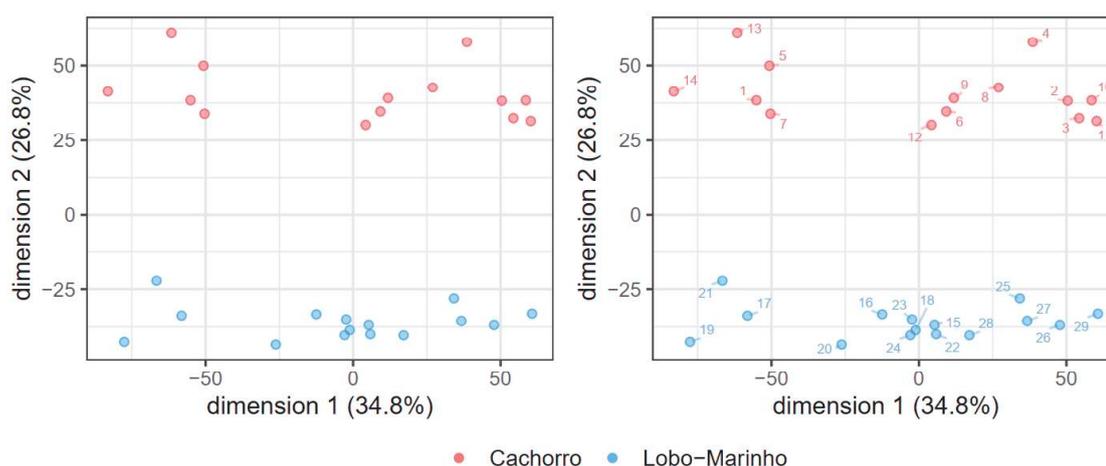


Figura 12. Análise PCA (*Principal Componente Analysis*) apresentando o agrupamento de amostras do mesmo lote experimental, excluindo a sensibilidade de um subconjunto pequeno de proteínas diferencialmente abundantes.

609 A ferramenta estatística escolhida para testar a expressão diferencial de
 610 proteínas utilizada, o DEqMS (Zhu et al., 2020) oferece uma abordagem mais
 611 avançada, considerando o número de peptídeos por proteína. Essa abordagem amplia

612 a sensibilidade na detecção de mudanças sutis na expressão proteica entre diferentes
 613 condições experimentais. Além disso, ele fornece a lista das 10 proteínas que têm os
 614 valores mais extremos (Fig. 13 e Tabela 3). Na figura 13, para identificar as proteínas
 615 diferenciais entre as amostras, o valor mínimo de *fold change* escolhido (>2) significa
 616 que a proteína está pelo menos duas vezes mais expressa em um grupo em
 617 comparação ao outro.

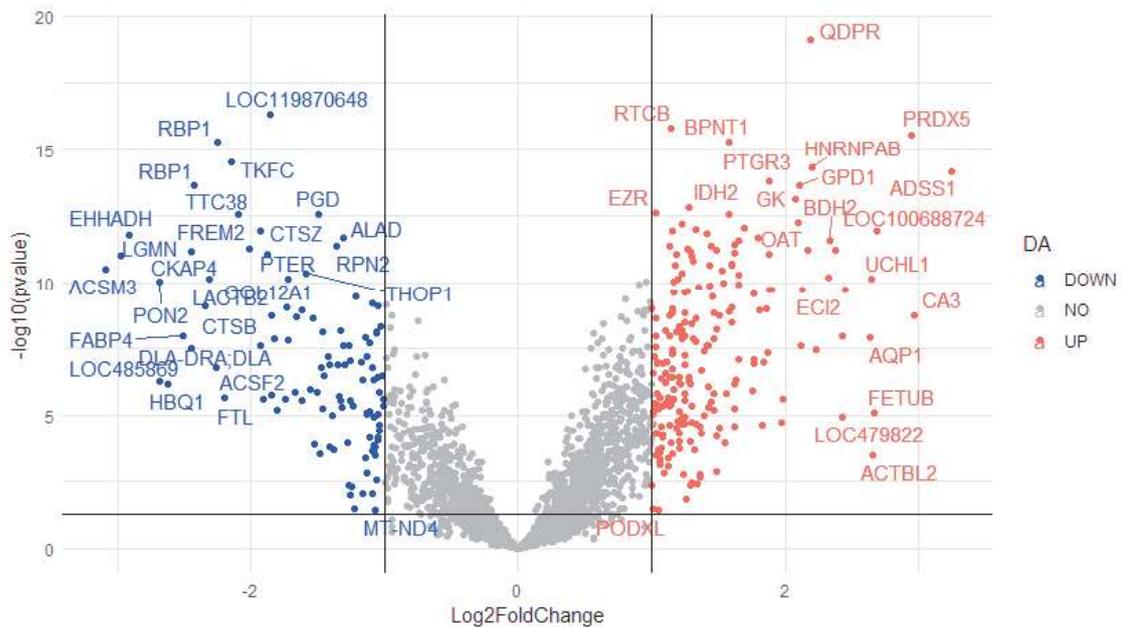


Figura 13. Volcano plot da diferença de expressão de proteínas entre achados em lobos-marinhos em relação às amostras de cachorro. O gráfico mostra os pontos correspondentes a cada proteína, onde o eixo x representa o log2 do *fold change* e o eixo y é o -log10 do valor de p. Proteínas com *fold change* maior que 1 ou menor que -1 e p menor que 0.05 foram classificadas como UP (para cima: maior em lobos) ou DOWN (para baixo: maior em cachorros).

618 As proteínas listadas nos "Top 10 DEqMS", "Top 10 UP" e "Top 10 Down"
 619 representam aquelas que foram identificadas como mais relevantes na análise de
 620 expressão gênica entre as duas espécies. Cada linha dessa seção indica o nome das
 621 proteínas e, estão organizadas com base na intensidade das alterações na expressão
 622 ($p \leq 0.05$ / $FC > 1$).

Tabela 3. Proteínas consideradas no *Volcano Plot* e significantes a 1% e 5% de FDR. As últimas três colunas destacam os top 10 grupos de proteínas com os valores de p mais intensos por contraste e algoritmo DEqMS. Em vermelho, proteínas reguladas positivamente (UP - vermelho), e em azul, negativamente (DOWN - azul) de lobos-marinhos em relação aos cachorros.

Contraste	Proteínas	Signif.	Top 10 DEqMS	Top 10 UP	Top 10 Down
<i>Arctocephalus australis</i> VS. <i>Canis lupus familiaris</i>	2488	209	QDPR	QDPR	LOC119870648
			LOC119870648	RTCB	RBP1
			RTCB	BPNT1	TKFC
			PRDX5	PTGR3	TTC38
			BPNT1	HNRNPAB	PGD
			RBP1	PRDX5	EHHADH
			TKFC	IDH2	FREM2
			HNRNPAB	GK	CTSZ
			ADSS1	GPD1	ALAD
			PTGR3	ADSS1	RPN2

QDPR: Redutase da diidropteridina quinóide, RTCB: Ligase de RNA RtcB homóloga, PRDX5: Peroxirredoxina-5, BPNT1: 3'(2'),5'-bisfosfato nucleotidase 1, RBP1: Proteína contendo domínio de ligação a ácidos graxos citosólica, TKFC: Triocinase/Ciclase FMN, HNRNPAB: Heteroous nuclear ribonucleoprotein A/B, ADSS1: Adenilossuccinato sintetase isoenzima, PTGR3: Redutase da prostaglandina 3, IDH2: Isocitrato desidrogenase [NADP], GK: Glicerol quinase, GPD1: Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)], TTC38: Proteína repetitiva de tetratricopeptídeo 38, PGD: 6-fosfogluconato desidrogenase, descarboxilante, EHHADH: Enzima bifuncional peroxissomal, FREM2: Proteína da matriz extracelular relacionada a FRAS1 2, CTSZ: Cathepsina X, ALAD: Desidratase de ácido delta-aminolevulínico, RPN2: Subunidade 2 da glicosiltransferase de proteína de dolichil-difosfooligossacarídeo (Anexo).

623 Para as proteínas com maior abundância lobos-marinhos (reguladas
624 positivamente) também estavam associadas a processos metabólicos, porém,
625 presentes em organelas e relacionadas a conjugados proteicos (Fig. 14).

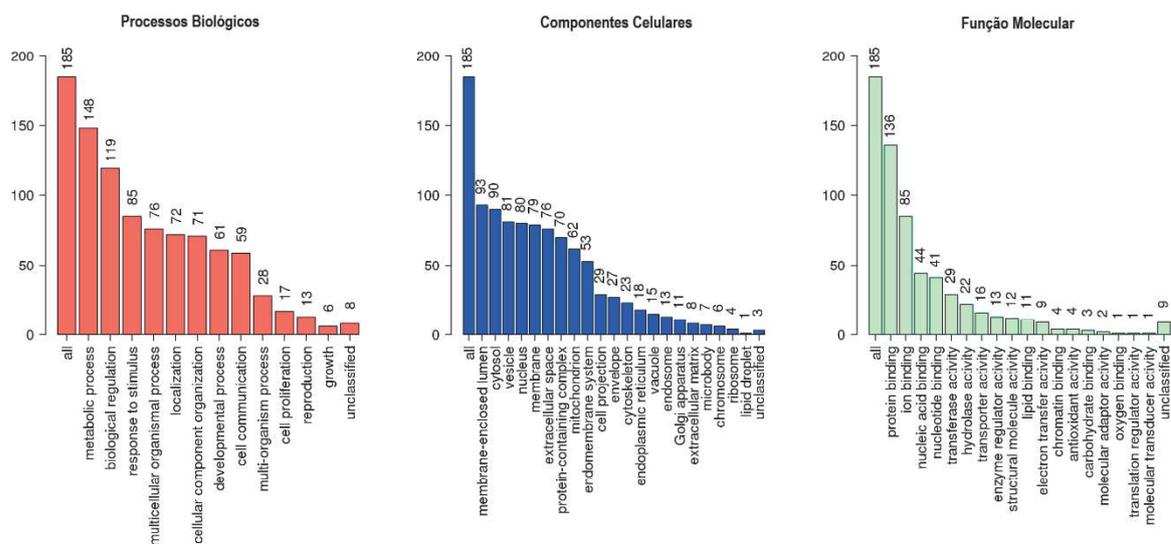


Figura 14. Anotações GO para proteínas reguladas positivamente nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos das proteínas positivamente reguladas em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris* utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse.

626 Na análise das proteínas diferenciais, 207 delas apareceram com maior
 627 abundância em lobos-marinhos. Ao analisar as vias com relação à função biológica
 628 em que estas estavam envolvidas, foi obtida a lista da figura 15A.

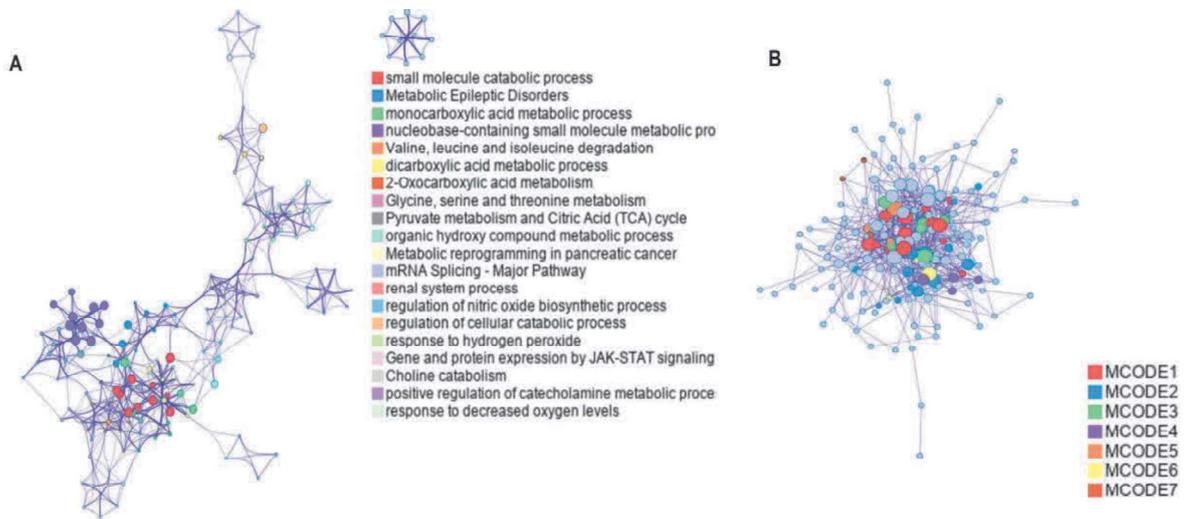


Figura 15. A. Vias relacionadas à função biológica das proteínas reguladas positivamente em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris*. B. Rede de interação de termos enriquecidos. Legenda MCODE (*Molecular Complex Detection*) para a descrição de vias enriquecidas.

629 Vários processos metabólicos e de transporte relacionados às proteínas
 630 positivamente reguladas (UP) foram encontrados (Figura 16) nas vias relacionadas à
 631 função molecular. Dentre os processos detectados, destacam-se o metabolismo de
 632 ácidos orgânicos, catabolismo de ácidos carboxílicos, processo metabólico de
 633 aminoácidos, catabolismo de aminoácidos. Além disso, processos relacionados à
 634 regulação genética, como *splicing* e metabolismo de RNA.

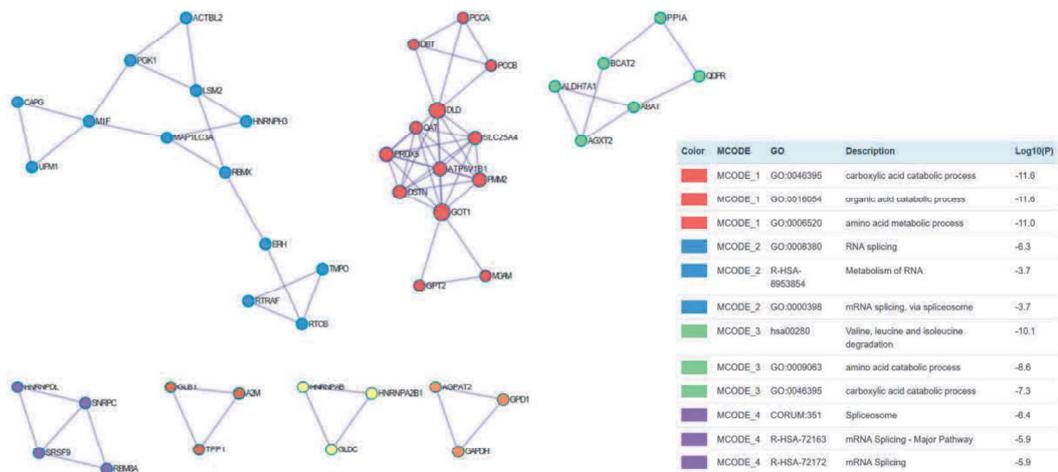


Figura 16. Rede de interação proteína-proteína em relação à função molecular e componentes MCODE (*Molecular Complex Detection*) identificados pelas proteínas positivamente reguladas em *Arctocephalus australis* quando comparada com *Canis lupus familiaris*. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$).

635 Para as proteínas reguladas negativamente em lobo-marinho-sul-americano,
 636 as anotações GO apontam que a maioria das proteínas analisadas também estava
 637 associada a processos metabólicos, presentes na membrana e relacionadas a
 638 conjugados proteicos (Fig. 17).

639

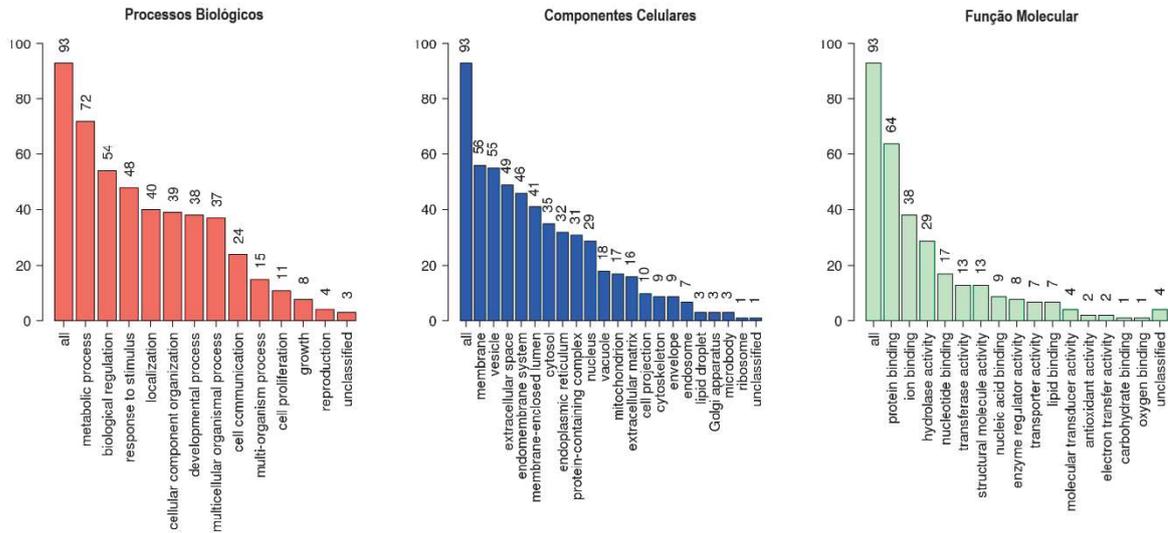


Figura 17. Anotações GO para proteínas reguladas positivamente nos termos do GO componente celular (a), GO função molecular (b), e GO de processos biológicos das proteínas negativamente reguladas em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris* utilizando *Homo sapiens* como organismo de interesse.

640 Para as negativamente reguladas, 100 proteínas diferenciais foram analisadas
 641 em vias metabólicas relacionadas à função biológica (Fig. 18).

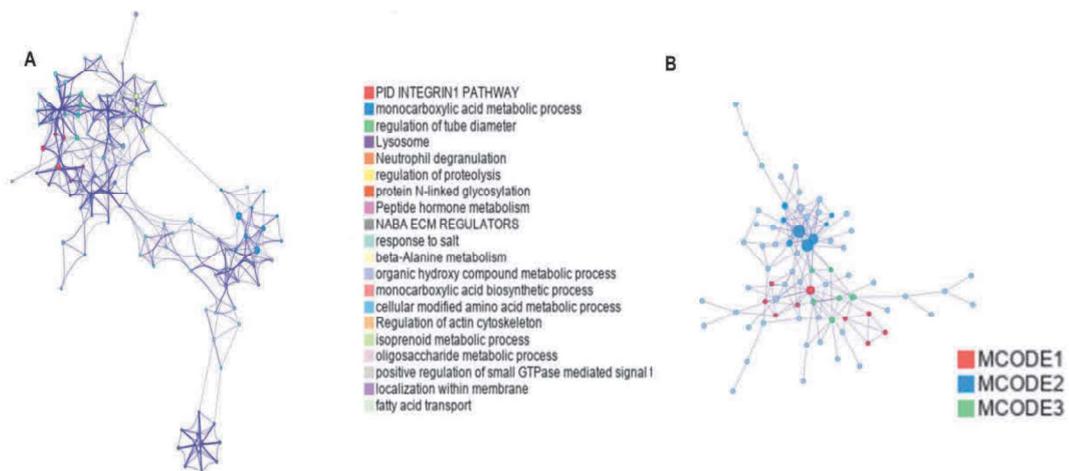


Figura 18. A. Vias relacionadas à função biológica das proteínas reguladas negativamente em *Arctocephalus australis* em relação à *Canis lupus familiaris*. B. Rede de interação de termos enriquecidos. Legenda MCODE (Molecular Complex Detection) para a descrição de vias enriquecidas.

642 Nas vias relacionadas à função molecular das proteínas negativamente
 643 reguladas (Figura 19), foram identificadas diversas categorias funcionais de proteínas

644 relacionadas à regulação da matriz extracelular e a processos de sinalização celular.
 645 Destacam-se os processos de: via de sinalização de integrina e suas interações e
 646 metabolismo de proteínas.

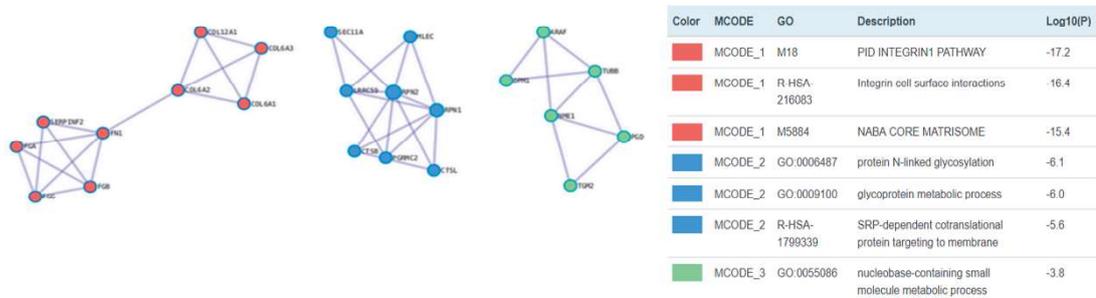


Figura 19. Rede de interação proteína-proteína em relação à função molecular e componentes MCODE (*Molecular Complex Detection*) identificados pelas proteínas negativamente reguladas em *Arctocephalus australis* quando comparada com *Canis lupus familiaris*. Os termos são apresentados em ordem decrescente de significância ($p \leq 0.01$).

5.3. Descrição das proteínas mais relevantes pelo DEqMS

647 O detalhamento dessas proteínas significantes na análise diferencial pode
 648 fornecer mais detalhes sobre suas funções biológicas específicas e possíveis
 649 contribuições destas para as mudanças observadas entre os animais, do nível
 650 molecular a eventos fenotípicos mais amplos nos sistemas biológicos.

651 **QDPR – *Quinoid dihydropteridine reductase*: Redutase de diidropteridina** 652 **quinóide**

653 A proteína QDPR proteína é essencial para o metabolismo de compostos
 654 nitrogenados em mamíferos, como parte da via metabólica de reciclagem de tetra-
 655 hidrobiopterina, um componente vital na síntese de neurotransmissores. Desempenha
 656 uma função molecular de atividade oxirredutase, agindo no grupo CH-OH de
 657 doadores, com NAD ou NADP como receptor.

658 Na subespécie *Canis lupus familiaris* (UniProtKB ID A0A8I3MGQ6), é
 659 conhecida como *Quinoid dihydropteridine reductase* com 242 aminoácidos e acredita-
 660 se que esta proteína esteja localizada no cromossomo 3 da espécie. A mesma
 661 proteína é encontrada na espécie *Zalophus californianus* (UniProtKB ID
 662 A0A6J2DJW1) sob o nome de *Dihydropteridine reductase* de mesmo tamanho, porém
 663 para esta, acredita-se que a localização seja no cromossomo 2 da espécie. A

664 diferença no nome pode indicar possíveis diferenças na especificidade das reações
665 enzimáticas ou nos substratos (dihidropteridina *versus* quinoides de dihidropteridina).

666 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

**LOC119870648 – Carbon-Nitrogen hydrolase domain-containing protein:
Proteína contendo domínio de hidrolase de carbono-nitrogênio**

667 A proteína LOC119870648 encontra-se possivelmente envolvida na hidrólise
668 de compostos contendo carbono e nitrogênio, especialmente em ligações lineares de
669 amidas.

670 Nos cães, a proteína (UniProtKB ID A0A8I3MVQ1), tem o gene localizado no
671 cromossomo 1 e é formada por 486 aminoácidos. Similarmente, em leão-marinho-da-
672 Califórnia, esta proteína (UniProtKB ID A0A6J2DS03) é nomeada de *panetheinase*
673 no gene LOC113927558 contendo um domínio *CN hydrolase* semelhante à proteína
674 do cão. Composta por 494 aminoácidos, seu gene está localizado no cromossomo 7.
675 Essas diferenças na sequência podem resultar em variações sutis na estrutura
676 tridimensional da proteína, embora a função principal permaneça similar.

677 A *panetheinase* nos cachorros está associada ao gene VNN1 com 514
678 aminoácidos em sua composição, identificado apenas nas amostras de cachorro.
679 Apesar dessa diferença, 449 dos 495 aminoácidos comparados são idênticos entre si,
680 o que representa uma similaridade de 91% entre essas duas sequências.

681 Esta proteína estava regulada negativamente em lobo-marinho-sul-americano.

**682 RTCB – RNA-splicing ligase RtcB homolog: Ligase de splicing de RNA
683 homóloga a RtcB**

684 Essa proteína atua como subunidade catalítica do complexo ligase tRNA-
685 *splicing*. Elas unem metades de tRNAs clivados a tRNAs de tamanho maduro,
686 incorporando fosfato de junção de clivagem derivado do precursor no tRNA maduro
687 como um fosfodiéster 3',5' canônico. Em ambas espécies (UniProtKB ID A0A8I3PDZ7
688 e A0A6J2CWW8) a proteína se apresenta com mesmo nome e são homólogas, com
689 505 aminoácidos. As similaridades na estrutura e sítios ativos sugerem uma alta
690 conservação funcional e estrutural na clivagem e conexão de moléculas de tRNA.

691 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

692 PRDX5 – Peroxiredoxin-5: Peroxirredoxina-5

693 A descrição para a proteína em *Canis lupus familiaris* (UniProtKB ID
694 A0A8I3Q4L7) e *Zalophus californianus* (UniProtKB ID A0A6J2BYV9) se refere à
695 mesma função para a peroxirredoxina-5 em ambas espécies. Ela desempenha um
696 papel de peroxidase específica para tiol, reduzindo o peróxido de hidrogênio e
697 hidroperóxidos orgânicos para água e álcoois, respectivamente. Essa função ajuda na
698 proteção celular contra o estresse oxidativo, desintoxicando peróxidos, além de atuar
699 como sensor para eventos de sinalização mediados pelo peróxido de hidrogênio.

700 Apesar de pertencerem à mesma família de peroxirredoxinas-5, exibem
701 diferenças na extensão de aminoácidos: a versão encontrada nos cachorros possui
702 348 aminoácidos, enquanto a encontrada em leões-marinhos possui 319. Essas
703 variações na extensão podem indicar diferenças estruturais ou funcionais entre as
704 versões encontradas nessas espécies distintas, apesar de pertencerem à mesma
705 família de proteínas.

706 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

707 **BPNT1 – 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1: Nucleotidase 3'(2'),5'-bisfosfato**
708 **1**

709 A proteína BPNT1, também conhecida como bisfosfato 3-prime-nucleotidase
710 ou BPntase, pertence a uma família de fosfomonosterases dependentes de magnésio.
711 A função principal dessa proteína é a conversão de adenosina 3'-fosfato 5'-fosfosulfato
712 (PAPS) para adenosina 5'-fosfosulfato (APS) e de 3'(2')-fosfoadenosina 5'-fosfato
713 (PAP) para adenosina monofosfato (AMP). Elas desempenham um papel na
714 regulação dessas moléculas nucleotídicas em seus respectivos organismos, embora
715 possam existir diferenças sutis em sua expressão ou atividade entre as espécies
716 devido ao ambiente ou à adaptação específica de cada uma delas.

717 Na subespécie *Canis lupus familiaris* (UniProtKB ID A0A8I3PXH2), a proteína
718 é identificada como 3'(2'), 5'-bisphosphate nucleotidase 1, composta por 348
719 aminoácidos, presumivelmente localizada no cromossomo 38. Para a espécie *Z.*
720 *californianus* (UniProtKB ID A0A6J2EJV0), a proteína tem o mesmo nome, com um
721 tamanho equivalente e é possivelmente localizada no cromossomo 10.

722 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

723 **RBP1 – Cytosolic fatty-acid binding proteins domain-containing protein:**
724 **Proteína contendo domínio de proteínas de ligação a ácidos graxos citosólicos**

725 Embora o gene seja encontrado nas duas espécies, a proteína apresentada é
726 diferente. Na subespécie *Canis lupus familiaris*, a proteína (UniProtKB ID
727 A0A8I3Q2C2) é identificada como contendo o domínio de ligação a ácidos graxos
728 citosólicos, com 332 aminoácidos e possivelmente localizada no cromossomo 23. É
729 associada com funções no transporte, na biossíntese de ácido retinóico e no
730 metabolismo de vitamina A. Esta proteína também é encontrada no citosol. Já na
731 espécie *Z. californianus*, a proteína (UniProtKB ID A0A6J2C748) é identificada como
732 proteína de ligação ao retinol 1, composta por 135 aminoácidos, possivelmente
733 localizada no cromossomo 1 e também encontrada no citosol.

734 Esta proteína estava regulada negativamente em lobo-marinho-sul-americano.

735 **TKFC – *Triokinase/FMN cyclase*: Triocinase/ciclase de FMN**

736 A proteína TKFC, representada pelos UniProt IDs A0A6J2BNN5 para o leão-
737 marinho-da-Califórnia e F1Q0K5 para o cão doméstico, é essencial na conversão de
738 FAD (*Flavin Adenine Dinucleotide*) em AMP, H⁺ e riboflavina ciclo-4',5'-fosfato. Essa
739 atividade catalítica sugere uma função bifuncional como quinase de triose e como uma
740 liase (enzimas que adicionam ou removem elementos de água, amônia ou dióxido de
741 carbono) FAD-AMP. A comparação das informações das duas espécies revela
742 semelhanças nas características de ligação e atividade de sítio ativo, bem como a
743 predição de domínios DhaK e DhaL que sugerem funções semelhantes. Essa análise
744 comparativa destaca a funcionalidade essencial dessa proteína em diferentes
745 espécies.

746 Esta proteína estava regulada negativamente em lobo-marinho-sul-americano.

747 **HNRNPAB – *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B*: Ribonucleoproteína** 748 **heteronuclear A/B**

749 Essas proteínas estão associadas aos pré-mRNAs no núcleo celular,
750 influenciando o processamento do RNA e seu transporte. Possui papel de regulação
751 da expressão genética e facilitando a síntese, processamento e transporte de mRNA.
752 Ela influencia a estrutura do RNA e participa do processo de *splicing*, removendo
753 íntrons para formar o mRNA maduro. Além disso, faz parte da subfamília das
754 ribonucleoproteínas heterogêneas nucleares (hnRNPs), produzidas pela RNA
755 polimerase II. A HNRNPAB, que possui domínios de reconhecimento de RNA (RRM),
756 interage com componentes do editossomo e possui múltiplas isoformas devido a
757 variantes de transcritos alternativos.

758 Cachorros e lobos-marinhos (UniProtKB IDs A0A8I3N8K2 e A0A6J2E361,
759 respectivamente) compartilham a mesma proteína codificada pelo gene com 285
760 aminoácidos nos primeiros e 361 nos últimos. No entanto, embora a função seja
761 conservada, existem possíveis diferenças nas isoformas produzidas por cada espécie,
762 sugerindo variações nas transcrições dos *splices*. Essas diferenças podem refletir
763 adaptações específicas entre as espécies devido à evolução ou à regulação
764 diferencial.

765 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

766 **ADSS1 – Adenylosuccinate synthetase isozyme 1: Isoenzima da sintetase de** 767 **adenilosuccinato**

768 A proteína ADSS1 participa do metabolismo de purinas. Sua função é na
769 regulação dos níveis de IMP (inosina monofosfato) e AMP em diferentes tecidos,
770 contribuindo ativamente para processos metabólicos vitais, como glicólise e
771 amoniogênese. Essa proteína é essencial na síntese *de novo* dos nucleotídeos de
772 purina, catalisando a conversão de GTP, IMP e L-aspartato em GDP, 2 íons de
773 hidrogênio, N6-(1,2-dicarboxietil)-AMP e fosfato. A presença dos íons de magnésio
774 (Mg^{2+}) é crucial como cofator nesse processo. Além disso, a ASS1 apresenta sítios de
775 ligação e ativos específicos que influenciam suas interações moleculares e suas
776 atividades bioquímicas.

777 A proteína representada nos grupos (UniProtKB IDs A0A8C0SRK3 no cão e
778 A0A6J2B984 no leão-marinho-da-Califórnia) exibem semelhanças estruturais e
779 funcionais significativas, visto que são ortólogas e pertencem à mesma família de
780 enzimas. Possui 457 aminoácidos. Para os cães é encontrada no cromossomo 8, e
781 para os leões-marinhos, no 6. Estas variações estruturais podem refletir adaptações
782 específicas de cada espécie, possivelmente em resposta a ambientes metabólicos
783 distintos ou às exigências fisiológicas particulares encontradas em cada organismo.

784 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

785 **PTGR3 – Prostaglandin reductase 3: Redutase de prostaglandina 3**

786 A proteína PTGR3 é encontrada em *Canis lupus familiaris* (UniProtKB ID
787 A0A8I3MDE7) composta por 377 aminoácidos e com gene codificador no
788 cromossomo 1. A função dessa proteína está associada à redução de prostaglandinas
789 e à regulação negativa da diferenciação de células adiposas. É encontrada

790 principalmente no peroxissoma. Apresenta atividade de ligação de íon zinco e está
791 dentro da família de álcool desidrogenase que contém zinco. A proteína *Prostaglandin*
792 *Reductase 3 isoform X1*, encontrada em leão-marinho no gene ZADH2 (UniProtKB ID
793 A0A6J2BLW1) no cromossomo 14, também é uma enzima composta por 377
794 aminoácidos associada à atividade de oxirredução na família de álcool desidrogenase.
795 A função específica como redutora de prostaglandinas é prevista para ambas
796 proteínas.

797 Esta proteína estava regulada positivamente em lobo-marinho-sul-americano.

6. Discussão

798 Ao examinar proteomas de diferentes tecidos, como fígado, músculo, rim,
799 sangue e urina, observamos que a análise proteômica apresenta resultados diferentes
800 entre si, refletindo a heterogeneidade inerente a cada tecido. Dentro dos rins, as
801 células glomerulares, endoteliais e tubulares podem apresentar variações tanto
802 morfológicas quanto moleculares em seus efetores. Assim, em estudos do proteoma
803 renal, a inclusão de múltiplos indivíduos de uma mesma espécie proporciona uma
804 visão ampla do proteoma médio e facilita a identificação de proteínas altamente
805 expressas e suas variações.

806 A função celular depende da capacidade da célula de se adaptar às mudanças
807 nas condições físicas ou bioquímicas do ambiente externo e encontrar as condições
808 ideais de funcionamento (Hochachka e Somero, 2002). O estresse osmótico é um
809 desafio significativo para os organismos, sendo um dos principais desencadeadores
810 da resposta ao estresse celular (Ortiz, 2001; Ortiz et al., 2002a; Kültz, 2020). As
811 células precisam ajustar sua homeostase para enfrentar as variações osmóticas e as
812 proteínas envolvidas nas respostas de estresse celular representam as mais
813 altamente conservadas entre todos os organismos (Kültz, 2020).

814 As proteínas mais relevantes da análise estão em grande parte envolvidas com
815 processos biológicos fundamentais, abrangendo desde a regulação do metabolismo
816 energético, resposta ao estresse oxidativo, metabolismo de RNA, até funções
817 relacionadas à produção e processamento de moléculas essenciais para o
818 funcionamento celular. Elas desempenham papéis críticos na geração de energia,
819 estabilidade do RNA, defesa antioxidante e diversos outros processos celulares
820 essenciais para a homeostase e sobrevivência celular.

821 Ao considerar a importância da conservação dessas proteínas, as variações
822 nas isoformas podem representar uma especialização adaptativa para enfrentar o
823 estresse osmótico no ambiente marinho (Stastna e Van Eyk, 2012). Estas adaptações
824 moleculares podem incluir modificações nas propriedades físicas e bioquímicas das
825 proteínas, conferindo aos lobos-marinhos a capacidade de manter a homeostase
826 celular diante das condições osmóticas do oceano. A presença de diferentes
827 isoformas permite uma resposta mais flexível a esses desafios, possibilitando ajustes
828 específicos para otimizar a funcionalidade das proteínas em diferentes contextos
829 fisiológicos. Dessa forma, as isoformas desempenham um papel crucial na
830 capacidade adaptativa desses animais, contribuindo para a regulação fina dos
831 processos celulares e assegurando a eficiência na resposta aos estímulos ambientais.

832 A regulação do meio interno pelos rins envolve quatro processos principais: a
833 filtração do plasma sanguíneo pelos glomérulos, a reabsorção seletiva pelos túbulos,
834 a secreção pelos túbulos e a troca de íons H^+ e produção de amônia para a
835 conservação de bases. Esses processos são essenciais para o equilíbrio ácido-base
836 e a eliminação eficiente de resíduos metabólicos. Nesse estudo foi possível
837 correlacionar os achados com essas funções renais tão fundamentais para a
838 manutenção da homeostase do organismo.

839 Nas subseções a seguir serão discutidos os principais processos envolvidos
840 com esta adaptação molecular ao ambiente marinho e a osmorregulação como evento
841 fundamental à esta conquista.

6.1. Processos metabólicos envolvidos com a adaptação molecular ao ambiente marinho e a osmorregulação

842 Nessa subseção serão discutidos alguns pontos principais para a adaptação
843 da osmorregulação de acordo com a literatura ao que se refere aos seguintes
844 processos: processo catabólico de moléculas pequenas; processo metabólico de
845 moléculas pequenas contendo nucleobases; processo metabólico de ácido
846 monocarboxílico; processo metabólico de ácido dicarboxílico; processo metabólico de
847 3-oxocarboxílico; degradação de valina, leucina e isoleucina; metabolismo de glicina,
848 serina e treonina; metabolismo de piruvato e ciclo do ácido cítrico (CAC); processo
849 metabólico de compostos orgânicos hidroxílicos e reprogramação metabólica da
850 insulina.

851 Os rins são responsáveis pela reabsorção de aminoácidos e glicose, além de
 852 participarem ativamente da produção de glicose, lactato e piruvato, por meio da via da
 853 gliconeogênese (Fig. 20). Esse órgão também faz papel regulador no equilíbrio ácido-
 854 base por meio do metabolismo interorgânico da glutamina. Além disso, é responsável
 855 pela síntese de arginina, tirosina e glicina (Li et al., 2020).

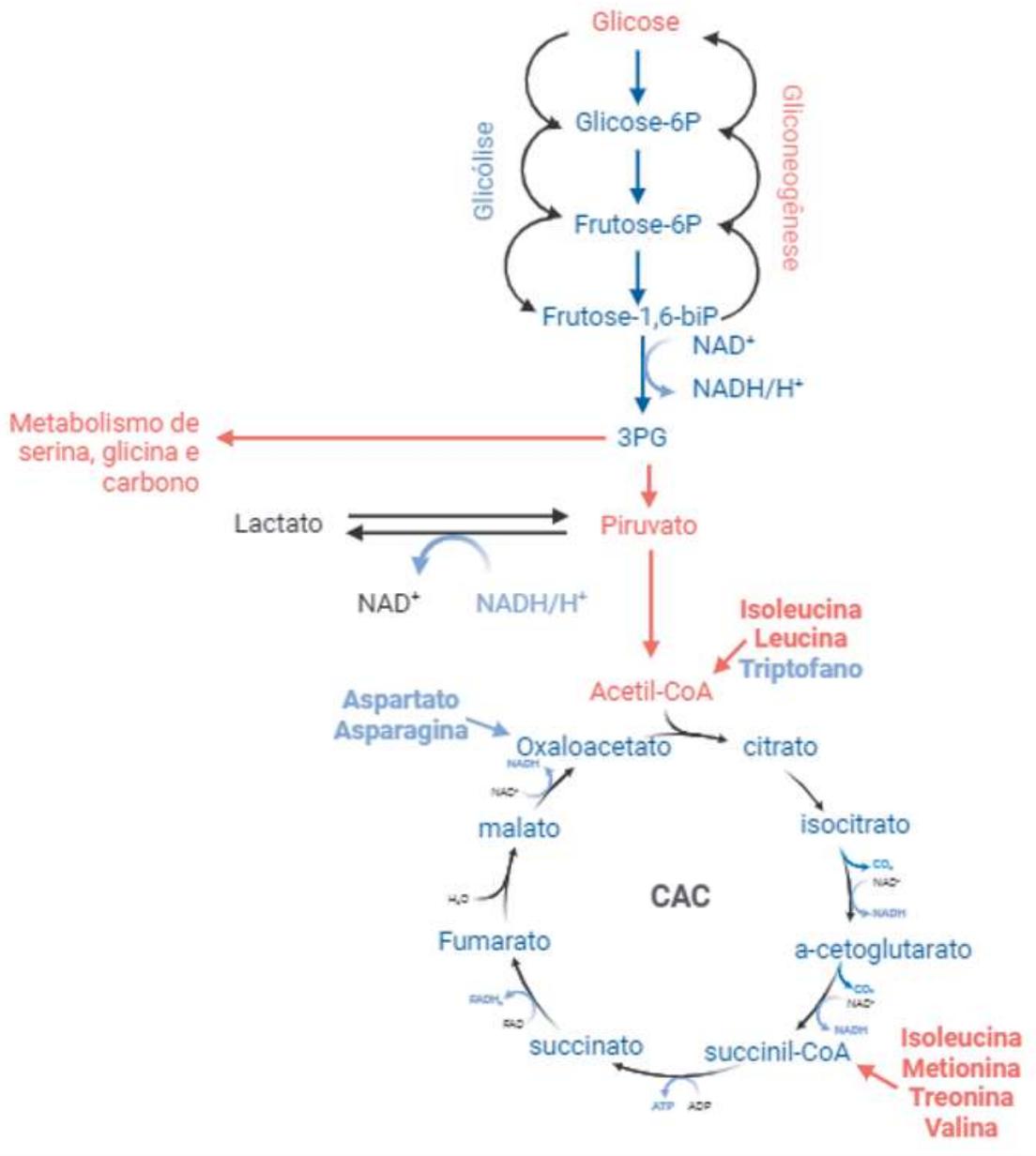


Figura 20. Via metabólica de glicose, lactato e piruvato, por meio da via da glicólise e gliconeogênese. E o metabolismo do ciclo do ácido cítrico.

856 Durante a evolução, os cães domésticos se adaptaram a dietas onívoras
 857 (Bradshaw, 2006; Li e Wu, 2023) obtendo amido de ingredientes vegetais, enquanto
 858 os lobos-marinhos permaneceram carnívoros obrigatórios. Quando as dietas não
 859 fornecem quantidade suficiente de amido, glicogênio ou glicose, os organismos

860 precisam sintetizar glicose a partir de aminoácidos glicogênicos em seus fígados e
861 rins (Belo et al., 1976). A carne contém apenas uma pequena quantidade de
862 glicogênio, assim, a gliconeogênese feita a partir de aminoácidos desempenha um
863 papel essencial no fornecimento de glicose para o cérebro, glóbulos vermelhos e
864 imunócitos, sendo a via crucial para a sobrevivência desses animais (Li e Wu, 2023),

865 O rim é um regulador ativo dos níveis plasmáticos de glicose, sendo capaz de
866 evitar extremos glicêmicos e fazer a manutenção da homeostase da glicose (Baker e
867 Czarnecki-Maulden, 1991; Cersosimo, 2004). A síntese e a degradação da
868 glicose são as vias de controle dos níveis de glicose no organismo. Em jejum
869 prolongado ocorre a diminuição dos níveis plasmáticos de glicose, aminoácidos e
870 triglicerídeos levando à redução da secreção de insulina e ao aumento do glucagon,
871 que pode explicar a regulação negativa de hormônios peptídicos (Fig. 21). Nessa
872 situação, o rim faz gliconeogênese, produzindo glicose a partir de aminoácidos e
873 outros precursores para manter níveis adequados de glicose na circulação sanguínea
874 (Nelson e Cox, 2011).

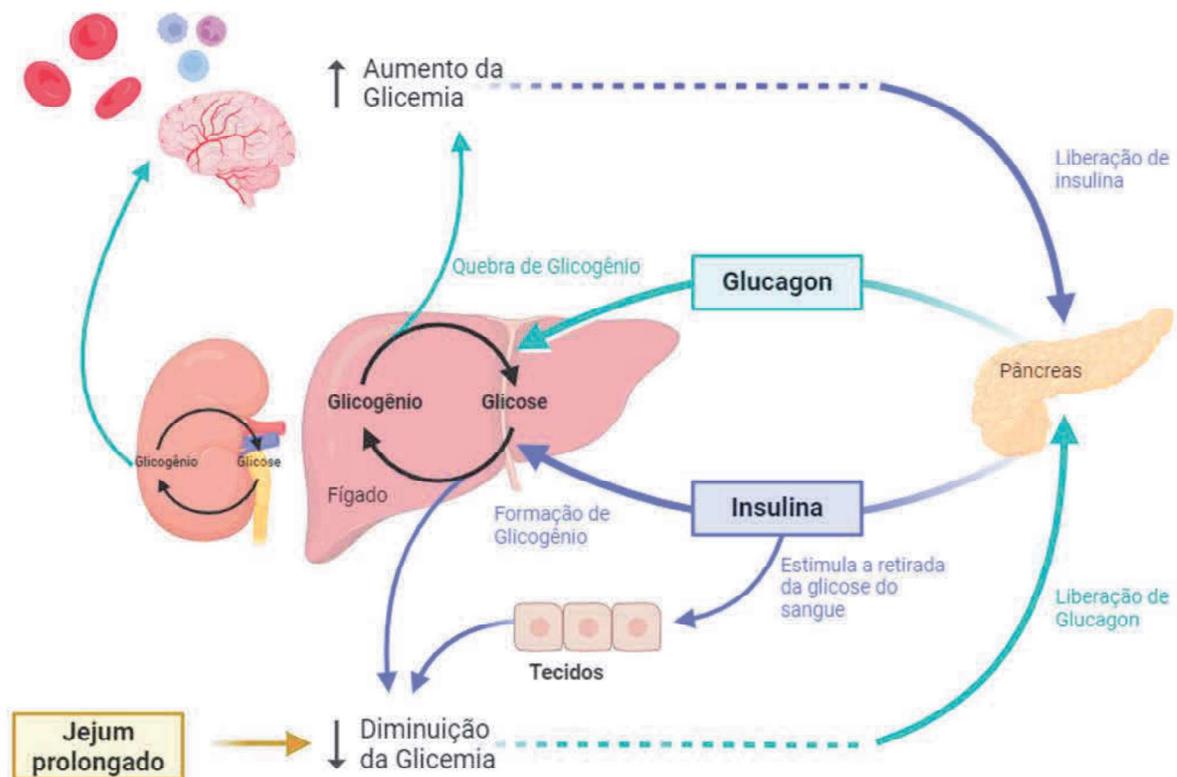


Figura 21. Ação do rim e do fígado na situação de jejum prolongado, onde o rim é um regulador ativo dos níveis plasmáticos de glicose e garante o fornecimento adequado de glicose para os glóbulos vermelhos, imunócitos e cérebro.

875 No contexto dos resultados encontrados nesse estudo, a identificação de vias
876 reguladas positivamente em lobos-marinhos, especificamente relacionadas à
877 glicólise, gliconeogênese, biossíntese e degradação de aminoácidos, bem como o
878 metabolismo de carbono, fornece uma visão aprofundada das adaptações
879 moleculares desses animais. Essas vias são diretamente relacionadas à geração de
880 energia celular, ressaltando a importância de processos metabólicos específicos para
881 sustentar as demandas fisiológicas únicas dos lobos-marinhos incluindo as complexas
882 interações entre dieta e metabolismo na adaptação evolutiva. Além disso, a glicina é
883 um componente essencial para a digestão de gorduras e absorção de ácidos graxos
884 longos e desempenha papéis importantes na regulação metabólica, sendo associada
885 inclusive ao aumento da capacidade antioxidante e promoção da síntese proteica
886 (Wang et al., 2013).

887 A valina, leucina e isoleucina são AAs de cadeia ramificada (AACR). Ao
888 contrário da maioria dos AAs essenciais, os AACR também são metabolizados nos
889 rins, portanto, sujeito a alterações funcionais e morfológicas (Shimomura et al., 2006;
890 Li e Wu, 2023). Glicina, serina e treonina são aminoácidos que passam por diversas
891 vias metabólicas no organismo. Os principais locais de síntese de serina são o fígado
892 e o rim. A glicina pode ser sintetizada a partir da serina e a via secundária para a
893 produção desta envolve a degradação de treonina (Smith et al., 2007). Esses
894 aminoácidos são essenciais para a síntese de muitas proteínas, formação de
895 compostos estruturais e a regulação geral do metabolismo.

896 Os achados nas vias positivamente reguladas nos rins de lobos-marinhos
897 sugerem adaptações metabólicas específicas com os processos catabólicos de ácido
898 carboxílico e ácido orgânico destacados. A conexão entre os AACR com essas vias
899 metabólicas pode indicar estratégias distintas para lidar com a disponibilidade variável
900 de nutrientes no ambiente marinho (Wang et al., 2013). Além disso, a análise das vias
901 metabólicas envolvendo aminoácidos essenciais, como glicina, serina e treonina,
902 oferece *insights* sobre a capacidade dos rins desses animais para sintetizar
903 aminoácidos e manter a estabilidade metabólica, mesmo em condições desafiadoras
904 de dieta. A síntese de serina no rim, a conversão entre glicina e serina, e a degradação
905 de treonina para a produção de glicina destacam-se nessas vias metabólicas (Smith
906 et al., 2007). Além de desempenharem papéis fundamentais na síntese proteica,

907 esses aminoácidos também desempenham um papel central na regulação do
908 metabolismo, tendo importância fundamental para as funções celulares e sistêmicas.

909 O metabolismo do piruvato e o ciclo do ácido cítrico (CAC) são as principais
910 fontes de energia celular e participam de muitas vias metabólicas nas células. A
911 atividade funcional do néfron demanda um intenso consumo energético decorrente da
912 atividade metabólica, resultando em um consumo elevado de ATP no organismo. A
913 maior parte desse consumo de oxigênio está relacionada ao transporte tubular
914 mediado pela Na^+/K^+ -ATPase (Lutaif e Gontijo, 2009).

915 As bombas de sódio/potássio (Na^+/K^+) são proteínas transmembrana que
916 participam da manutenção do equilíbrio eletroquímico celular. Presentes em todas as
917 células do corpo, essas bombas realizam o transporte de íons de sódio e potássio,
918 contribuindo para a estabilidade do ambiente intracelular. A estrutura dessas bombas
919 consiste em subunidades α , que contêm sítios de ligação para íons e moléculas
920 regulatórias, além de subunidades β que estabilizam a estrutura na membrana e
921 subunidades γ . Existem evidências *in vivo* indicando a presença de uma subunidade
922 γ adicional expressa exclusivamente na medula externa e interna do rim. Esta
923 subunidade adicional tem o potencial de modular a afinidade da Na^+/K^+ -ATPase para
924 o ATP, o sódio e o potássio (Wetzel e Sweadner, 2001; Kuper et al., 2007).

925 Nesse caso, os achados conseguem destacar a correlação da atividade
926 funcional do néfron e da regulação iônica renal com o metabolismo energético das
927 células. A elevada demanda de ATP associada à atividade metabólica do rim,
928 conforme discutido por Lutaif e Gontijo (2009), mostra a necessidade da eficiência na
929 produção de energia para sustentar as funções renais, sendo esse processo
930 alimentado pelos metabolismos do piruvato e do CAC.

931 A Alça de Henle realiza a reabsorção de água e NaCl , K^+ , Ca_2 e HCO_3^- filtrados.
932 A ATPase no ramo ascendente é impermeável e essencial para esse processo de
933 reabsorção de solutos, o ramo descendente é permeável à água. O túbulo distal e o
934 ducto coletor realizam a reabsorção de NaCl filtrado e são permeáveis na presença
935 de vasopressina (liberada em resposta à hipotensão, estresse, desidratação e
936 aumento da osmolaridade sanguínea). No túbulo distal ainda há troca iônica, com a
937 aldosterona promovendo a absorção de Na^+ e secreção de K^+ . Por isso, a relação
938 entre o transporte tubular mediado pela Na^+/K^+ -ATPase e o consumo elevado de

939 oxigênio sugere que essas bombas desempenham um papel crucial na homeostase
940 iônica renal dos lobos-marinhos visto que foi possível encontrar alteração nas vias
941 relacionadas e de aquaporinas já demonstradas como essenciais na adaptação de
942 mamíferos aos ambientes marinhos (Kuper et al., 2007; Xu et al., 2013; Pedro et al.,
943 2015). Essas relações sugerem que o rim, ao modular o metabolismo energético e o
944 transporte iônico, desempenha um papel central na manutenção da homeostase
945 eletroquímica sendo essencial na presença de um ambiente hiperosmótico como a
946 água salgada.

6.2. Processos celulares e moleculares envolvidos com a adaptação molecular ao ambiente marinho e a osmorregulação

947 Estímulos ambientais, variações de temperatura, choques osmóticos, estresse
948 oxidativo, privação de aminoácidos e esgotamento de nitrogênio provocam alterações
949 na transcrição do DNA, frequentemente acompanhadas por mudanças na estabilidade
950 do mRNA (Burg et al., 1996).

951 As células reagem ao aumento da osmolalidade com inúmeras alterações na
952 expressão gênica. Os genes afetados podem variar entre espécies, mas os efeitos
953 osmoprotetores dos produtos gênicos são semelhantes, principalmente a acumulação
954 celular de osmólitos orgânicos compatíveis (Yancey et al., 1982; Burg et al., 1997;
955 Dihazi et al., 2005). Diante de estresses físicos e químicos que interferem na forma
956 das proteínas e nos processos metabólicos normais, as células respondem ativando
957 estratégias de expressão gênica. E o *splicing* de pré-mRNA atua como um ponto
958 central para integrar as respostas da célula diante diferentes tipos de estresse,
959 coordenando a expressão dos genes de maneira adaptativa (Biamonti e Caceres,
960 2009; Kawa e Testerink, 2017).

961 A principal via do *splicing* de mRNA refere-se ao processo pelo qual os íntrons
962 são removidos e os éxons são unidos para formar um mRNA maduro. E de acordo
963 com Kawa e Testerink (2017) em seus achados, existe uma conexão direta entre a
964 maquinaria de *splicing* e as respostas ao estresse salino em plantas. No estudo, eles
965 indicam uma série de fatores ligados à resposta osmótica, em que maioria está
966 relacionada ao processo de *deccaping* do mRNA e, como consequência, à
967 degradação de transcritos.

968 O *splicing* alternativo do RNA mensageiro é uma fonte importante de
969 diversidade proteica celular (Black, 2000). As mudanças nas vias de *splicing* de mRNA
970 e no spliceossoma alteradas e significativas nos lobos-marinhos atuam na regulação
971 da expressão gênica adaptativa nos rins, descritos aqui no contexto da resposta ao
972 estresse salino. Isso contribui significativamente para a eficiente eliminação de íons
973 em excesso e a retenção essencial de água. Considerando o que foi abordado por
974 Kawa e Testerink (2017), onde os fatores relacionados à resposta osmótica estão
975 ligados ao processo de *decapping* do mRNA e à subsequente degradação de
976 transcritos, a identificação dessas adaptações moleculares nas vias de *splicing* pode
977 ser uma das respostas genéticas que levaram à regulação da adaptação ao ambiente
978 marinho.

979 Schießl et al., (2013) investigou o impacto da ingestão de sal no *splicing*
980 diferencial do co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$, (NKCC2), essencial para a reabsorção de
981 sódio na alça de Henle. Em camundongos com diferentes dietas de sal, observaram-
982 se mudanças nas isoformas NKCC2A e NKCC2B, influenciadas pela ingestão de sal,
983 medicamentos e o hormônio angiotensina II. Tanto a restrição quanto o excesso de
984 água afetaram a expressão das isoformas, concluindo que o *splicing* do NKCC2 é
985 sensível à ingestão de sal, desempenhando um papel na adaptação renal.

986 Como não há evidências para a importância do *splicing* relacionadas à ingestão
987 de sal em mamíferos marinhos, é possível extrapolarmos a resposta adaptativa de
988 outros estudos, como o de Schießl et al., (2013). Em Shehata (2009), o papel do
989 *splicing* alternativo da subunidade α do ENaC sugerem que adaptações genéticas
990 podem ocorrer em resposta à ingestão de sal para otimizar a homeostase iônica em
991 ratos. Além disso, considerando também a influência do *splicing* na evolução das
992 proteínas, como abordado em Parmley et al. (2007), é possível sugerir que a
993 otimização do *splicing* próximo às fronteiras íntron-éxon pode estar ligada à eficiência
994 metabólica em ambientes com restrição hídrica e elevada ingestão de sal. Portanto, a
995 via destacada nesse estudo pode discutir que a restrição de água para o
996 funcionamento metabólico tenha desencadeado a resposta gênica da adaptação.

997 Nesse contexto, a adaptação renal deve considerar não apenas os aspectos
998 moleculares diretos, mas também as interações com a matriz extracelular (ECM, do
999 inglês *Extracellular Matrix*). As integrinas são uma família de moléculas de adesão
1000 envolvidas com mecanotransdução e sinalização de fatores de crescimento e

1001 participam da regulação da organização citoesquelética, bem como da ativação das
1002 MAP quinases. Nossas descobertas indicam uma regulação negativa de integrina-1
1003 em lobos-marinhos em comparação com cães.

1004 Corroborando com os achados deste trabalho, Sheikh-Hamad et al. (1997)
1005 registraram a expressão e indução hipertônica da beta 1-integrina em células renais
1006 de cães e, demonstraram que CD9 e beta 1-integrina são expressos de maneira
1007 coordenada na membrana celular, indicando a formação de um grupo de proteínas de
1008 membrana integral. Essa associação parece desempenhar um papel crucial na
1009 adaptação das células renais ao estresse osmótico, possivelmente desencadeando
1010 ajustes regulatórios. Essas adaptações provavelmente envolvem modificações na
1011 resposta ao estresse osmótico, com potencial impacto na expressão e interação das
1012 integrinas. Essa observação é reforçada pela análise do termo GO, que revela a
1013 presença significativa de muitas proteínas associadas ao componente 'membrana' nos
1014 lobos-marinhos no contexto do experimento.

6.3. Sinalização Celular e Transporte Molecular: envolvidos com a adaptação molecular ao ambiente marinho e a osmorregulação

1015 Os rins são responsáveis pela regulação do volume e composição do líquido
1016 extracelular, e ajustam a quantidade de água e eletrólitos para garantir a estabilidade
1017 e integridade fisiológicas. Além disso, a síntese de hormônios como eritropoietina,
1018 renina e calcitriol desempenha papéis cruciais na regulação da pressão sanguínea,
1019 produção de células vermelhas e metabolismo do cálcio. São órgãos que participam
1020 ativamente na formação da urina, filtrando o plasma sanguíneo para concentrar e
1021 remover resíduos metabólicos e contribuem para a conservação de proteínas,
1022 regulando a quantidade perdida na urina (Ortiz, 2001; Tuma et al., 2016).

1023 Nos processos de absorção, metabolismo e utilização, a maioria dos nutrientes
1024 e os metabólitos precisam ser transportados através das membranas celulares por
1025 meio de vários transportadores. Em relação ao transporte de ácidos graxos, estudos
1026 indicam que apenas uma fração dos ácidos graxos de cadeia longa consegue penetrar
1027 nas células através de proteína transportadora de ácidos graxos (FATP) (Tseng e
1028 Hwang, 2008). Além disso, evidências sugerem que a regulação da expressão e
1029 atividade desses transportadores desempenha um papel crucial na adaptação das
1030 células a diferentes condições fisiológicas e ambientais. Hormônios e citocinas, como

1031 aqueles mencionados por Frohnert et al. (1999) e Pohl et al. (2004), têm sido
1032 identificados como moduladores potenciais da expressão da FATP, indicando uma
1033 complexa rede de regulação. A insulina, por exemplo, demonstrou induzir a
1034 translocação da FATP nas membranas plasmáticas murinas, resultando em um
1035 aumento na captação de ácidos graxos de cadeia longa.

1036 A participação de proteínas transportadoras de ácidos graxos em lobos-
1037 marinhos, associada à regulação negativa da via de transporte de ácidos graxos,
1038 sugere uma possível correlação com a condição de isquemia transitória. Estudos
1039 indicam que uma fração limitada de ácidos graxos de cadeia longa consegue penetrar
1040 nas células por meio dessas proteínas (Tseng e Hwang, 2008). Esses ácidos graxos
1041 desempenham várias funções cruciais em organismos multicelulares, sendo a
1042 principal fonte de energia para o coração, e capazes de serem oxidados por vários
1043 tecidos para atender às suas necessidades energéticas. Portanto, essa alteração
1044 pode estar relacionada às adaptações cardiovasculares desses animais, como
1045 evidenciado em estudos sobre focas, que enfrentam períodos de hipóxia durante
1046 mergulhos, resultando em episódios de isquemia regional e reperfusão abrupta
1047 (Elsner et al., 1998; Fahlman et al., 2017).

1048 A via JAK/STAT que foi encontrada positivamente regulada em lobos-marinhos
1049 é composta por Janus Quinases (JAKs) e Fatores de Transcrição e Ativadores de
1050 Transcrição (STATs), e é uma cascata de sinalização conservada nos animais que
1051 participa de diversas respostas celulares, como proliferação, diferenciação, migração,
1052 apoptose e sobrevivência celular (Simon et al., 1998). A ativação dessa via é essencial
1053 para processos de desenvolvimento e homeostase, incluindo hematopoiese,
1054 desenvolvimento de células imunes, manutenção de células-tronco e crescimento.
1055 Evidências recentes apontam que a via JAK/STAT também desempenha um papel
1056 significativo em diversas respostas celulares a diferentes formas de estresse
1057 biológico, incluindo hipóxia/reperfusão, endotoxina, luz ultravioleta e
1058 hiperosmolaridade (Dudley et al., 2004).

1059 A ativação de STATs, mediada por fatores como estresse oxidativo, pode
1060 influenciar a expressão gênica e desencadear respostas adaptativas (Simon et al.,
1061 1998; Dudley et al., 2004). Dessa forma, nossos resultados não apenas reforçam a
1062 relevância da via JAK/STAT nos rins, mas também indicam a possível influência dessa
1063 via nas adaptações celulares específicas de lobos-marinhos, abrindo espaço para

1064 investigações mais aprofundadas sobre os mecanismos envolvidos nessas
1065 adaptações.

1066 Em mamíferos marinhos, como uma adaptação ao ambiente aquático, as
1067 células vermelhas são mais numerosas e maiores, resultando em uma concentração
1068 10 vezes maior de mioglobina, responsável pelo armazenamento de oxigênio (Wilhelm
1069 Filho et al., 2002; Holm et al., 2016). Essas adaptações garantem a eficácia do sistema
1070 renal e metabólico em diferentes condições fisiológicas. Em mergulhos longos e
1071 profundos há a diminuição dos batimentos cardíacos, contração das artérias e
1072 direcionamento do fluxo sanguíneo para órgãos vitais como o cérebro, coração e
1073 glândulas suprarrenais (Kooyman e Ponganis, 1998; Ponganis, 2015) (Fig. 22). O que
1074 também conversa com as vias positivas de resposta a níveis baixos de oxigênio.

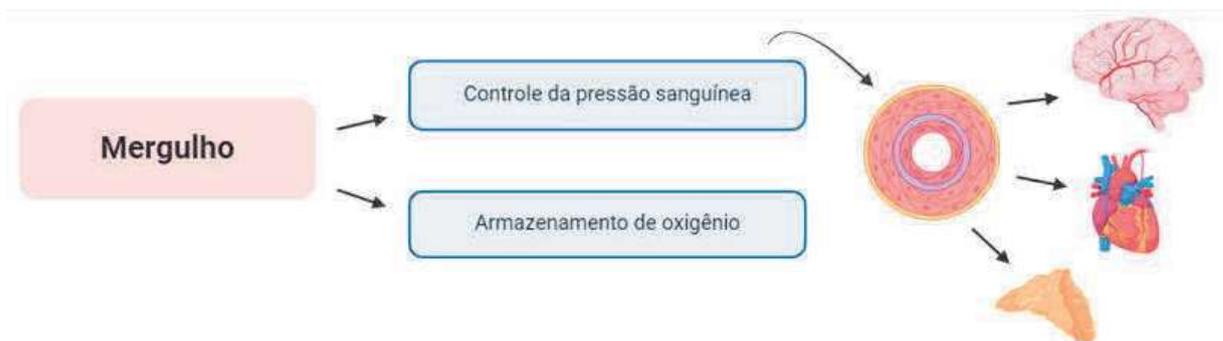


Figura 22. Esquema da bradicardia no mergulho onde há um controle da vasoconstrição das artérias e o fluxo sanguíneo é redirecionado para órgãos vitais, incluindo cérebro, coração e glândulas suprarrenais.

1075 Considerando a importância da metionina para o desenvolvimento normal de
1076 mamíferos, destaca-se sua participação em processos biológicos fundamentais,
1077 incluindo a síntese de proteínas e o fornecimento de homocisteína (Finkelstein, 1990).
1078 Essa, por sua vez, faz parte do metabolismo de folatos intracelulares e no catabolismo
1079 de colina, positivamente regulado. A colina além de sua função estrutural nas
1080 membranas celulares, influencia o metabolismo lipídico, na integridade das
1081 membranas celulares e em processos essenciais para a função cerebral e hepática
1082 (Pinotti et al., 2002). Nos estudos com ratos de Li et al. (2007), foi observado que
1083 diante do estresse da privação de colina, os rins são de extrema relevância na
1084 manutenção dos órgãos vitais, pois sacrificam a colina para atender às demandas do
1085 cérebro e do fígado por meio de uma redistribuição estratégica deste efetor.

1086 Além disso, a colina atua como precursor da betaína, uma substância crucial
1087 para a adaptação das células a estresses osmóticos. Ambas são de grande

1088 importância na osmorregulação celular (Pinotti et al., 2002). A betaína funciona como
1089 um osmoprotetor participando da regulação da pressão osmótica intracelular e no
1090 metabolismo de grupos metila (Wargo, 2013). Sua capacidade de equilibrar a força
1091 osmótica do citoplasma com o ambiente circundante protege as células contra
1092 variações na concentração de solutos, contribuindo assim para a estabilidade celular
1093 em condições de estresse. Por isso, esses achados realçam a importância do
1094 destaque da via de catabolismo da colina na funcionalidade dos órgãos críticos,
1095 evidenciando o papel essencial desempenhado pelos rins nesse processo.

6.4. Respostas a Estímulos Ambientais: envolvidos com a adaptação molecular ao ambiente marinho e a osmorregulação

1096 Ao longo da evolução, os mecanismos moleculares foram selecionados e
1097 melhorados para permitir a sobrevivência e adaptação dos organismos em ambientes
1098 com variações osmóticas. O hipotálamo é o principal centro de controle para a
1099 manutenção da homeostase, especialmente na regulação do equilíbrio de fluidos
1100 corporais, e nos mamíferos, os rins desempenham um papel crítico na regulação do
1101 volume de fluido intravascular e concentrações de eletrólitos (Ortiz et al., 1998, 2002b;
1102 Smoll et al., 2020). Entretanto, a função crucial do rim de reabsorver a água e
1103 concentrar a urina depende da criação fisiológica de um ambiente altamente
1104 concentrado na medula renal para controlar o equilíbrio hídrico do organismo (Ho,
1105 2006). O estresse osmótico em mamíferos, portanto, está relacionado às células da
1106 medula renal e dos rins na regulação da osmolaridade, evidenciando a diversidade na
1107 adaptação celular a diferentes ambientes (Ho, 2006).

1108 Nos resultados do presente estudo temos regulações negativas na resposta ao
1109 sal e regulações positivas no processo do sistema renal. A resposta ao sal, sendo
1110 uma via significativa na expressão diferencial em relação aos cachorros, apresenta-se
1111 como adaptação relacionadas às estratégias especializadas que os lobos-marinhos
1112 possuem para lidar com a hipersalinidade em seu *habitat*. Por outro lado, a maior
1113 atividade ou eficácia, nos processos relacionados ao sistema renal nos lobos-
1114 marinhos corroboram com as hipóteses de adaptações metabólicas específicas
1115 desses animais, especialmente nas vias relacionadas à síntese de proteínas,
1116 metabolismo de aminoácidos e regulação hormonal. Com base nisso, a seguir serão
1117 discutidas algumas das principais vias relacionadas com as respostas aos estímulos
1118 do ambiente salino dos mamíferos marinhos.

1119 No geral, os rins dos mamíferos são regulados por cinco hormônios principais:
1120 angiotensina (ANG, incluindo ANG I, II ou III), renina, aldosterona, peptídeo
1121 natriurético atrial (ANP) e vasopressina (AVP) (Ortiz, 2001; Ortiz et al., 2006). A renina,
1122 ANG e aldosterona operam por meio do sistema renina-angiotensina-aldosterona
1123 (SRAA) para modular a atividade da Na⁺/K⁺-ATPase, resultando no aumento da
1124 reabsorção de água pelos mamíferos (Kuper et al., 2007). A atividade do sistema
1125 SRAA e das catecolaminas durante comportamentos como jejum ou mergulho difere
1126 nos mamíferos marinhos (Vázquez-Medina et al., 2010), fato este que respalda o
1127 achado de regulação positiva do processo metabólico de catecolamina em lobos-
1128 marinhos encontrado neste estudo.

1129 O SRAA é um sistema enzimático-peptídico responsável por um dos
1130 mecanismos de vasoconstrição e retenção de sal que está presente em todos os
1131 animais vertebrados e invertebrados (Berta et al., 2006; Pough et al., 2008) e
1132 correlaciona-se diretamente com o processo do sistema renal, positivamente
1133 regulado. Um sistema ativo do SRAA foi identificado na maioria dos grupos de
1134 mamíferos marinhos, com sua sensibilidade variando em relação à disponibilidade de
1135 sal (Ortiz et al., 2001). Diferentemente dos mamíferos terrestres, onde o SRAA é
1136 principalmente estimulado por mudanças na pressão sanguínea e no volume de
1137 solutos (Hall, 1986), em mamíferos marinhos pode ser um indicador muito útil da
1138 resposta ao estresse, especialmente em relação aos possíveis impactos no equilíbrio
1139 de sal e a ativação prolongada do SRAA durante o mergulho profundo. Isto sugere um
1140 papel predominante desse sistema na regulação do estresse em mamíferos marinhos
1141 em comparação com o eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal.

1142 Em mamíferos marinhos, o SRAA parece apresentar um sistema de controle
1143 mais complexo (Ortiz et al., 2003). O Sistema Angiotensina-Renina-Aldosterona atua
1144 como um *feedback* túbulo-glomerular, controlando a pressão arterial (Hall, 2011), que
1145 leva à secreção de renina, angiotensina II e aldosterona, resultando em aumento da
1146 resistência periférica, reabsorção de sódio e água, e aumento da volemia. A
1147 aldosterona, por exemplo, é conhecida por regular os níveis de sódio (Ortiz, 2001) e
1148 essencial na regulação da retenção de água durante jejuns prolongados
1149 (especialmente nos mergulhos profundos) de mamíferos marinhos (Ortiz et al., 2001;
1150 Ortiz et al., 2006).

1151 Em várias espécies, proteínas como a Na⁺/K⁻ATPase (NKA), aldose redutase
1152 (AR), transportadores de íons e osmólitos orgânicos, aquaporinas (AQPs) e
1153 transportadores de ureia (UT) desempenham papéis cruciais no processo de
1154 osmorregulação (Xu et al., 2013; Pedro et al., 2015; Ruan et al., 2015; Li et al., 2022).
1155 Enzimas como a aldose redutase (AR), que produz sorbitol, e transportadores indicam
1156 uma estratégia de manutenção da homeostase celular por meio da produção de
1157 osmólitos e do transporte de íons, essenciais para a adaptação ao ambiente
1158 hiperssalino.

1159 Neste contexto de regulação osmótica, os resultados obtidos nos rins de lobos-
1160 marinhos corroboram com os mecanismos conhecidos de resposta a ambientes
1161 hipertônicos. A identificação de osmólitos orgânicos, como sorbitol, mio-inositol,
1162 taurina, alanina e betaína, evidencia uma estratégia eficaz para manter a homeostase
1163 celular em condições osmoticamente desafiadoras (Yancey et al., 1982; Burg et al.,
1164 1997; Dihazi et al., 2005). O aumento na concentração desses osmólitos contribui para
1165 a adaptação das células renais, minimizando a redução do volume celular causada
1166 pela saída de água em resposta ao estresse osmótico. Essa compensação, embora
1167 eleve a força iônica intracelular, é fundamental para preservar a função normal das
1168 células ao substituir íons por moléculas orgânicas não carregadas. Essas descobertas
1169 reforçam a importância dos osmólitos orgânicos na proteção contra distúrbios
1170 resultantes de alterações nas concentrações intracelulares de eletrólitos, garantindo
1171 a integridade estrutural das proteínas (Rosas-Rodríguez e Valenzuela-Soto, 2010) a
1172 ambientes marinhos.

1173 Na via destacada da resposta a níveis de oxigênio, é possível discorrer sobre
1174 a necessidade de consumo de oxigênio pelas células animais para gerar energia.
1175 Esse processo, porém, traz consigo a geração de subprodutos, como as espécies
1176 reativas de oxigênio (ERO), cujas principais fontes na medula renal incluem a
1177 hiperosmolaridade, a atividade da NADH oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial
1178 (Rosas-Rodríguez e Valenzuela-Soto, 2010) (Fig. 23). Vários sinais de resposta ao
1179 estresse são desencadeados para minimizar os danos causados pelo ambiente
1180 estressante, com ênfase na regulação redox e síntese de proteínas que participam da
1181 produção de osmólitos e na redução da concentração de ERRO, também encontradas
1182 neste estudo.

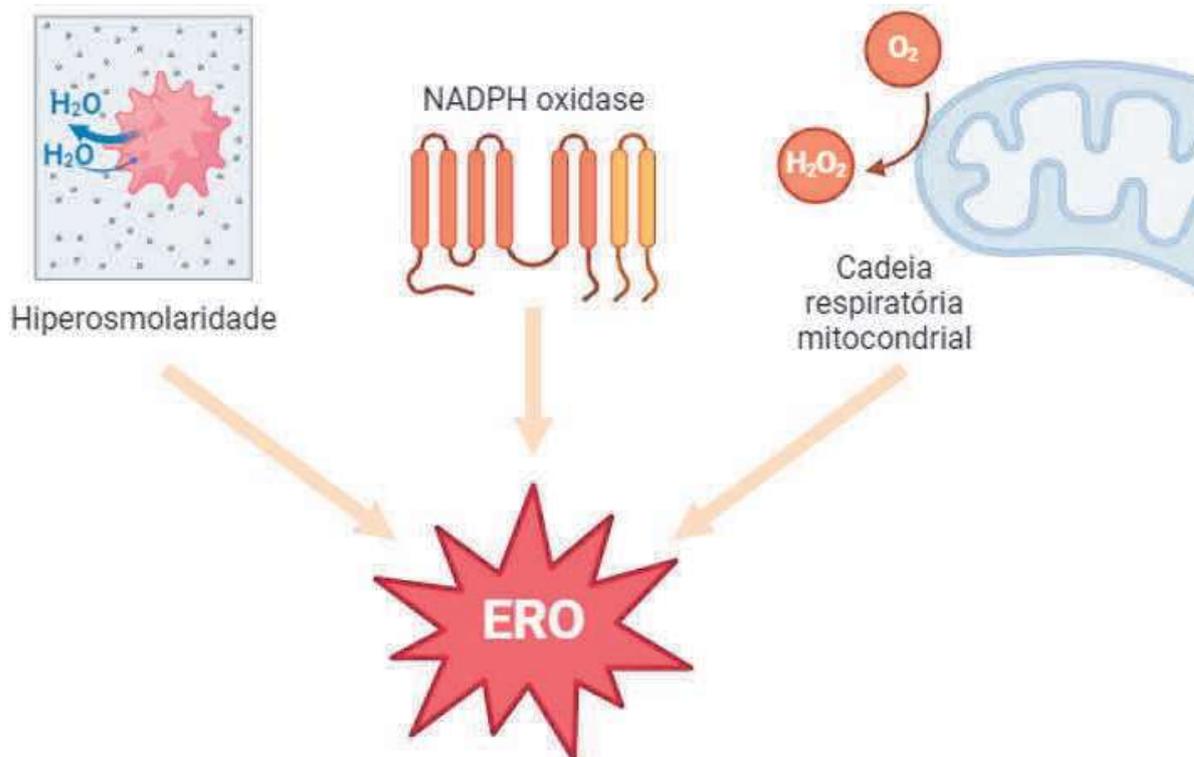


Figura 23. Esquema da geração de espécies reativas de oxigênio a partir da hiperosmolaridade, a atividade da NADH oxidase e a cadeia respiratória mitocondrial.

1183 As ERO são importantes principalmente devido ao seu papel patológico, mas
 1184 existem evidências quanto ao seu envolvimento em processos homeostáticos
 1185 (MacFarlane & Mitchell, 2008; St-Louis et al., 2012), incluindo o controle central da
 1186 ingestão alimentar. Em focas-elefantes-do-norte (*Mirounga angustirostris*), o estresse
 1187 oxidativo foi investigado durante os períodos de jejum natural associados à
 1188 reprodução, muda e desmame (Ortiz et al., 2002a, 2003, 2006). Apesar do jejum
 1189 prolongado, não há aumento de danos oxidativos, indicando uma eficiente resposta
 1190 antioxidante nesses animais, havendo ainda indícios de que a ANG II estimula a
 1191 NADPH oxidase 4, desencadeando uma resposta adaptativa ao estresse oxidativo. A
 1192 atividade e expressão elevadas de várias enzimas antioxidantes, juntamente com um
 1193 aumento de GSH, contribuem para prevenir danos oxidativos durante o jejum; e estes
 1194 efetores mostraram-se também presentes neste estudo.

1195 A regulação positiva do óxido nítrico (ON) emerge como um componente crucial
 1196 nas vias positivamente reguladas, destacando seu papel como neurotransmissor
 1197 parácrino no hipotálamo e sua contribuição significativa para a manutenção do
 1198 equilíbrio de sal e fluidos em mamíferos (Hübschle et al., 1999). Estudos prévios
 1199 sugerem que a síntese neuronal de ON, presente em várias estruturas hipotalâmicas

1200 essenciais para o controle da homeostase dos fluidos corporais, desempenha um
1201 papel central na regulação da liberação do hormônio antidiurético AVP (Reid, 1994;
1202 Ortiz e Garvin, 2002).

1203 No contexto renal, verifica-se que o ON exerce uma modulação positiva no
1204 transporte iônico em diferentes segmentos renais, evidenciando efeitos inibitórios
1205 específicos na Na^+/K^+ -ATPase, co-transportador $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$, trocador Na^+/H^+ e
1206 canais apicais de sódio (McKee et al., 1994; Stoos et al., 1994; Garvin e Hong, 1999;
1207 Liang e Knox, 1999; Ortiz, 2001; Ortiz e Garvin, 2002). Esses achados corroboram
1208 diretamente com as vias identificadas do óxido nítrico, processos do sistema renal e
1209 regulação positiva do processo metabólico de catecolaminas.

1210 Já nas células da medula, essas estão constantemente envolvidas por um
1211 ambiente hiperosmótico devido à necessidade de um gradiente osmótico para a
1212 reabsorção de água durante o mecanismo de concentração urinária (Burg et al.,
1213 1997). A concentração de superóxido é elevada nas células renais e o superóxido é
1214 convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Zou et al., 2001; Wilhelm Filho et al.,
1215 2002). O lobo-marinho-sul-americano apresenta uma resposta positivamente
1216 regulada para a resposta ao peróxido de hidrogênio.

1217 Esses sistemas antioxidantes são especialmente relevantes em mamíferos
1218 mergulhadores, que enfrentam alterações frequentes na disponibilidade de oxigênio
1219 durante o mergulho e processos de isquemia-reperfusão (Elsner et al., 1995, 1998;
1220 Wilhelm Filho et al., 2000; Kooyman, 2009; Fahlman et al., 2017). A compreensão
1221 desses aspectos é crucial para comparar o metabolismo das ERO em diferentes
1222 espécies de vertebrados (Wilhelm Filho et al., 2000). Wilhelm Filho et al., (2002)
1223 sugerem que o *status* antioxidante está diretamente relacionado à capacidade de
1224 mergulho dos mamíferos, pois quando o sangue de mamíferos mergulhadores foi
1225 comparado com o de não mergulhadores, os resultados indicaram que os
1226 mergulhadores geralmente têm uma capacidade antioxidante mais elevada.

1227 As principais famílias de antioxidantes que visam o peróxido de hidrogênio
1228 (H_2O_2) incluem as perirredoxinas que são evolutivamente conservadas nos animais e
1229 são peroxidases que degradam hidroperóxidos em água (Poynton e Hampton, 2014).
1230 Neste trabalho encontramos a peroxirredoxina-5 diferencialmente expressa nos lobos
1231 (regulação positiva), e essa observação sugere não apenas a função conhecida de
1232 redução do peróxido de hidrogênio, mas também aponta para a possibilidade de que

1233 a geração de água a partir de reações com essa enzima pode ter implicações diretas
1234 na disponibilidade de água molecular para o funcionamento metabólico desse animal
1235 marinho.

7. Conclusão

1236 Os achados deste trabalho destacam pontos muito importantes na adaptação
1237 dos rins de lobo-marinho-sul-americano ao ambiente marinho e à evolução da
1238 adaptação da osmorregulação a um ambiente hiperosmótico. A partir das vias
1239 destacadas, demonstrou-se otimizações significativas nos processos de *turnover* de
1240 metabólitos prejudiciais ao metabolismo celular e uma modulação positiva e bastante
1241 orquestrada das enzimas e proteínas relacionadas à manutenção da homeostase
1242 osmótica celular, mesmo sob a pressão de um ambiente hiperosmótico, além de
1243 muitas adaptações relacionadas à prevenção de processos inflamatórios. Além disso,
1244 a identificação da via de *splicing* parece ser uma importante ferramenta evolutiva
1245 nesta adaptação, conferindo versatilidade e flexibilidade ao proteoma destes
1246 mamíferos marinhos. Essas adaptações demonstram uma capacidade excepcional
1247 dos rins reniculados dos lobos-marinhos em lidar com as condições desafiadoras do
1248 *habitat* marinho, enfatizando sua importância na adaptação evolutiva, e as conclusões
1249 deste estudo fornecem *insights* valiosos sobre a evolução da adaptação da
1250 osmorregulação em mamíferos marinhos.

8. Referências

- 1251 Altelaar, A. F. M., Munoz, J., & Heck, A. J. R. (2013). Next-generation proteomics: Towards an integrative view of
1252 proteome dynamics. *Nature Reviews Genetics*, 14(1), 35–48. <https://doi.org/10.1038/nrg3356>
- 1253 Atkinson, S., Aubin, D. S., & Ortiz, R. M. (2009). Endocrine Systems. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 2007,
1254 375–383. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00090-0>
- 1255 Baer, B., & Millar, A. H. (2016). Proteomics in evolutionary ecology. *Journal of Proteomics*, 135, 4–11.
1256 <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.09.031>
- 1257 Baker, D. H., & Czarnecki-Maulden, G. L. (1991). Comparative nutrition of cats and dogs. *Annual Review of*
1258 *Nutrition*, 11(1), 239–263.
- 1259 Beck, C. A., Iverson, S. J., Bowen, W. D., & Blanchard, W. (2007). Sex differences in grey seal diet reflect
1260 seasonal variation in foraging behaviour and reproductive expenditure: Evidence from quantitative fatty acid
1261 signature analysis. *Journal of Animal Ecology*, 76(3), 490–502. [https://doi.org/10.1111/j.1365-](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01215.x)
1262 [2656.2007.01215.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2007.01215.x)
- 1263 Belo, P. S., Romsos, D. R., & Leveille, G. A. (1976). Influence of diet on glucose tolerance, on the rate of glucose
1264 utilization and on gluconeogenic enzyme activities in the dog. *The Journal of Nutrition*, 106(10), 1465–1474.
- 1265 Berta, A.; Sumich, James L; Kovacs, K. M. (2006). *Marine Mammals - Evolutionary Biology* (2nd ed.). Academic
1266 Press.
- 1267 Berta, A. (2017). *The rise of marine mammals: 50 million years of evolution*. JHU Press.
- 1268 Berta, A. (2018). Pinniped evolution. In *Encyclopedia of marine mammals* (pp. 712–722). Elsevier.

- 1269 Bester, M. N. (1975). The functional morphology of the kidney of the Cape fur seal, *Arctocephalus pusillus*
1270 (Schreber). *Madoqua*, 4(11), 69–92. https://doi.org/10.10520/AJA10115498_57
- 1271 Beuchat, C. A. (1996). Structure and concentrating ability of the mammalian kidney: Correlations with habitat.
1272 *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology*, 271(1 40-1).
1273 <https://doi.org/10.1152/ajpregu.1996.271.1.r157>
- 1274 Biamonti, G., & Caceres, J. F. (2009). Cellular stress and RNA splicing. *Trends in Biochemical Sciences*, 34(3),
1275 146–153.
- 1276 Birukawa, N., Ando, H., Goto, M., Kanda, N., Pastene, L. A., Nakatsuji, H., Hata, H., & Urano, A. (2005). Plasma
1277 and urine levels of electrolytes, urea and steroid hormones involved in osmoregulation of cetaceans.
1278 *Zoological Science*, 22(11), 1245–1257. <https://doi.org/10.2108/zsj.22.1245>
- 1279 Black, D. L. (2000). Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome
1280 biology. *Cell*, 103(3), 367–370.
- 1281 Boyd, I. L., Bowen, W. D., & Iverson, S. J. (2010). *Marine mammal ecology and conservation: a handbook of*
1282 *techniques*. Oxford University Press. Oxford university press.
- 1283 Bradshaw, J. W. S. (2006). The evolutionary basis for the feeding behavior of domestic dogs (*Canis familiaris*)
1284 and cats (*Felis catus*). *Journal of Nutrition*, 136(7), 1927S-1931S. <https://doi.org/10.1093/jn/136.7.1927s>
- 1285 Braga Emidio, N., Girardi Carpaneaz, A., Ramos Quellis, L., Silva Farani, P., Gomes Vasconcelos, E., & Faria-
1286 Pinto, P. (2015). *Proteômica: uma introdução aos métodos e aplicações*. 41(4), 101–111.
- 1287 Burg, M. B., Kwon, E. D., & Kültz, D. (1996). Osmotic regulation of gene expression. *The FASEB Journal*, 10(14),
1288 1598–1606.
- 1289 Burg, M. B., Kwon, E. D., & Kültz, D. (1997). Regulation of gene expression by hypertonicity. *Annual Review of*
1290 *Physiology*, 59(1), 437–455.
- 1291 Cárdenas-Alayza, S. (2018). South American Fur Seal. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 905–907.
1292 <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-804327-1.00237-5>
- 1293 Castelló, J. R. (2018). *Canids of the world: wolves, wild dogs, foxes, jackals, coyotes, and their relatives*.
1294 Princeton University Press.
- 1295 Cave, E. (1967). The reniculus of *Tursiops truncatus*, *Stenella longirostris* and other cetaceans. *Nature*, 90(2243),
1296 235–235. <https://doi.org/10.1038/090235a0>
- 1297 Cersosimo, E. (2004). A Importância do Rim na Manutenção da Homeostase da Glicose: Aspectos Teóricos e
1298 Práticos do Controle da Glicemia em Pacientes Diabéticos Portadores de Insuficiência Renal. *J Bras*
1299 *Nefrol*, 26(1)(26(1)), 28–37.
- 1300 Christoph Kuper, Franz-X. Beck, & Wolfgang Neuhofer. (2007). Osmoadaptation of Mammalian Cells - An
1301 Orchestrated Network of Protective Genes. *Current Genomics*, 8(4), 209–218.
1302 <https://doi.org/10.2174/138920207781386979>
- 1303 Churchill, M., Boessenecker, R. W., & Clementz, M. T. (2014). Colonization of the Southern Hemisphere by fur
1304 seals and sea lions (Carnivora: Otariidae) revealed by combined evidence phylogenetic and Bayesian
1305 biogeographical analysis. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 172(1), 200–225.
1306 <https://doi.org/10.1111/zoj.12163>
- 1307 Costa, D. P. (2018). Osmoregulation. In K. . Würsig, B.; Thewissen, J. G. N.; Kovacs (Ed.), *Encyclopedia of*
1308 *Marine Mammals* (3rd ed., pp. 659–664). Academic Press. <https://doi.org/10.1578/AM.44.5.2018.595>
- 1309 da Silva, A. P., Machado, A. S. D., Le Bas, A. E., Silva, R. G., dos Anjos Silva, E., & Hernandez-Blazquez, F. J.
1310 (2020). The skin structures and their role in the thermoregulation of the South American fur seal
1311 (*Arctocephalus australis*). *Anatomical Record*, 303(12), 3155–3167. <https://doi.org/10.1002/ar.24357>
- 1312 Demichev, V., Messner, C. B., Vernardis, S. I., Lilley, K. S., & Ralser, M. (2020). DIA-NN : neural networks and
1313 interference correction enable deep proteome coverage in high throughput. *Nature Methods*, 17(January).
1314 <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0638-x>
- 1315 Dudley, A. C., Thomas, D., Best, J., & Jenkins, A. (2004). The STATs in cell stress-type responses. *Cell*
1316 *Communication and Signaling*, 2, 1–5. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-2-8>
- 1317 Elsner, R., Øyas, S., Saugstad, O. D., & Blix, A. S. (1995). Seal adaptations for long dives: recent studies of
1318 ischemia and oxygen radicals. In *Developments in marine biology* (Vol. 4, pp. 371–376). Elsevier.
- 1319 Elsner, R., Øyasæter, S., Almaas, R., & Saugstad, O. D. (1998). Diving seals, ischemia-reperfusion and oxygen
1320 radicals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 119(4),

- 1321 975–980.
- 1322 Fahlman, A., Moore, M. J., & Garcia-Parraga, D. (2017). Respiratory function and mechanics in pinnipeds and
1323 cetaceans. *Journal of Experimental Biology*, 220(10), 1761–1773. <https://doi.org/10.1242/jeb.126870>
- 1324 Farina, B. M., Faurby, S., & Silvestro, D. (2023). *Dollo meets Bergmann : morphological evolution in secondary*
1325 *aquatic mammals*.
- 1326 Fernandez-Lima, F. A., Kaplan, D. A., & Park, M. A. (2011). Note: Integration of trapped ion mobility spectrometry
1327 with mass spectrometry. *Review of Scientific Instruments*, 82(12).
- 1328 Fetcher, E. S. (1939). The Water Balance in Marine Mammals. *The Quarterly Review of Biology*, 14(4), 451–459.
1329 <https://doi.org/10.1086/394595>
- 1330 Finkelstein, J. D. (1990). Methionine metabolism in mammals. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 1(5), 228–
1331 237. [https://doi.org/10.1016/0955-2863\(90\)90070-2](https://doi.org/10.1016/0955-2863(90)90070-2)
- 1332 Foote, A. D., Liu, Y., Thomas, G. W. C., Vinař, T., Alföldi, J., Deng, J., Dugan, S., Elk, C. E. Van, Hunter, M. E.,
1333 Joshi, V., Khan, Z., Kovar, C., Lee, S. L., Lindblad-toh, K., Mancina, A., Nielsen, R., Qin, X., Qu, J., Raney,
1334 B. J., ... Gibbs, R. A. (2015). Convergent evolution of the genomes of marine mammals. *Nature Publishing*
1335 *Group*, 47(3). <https://doi.org/10.1038/ng.3198>
- 1336 Garvin, J. L., & Hong, N. J. (1999). Nitric oxide inhibits sodium/hydrogen exchange activity in the thick ascending
1337 limb. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(3), F377–F382.
- 1338 Gatesy, J., & O’Leary, M. A. (2001). Deciphering whale origins with molecules and fossils. *Trends in Ecology and*
1339 *Evolution*, 16(10), 562–570. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(01\)02236-4](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02236-4)
- 1340 Geraci, J. R., & Lounsbury, V. J. (1993). *Marine Mammals Ashore: A Field Guide for Strandings*.
- 1341 Gingerich, P. D., Raza, S. M., Arif, M., Anwar, M., & Zhou, X. (1994). New whale from the Eocene of Pakistan and
1342 the origin of cetacean swimming. *Nature*, 368(6474), 844–847. <https://doi.org/10.1038/368844a0>
- 1343 Gingerich, P. D., Russel, D. E., & Shah, S. M. I. (1983). Origin of Whales in Epicontinental Remnant Seas: New
1344 Evidence from the Early Eocene of Pakistan. *Science*, 220, 403–406.
- 1345 Hall, J. E. (2011). *Guyton y Hall. Tratado de fisiología médica*. Elsevier Health Sciences.
- 1346 Hassanin, A., Veron, G., Ropiquet, A., van Vuuren, B. J., Lécu, A., Goodman, S. M., Haider, J., & Nguyen, T. T.
1347 (2021). Evolutionary history of Carnivora (Mammalia, Laurasiatheria) inferred from mitochondrial genomes.
1348 *PLoS ONE*, 16(2 February), 1–28. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0240770>
- 1349 Heckel, G., & Schramm, Y. (2021). *Ecology and Conservation of Pinnipeds in Latin America*. Springer.
- 1350 Hedges, N. A., Gaskin, D. E., & Smith, G. J. D. (1979). Rencular morphology and renal vascular system of the
1351 harbour porpoise *Phocoena phocoena* (L.). *Canadian Journal of Zoology*, 57(4), 868–875.
1352 <https://doi.org/10.1139/z79-107>
- 1353 Helm, D., Vissers, J. P. C., Hughes, C. J., Hahne, H., Ruprecht, B., Pachi, F., Grzyb, A., Richardson, K.,
1354 Wildgoose, J., & Maier, S. K. (2014). Ion mobility tandem mass spectrometry enhances performance of
1355 bottom-up proteomics. *Molecular & Cellular Proteomics*, 13(12), 3709–3715.
- 1356 Higdon, J. W., Bininda-Emonds, O. R. P., Beck, R. M. D., & Ferguson, S. H. (2007). Phylogeny and divergence of
1357 the pinnipeds (Carnivora: Mammalia) assessed using a multigene dataset. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1).
1358 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-216>
- 1359 HO, S. N. (2006). Intracellular Water Homeostasis and the Mammalian Cellular Osmotic Stress Response.
1360 *JOURNAL OF CELLULAR PHYSIOLOGY*, 15(April 2005), 9–15. <https://doi.org/10.1002/jcp.20445>
- 1361 Hochachka, P. W.; Somero, G. N. (2002). *Biochemical adaptation: mechanism and process in physiological*
1362 *evolution*. Oxford university press.
- 1363 Holm, J., Dasmeh, P., & Kepp, K. P. (2016). Tracking evolution of myoglobin stability in cetaceans using
1364 experimentally calibrated computational methods that account for generic protein relaxation. *Biochimica et*
1365 *Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1864(7), 825–834.
1366 <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2016.04.004>
- 1367 Kanu, A. B., Dwivedi, P., Tam, M., Matz, L., & Hill Jr, H. H. (2008). Ion mobility–mass spectrometry. *Journal of*
1368 *Mass Spectrometry*, 43(1), 1–22.
- 1369 Karr, T. L. (2008). Application of proteomics to ecology and population biology. *Heredity*, 100(2), 200–206.
1370 <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801008>

- 1371 Kawa, D., & Testerink, C. (2017). Regulation of mRNA decay in plant responses to salt and osmotic stress.
1372 *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(7), 1165–1176. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2376-x>
- 1373 Kershaw, J. L., Botting, C. H., Brownlow, A., & Hall, A. J. (2018). Not just fat: Investigating the proteome of
1374 cetacean blubber tissue. In *Conservation Physiology* (Vol. 6, Issue 1).
1375 <https://doi.org/10.1093/conphys/coy003>
- 1376 Kooyman, G. L. (2009). Marine mammal diving physiology. *Elements of Physical Oceanography: A Derivative of*
1377 *the Encyclopedia of Ocean Sciences*, 458.
- 1378 Kooyman, G. L., & Ponganis, P. J. (1998). The physiological basis of diving to depth: birds and mammals. *Annual*
1379 *Review of Physiology*, 60(1), 19–32.
- 1380 Kultz, D. (2020). Evolution of cellular stress response mechanisms. *American Journal of Pathology*, 333, 359–
1381 378. <https://doi.org/10.1002/jez.2347>
- 1382 Kwon, E. D., Zablocki, K., Kyu Yong Jung, Peters, E. M., Garcia-Perez, A., & Burg, M. B. (1995). Osmoregulation
1383 of GPC:choline phosphodiesterase in MDCK cells: Different effects of urea and NaCl. *American Journal of*
1384 *Physiology - Cell Physiology*, 269(1 38-1), 35–41. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.269.1.c35>
- 1385 Le Bas, A. E. (2003). Renal handling of water, urea and electrolytes in wild South America fur seal (*Arctocephalus*
1386 *australis*). *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 2(1), 13–20. <https://doi.org/10.5597/lajam00026>
- 1387 Li, J., Wang, X., Lan, T., Lu, Y., Hong, M., Ding, L., & Wang, L. (2022). Osmoregulation in *Fejervarya cancrivora*.
1388 *Biology*, 11(858), 1–12. <https://doi.org/10.3390>
- 1389 Li, P., & Wu, G. (2023). Amino acid nutrition and metabolism in domestic cats and dogs. *Journal of Animal*
1390 *Science and Biotechnology*, 14(1), 1–21. <https://doi.org/10.1186/s40104-022-00827-8>
- 1391 Li, X., Zheng, S., & Wu, G. (2020). Amino acid metabolism in the kidneys: nutritional and physiological
1392 significance. *Amino Acids in Nutrition and Health: Amino Acids in Systems Function and Health*, 71–95.
- 1393 Li, Z., Agellon, L. B., & Vance, D. E. (2007). Choline redistribution during adaptation to choline deprivation.
1394 *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10283–10289. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611726200>
- 1395 Liang, M., & Knox, F. G. (1999). Nitric oxide activates PKC α and inhibits Na⁺-K⁺-ATPase in opossum kidney
1396 cells. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 277(6), F859–F865.
- 1397 Liu, Y., Beyer, A., & Aebersold, R. (2016). On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance.
1398 *Cell*, 165(3), 535–550. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.03.014>
- 1399 Lutaif, N. A., & Gontijo, J. A. R. (2009). Contribuição Renal para a Termoregulação: Termogênese e a Doença
1400 Renal. *J. Bras. Nefrol.*, 31(1), 62–69.
- 1401 MacFarlane, P. M., & Mitchell, G. S. (2008). Respiratory long-term facilitation following intermittent hypoxia
1402 requires reactive oxygen species formation. *Neuroscience*, 152(1), 189–197.
- 1403 Maluf, N. S. R. (1989). Renal Anatomy of the Manatee, *Trichechus manatus*, Linnaeus. *The American Journal of*
1404 *Anatomy*, 184, 269–286.
- 1405 Maluf, N. S. R., & Gassman, J. J. (1998). Kidneys of the killerwhale and significance of reniculism. *Anatomical*
1406 *Record*, 250(1), 34–44. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199801\)250:1<34::AID-AR4>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199801)250:1<34::AID-AR4>3.0.CO;2-E)
- 1407 Manual, I. (n.d.). *Mini-PROTEAN® Tetra Cell*.
- 1408 Martín-Orti, R., Tostado-Marcos, C., Loureiro, J. P., Molpeceres-Diego, I., Tendillo-Domínguez, E., Santos-
1409 álvarez, I., Pérez-Lloret, P., & González-Soriano, J. (2022). The Digestive System of the *Arctocephalus*
1410 *australis* In Comparison to the Dog as a Land-Carnivore Model. *Animals*, 12(13).
1411 <https://doi.org/10.3390/ani12131634>
- 1412 McDonald, W. H., & Yates Iii, J. R. (2002). Shotgun proteomics and biomarker discovery. *Disease Markers*, 18(2),
1413 99–105.
- 1414 McKee, M., Scavone, C., & Nathanson, J. A. (1994). Nitric oxide, cGMP, and hormone regulation of active sodium
1415 transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(25), 12056–12060.
- 1416 Mead, R. A. (2019). 16. The Physiology and Evolution of Delayed Implantation in Carnivores. In *Carnivore*
1417 *Behavior, Ecology, and Evolution*. <https://doi.org/10.7591/9781501745812-023>
- 1418 Meier, F., Beck, S., Grassl, N., Lubeck, M., Park, M. A., Raether, O., & Mann, M. (2015). Parallel accumulation–
1419 serial fragmentation (PASEF): multiplying sequencing speed and sensitivity by synchronized scans in a
1420 trapped ion mobility device. *Journal of Proteome Research*, 14(12), 5378–5387.

- 1421 Meier, F., Brunner, A.-D., Koch, S., Koch, H., Lubeck, M., Krause, M., Goedecke, N., Decker, J., Kosinski, T., &
1422 Park, M. A. (2018). Online parallel accumulation–serial fragmentation (PASEF) with a novel trapped ion
1423 mobility mass spectrometer. *Molecular & Cellular Proteomics*, 17(12), 2534–2545.
- 1424 Milinkowitch, M. C.; Orti G.; Meyer, A. . (1993). Revised phylogeny of whales suggested by mitochondrial
1425 ribosomal DNA sequences. *Nature*, 361, 346–348.
- 1426 Molpeceres-Diego, I., Martín-Orti, R., Loureiro, J. P., Tostado-Marcos, C., Tendillo-Domínguez, E., Santos-
1427 Álvarez, I., Pérez-Lloret, P., & González-Soriano, J. (2023). The Respiratory System of the *Arctocephalus*
1428 *australis* in Comparison to the Dog as a Land-Carnivore: Are There Adaptations to Marine Life? *Animals*,
1429 13(2). <https://doi.org/10.3390/ani13020199>
- 1430 Neely, B. A., Soper, J. L., Gulland, F. M. D., Bell, P. D., Kindy, M., Arthur, J. M., & Janech, M. G. (2015).
1431 Proteomic analysis of cerebrospinal fluid in California sea lions (*Zalophus californianus*) with domoic acid
1432 toxicosis identifies proteins associated with neurodegeneration. *Proteomics*, 15(23–24), 4051–4063.
1433 <https://doi.org/10.1002/pmic.201500167>
- 1434 Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2011). *Principios de bioquímica de Lehninger*. Artmed Editora.
- 1435 Nery, M. F., Borges, B., Dragalzew, A. C., & Kohlsdorf, T. (2016). Selection on different genes with equivalent
1436 functions : the convergence story told by Hox genes along the evolution of aquatic mammalian lineages.
1437 *BMC Evolutionary Biology*, 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12862-016-0682-4>
- 1438 Ortiz, P. A., & Garvin, J. L. (2002). Role of nitric oxide in the regulation of nephron transport. *American Journal of*
1439 *Physiology - Renal Physiology*, 282(5 51-5). <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00334.2001>
- 1440 Ortiz, R. M., Wade, C. E., Costa, D. P., & Ortiz, C. L. (2002). Renal effects of fresh water-induced hypo-osmolality
1441 in a marine adapted seal. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental*
1442 *Physiology*, 172(4), 297–307. <https://doi.org/10.1007/s00360-002-0254-3>
- 1443 Ortiz, Rudy M. (2001a). Osmoleguration in Marine Mammals. *Journal of Experimental Biology*, 204(11), 1831–
1444 1844. <https://doi.org/10.1242/jeb.204.11.1831>
- 1445 Ortiz, Rudy M., Crocker, D. E., Houser, D. S., & Webb, P. M. (2006). Angiotensin II and aldosterone increase with
1446 fasting in breeding adult male northern elephant seals (*Mirounga angustirostris*). *Physiological and*
1447 *Biochemical Zoology*, 79(6), 1106–1112. <https://doi.org/10.1086/505996>
- 1448 Ortiz, Rudy M., Graciano, M. L., Seth, D., Awayda, M. S., & Navar, L. G. (2007). Aldosterone receptor antagonism
1449 exacerbates intrarenal angiotensin II augmentation in ANG II-dependent hypertension. *American Journal of*
1450 *Physiology - Renal Physiology*, 293(1), 139–147. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00504.2006>
- 1451 Ortiz, Rudy M., Long, B., Casper, D., Ortiz, L. L., & Williams, T. M. (2010). Biochemical and hormonal changes
1452 during acute fasting and re-feeding in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Marine Mammal Science*,
1453 26(2), 409–419. <https://doi.org/10.1111/j.1748-7692.2009.00309.x>
- 1454 Ortiz, Rudy M., Wade, C. E., Costa, D. P., & Leo Ortiz, C. (2002a). Renal responses to plasma volume expansion
1455 and hyperosmolality in fasting seal pups. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and*
1456 *Comparative Physiology*, 282(3 51-3), 805–817. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00418.2001>
- 1457 Ortiz, Rudy M., Wade, C. E., Costa, D. P., & Leo Ortiz, C. (2002b). Renal responses to plasma volume expansion
1458 and hyperosmolality in fasting seal pups. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and*
1459 *Comparative Physiology*, 282(3 51-3). <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00418.2001>
- 1460 Ortiz, Rudy M., Wade, C. E., Ortiz, C. L., & Talamantes, F. (2003). Acutely elevated vasopressin increases
1461 circulating concentrations of cortisol and aldosterone in fasting northern elephant seal (*Mirounga*
1462 *angustirostris*) pups. *Journal of Experimental Biology*, 206(16), 2795–2802.
1463 <https://doi.org/10.1242/jeb.00485>
- 1464 Ortiz, Rudy M., Worthy, G. A. J., & MacKenzie, D. S. (1998). Osmoregulation in wild and captive West Indian
1465 manatees (*Trichechus manatus*). *Physiological Zoology*, 71(4), 449–457. <https://doi.org/10.1086/515427>
- 1466 Parmley, J. L., Urrutia, A. O., Potrzebowski, L., Kaessmann, H., & Hurst, L. D. (2007). Splicing and the evolution
1467 of proteins in mammals. *PLoS Biology*, 5(2), e14.
- 1468 Pavés, H. J., Schlatter, R. P., Franco-Trecu, V., Páez, E., Sielfeld, W., Araos, V., Giesecke, R., Batallés, L. M., &
1469 Cappozzo, H. L. (2016). Temporada reproductiva del lobo fino Sudamericano (*Arctocephalus Australis*,
1470 *Otariidae*: Carnivora): ¿Nuevos antecedentes para establecer historias evolutivas independientes? *Revista*
1471 *de Biología Marina y Oceanografía*, 51(2), 241–253. <https://doi.org/10.4067/S0718-19572016000200003>
- 1472 Pedro, S. L. S., Alves, J. M. P., Barreto, A. S., & De Souza Lima, A. O. (2015). Evidence of positive selection of
1473 aquaporin genes from *pontoporia blainvillei* during the evolutionary process of cetaceans. *PLoS ONE*,
1474 10(7), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0134516>

- 1475 Pfeiffer, C. J. (1997). Renal cellular and tissue specializations in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) and
1476 beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Aquatic Mammals*, 23, 75–84.
- 1477 Pinotti, L., Baldi, A., & Dell'Orto, V. (2002). Comparative mammalian choline metabolism with emphasis on the
1478 high-yielding dairy cow. *Nutrition Research Reviews*, 15(2), 315–332. <https://doi.org/10.1079/nrr200247>
- 1479 Ponganis, P. J. (2015). *Diving Physiology of Marine Mammals and Seabirds*. Cambridge University Press.
- 1480 Pough, F. H., Janis, C. M., & Heiser, J. B. (2008). *A vida dos vertebrados (4th ed.)* (4th ed.). Atheneu.
- 1481 Poynton, R. A., & Hampton, M. B. (2014). Peroxiredoxins as biomarkers of oxidative stress. *Biochimica et*
1482 *Biophysica Acta - General Subjects*, 1840(2), 906–912. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2013.08.001>
- 1483 Rash, R., & Lillywhite, H. B. (2019). Drinking behaviors and water balance in marine vertebrates. *Marine Biology*,
1484 166(10), 1–21. <https://doi.org/10.1007/s00227-019-3567-4>
- 1485 Ridgway, S., & Venn-Watson, S. (2010). Effects of fresh and seawater ingestion on osmoregulation in Atlantic
1486 bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and*
1487 *Environmental Physiology*, 180(4), 563–576. <https://doi.org/10.1007/s00360-009-0439-0>
- 1488 Rosas-Rodríguez, J. A., & Valenzuela-Soto, E. M. (2010). Enzymes involved in osmolyte synthesis: how does
1489 oxidative stress affect osmoregulation in renal cells? *Life Sciences*, 87(17–18), 515–520.
- 1490 Ruan, R., Guo, A. H., Hao, Y. J., Zheng, J. S., & Wang, D. (2015). De novo assembly and characterization of
1491 narrow-ridged finless porpoise renal transcriptome and identification of candidate genes involved in
1492 osmoregulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(1), 2220–2238.
1493 <https://doi.org/10.3390/ijms16012220>
- 1494 Rybczynski, N., Dawson, M. R., & Tedford, R. H. (2009). A semi-aquatic Arctic mammalian carnivore from the
1495 Miocene epoch and origin of Pinnipedia. *Nature*, 458(7241), 1021–1024.
1496 <https://doi.org/10.1038/nature07985>
- 1497 Sarmiento, C. A. P., Ferreira, A. O., Rodrigues, E. A. F., Lesnau, G. G., Rici, R. E. G., Abreu, D. K., Biasi, C., &
1498 Miglino, M. A. (2012). Rins de baleia minke (*baleanoptera acutorostrata*): Arquitetura e estrutura. *Pesquisa*
1499 *Veterinaria Brasileira*, 32(8), 807–811. <https://doi.org/10.1590/S0100-736X2012000800022>
- 1500 Schießl, I. M., Rosenauer, A., Kattler, V., Minuth, W. W., Oppermann, M., & Castrop, H. (2013). Dietary salt intake
1501 modulates differential splicing of the Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *American Journal of Physiology -*
1502 *Renal Physiology*, 305(8), 1139–1148. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00259.2013>
- 1503 Schubert, O. T., Röst, H. L., Collins, B. C., Rosenberger, G., & Aebersold, R. (2017). Quantitative proteomics:
1504 challenges and opportunities in basic and applied research. *Nature Protocols*, 12(7), 1289–1294.
- 1505 Shehata, M. F. (2009). Regulation of the epithelial sodium channel [ENaC] in kidneys of salt-sensitive Dahl rats:
1506 insights on alternative splicing. *International Archives of Medicine*, 2(1), 1–9.
- 1507 Sheikh-Hamad, D., Suki, W. N., & Zhao, W. (1997). Hypertonic induction of the cell adhesion molecule beta 1-
1508 integrin in MDCK cells. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, 273(3), C902–C908.
- 1509 Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura, N., Kobayashi, H., & Mawatari, K.
1510 (2006). Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle. *The Journal of Nutrition*,
1511 136(2), 529S–532S.
- 1512 Silva, K. B., Araújo, T. G. de, Crivellaro, C. V. L., & Menezes, R. B. (2014). Os mamíferos marinhos no litoral do
1513 Rio Grande do Sul. *Rio Grande: NEMA*.
- 1514 Simon, A. R., Rai, U., Fanburg, B. L., & Cochran, B. H. (1998). Activation of the JAK-STAT pathway by reactive
1515 oxygen species. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 275(6 44-6), 1640–1652.
1516 <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.275.6.c1640>
- 1517 Slijper, E. J. (1958). Organ weights and symmetry problems in porpoises and seals. *Arch. Neerl. Zool*, 13(1), 97–
1518 113.
- 1519 Smith, C. M., Marks, A. D., & Lieberman, M. (2007). *Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem*
1520 *clínica*. Artmed.
- 1521 Smoll, L. I., Beard, L. A., & Lanyon, J. M. (2020). Osmoregulation and electrolyte balance in a fully marine
1522 mammal, the dugong (*Dugong dugon*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and*
1523 *Environmental Physiology*, 190(1), 139–148. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01250-8>
- 1524 Spoor, F., Bajpai, S., Hussain, S. T., Kumar, K., & Thewissen, J. G. M. (2002). Vestibular evidence for the
1525 evolution of aquatic behaviour in early cetaceans. *Nature*, 417(6885), 163–166.
1526 <https://doi.org/10.1038/417163a>

- 1527 Stastna, M., & Van Eyk, J. E. (2012). Analysis of protein isoforms: can we do it better? *Proteomics*, 12(19–20),
1528 2937–2948.
- 1529 Stoos, B. A., Carretero, O. A., & Garvin, J. L. (1994). Endothelial-derived nitric oxide inhibits sodium transport by
1530 affecting apical membrane channels in cultured collecting duct cells. *Journal of the American Society of*
1531 *Nephrology*, 4(11), 1855–1860.
- 1532 Suzuki, M., Endo, N., Nakano, Y., Kato, H., Kishiro, T., & Asahina, K. (2008). Localization of aquaporin-2, renal
1533 morphology and urine composition in the bottlenose dolphin and the Baird's beaked whale. *Journal of*
1534 *Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 178(2), 149–156.
1535 <https://doi.org/10.1007/s00360-007-0204-1>
- 1536 Tavares, M., Alvares, D. J., & Borges-Martins, M. (2021). Spatiotemporal patterns of carrion biomass of marine
1537 tetrapods at the ocean-land interface on the southern Brazilian coastline. *Marine Ecology Progress Series*,
1538 672, 57–72.
- 1539 Tettamanti, G., Grimaldi, A., Ferrarese, R., Rinaldi, L., Bortolotto, A., di Guardo, G., & de Eguileor, M. (2004). A
1540 comparative study of sporta perimedullaris muscosa in the renicula of six species of cetaceans. *Italian*
1541 *Journal of Zoology*, 71(2), 115–121. <https://doi.org/10.1080/11250000409356561>
- 1542 Thewissen, J. G. M., & Bajpai, S. (2001). Whale origins as a poster child for macroevolution. *BioScience*, 51(12),
1543 1037–1049. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[1037:WAOAPC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[1037:WAOAPC]2.0.CO;2)
- 1544 Thewissen, J. G. M., Cooper, L. N., Clementz, M. T., Bajpai, S., & Tiwari, B. N. (2007). Whales originated from
1545 aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. *Nature*, 450(7173), 1190–1194.
1546 <https://doi.org/10.1038/nature06343>
- 1547 Tian, J., Du, J., Han, J., Li, D., & Song, X. (2021). Complete Mitochondrial Genome of the South American Fur
1548 Seal *Arctocephalus australis* (Carnivora: Otariidae) and Its Phylogenetic Implications. *Russian Journal of*
1549 *Genetics*, 57(5), 582–590. <https://doi.org/10.1134/S1022795421050124>
- 1550 Tian, R., Seim, I., Zhang, Z., Yang, Y., Ren, W., Xu, S., & Yang, G. (2019). Distinct evolution of toll-like receptor
1551 signaling pathway genes in cetaceans. *Genes and Genomics*, 41(12), 1417–1430.
1552 <https://doi.org/10.1007/S13258-019-00861-3>
- 1553 Tseng, Y. C., & Hwang, P. P. (2008). Some insights into energy metabolism for osmoregulation in fish.
1554 *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, 148(4), 419–429.
1555 <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.04.009>
- 1556 Tuma, Z., Kuncova, J., Mares, J., & Matejovic, M. (2016). Mitochondrial proteomes of porcine kidney cortex and
1557 medulla: foundation for translational proteomics. *Clinical and Experimental Nephrology*, 20(1), 39–49.
1558 <https://doi.org/10.1007/s10157-015-1135-x>
- 1559 Uhen, M. D. (2007). Evolution of marine mammals: back to the sea after 300 million years. *The Anatomical*
1560 *Record: Advances in Integrative Anatomy and Evolutionary Biology: Advances in Integrative Anatomy and*
1561 *Evolutionary Biology*, 290(6), 514–522.
- 1562 Vardy, P. H., & Bryden, M. M. (1981). The kidney of *Leptonychotes weddelli* (Pinnipedia: Phocidae) with some
1563 observations on the kidneys of two other southern phocid seals. *Journal of Morphology*, 167(1), 13–34.
1564 <https://doi.org/10.1002/jmor.1051670103>
- 1565 Vermeij, G. J., & Motani, R. (2018). *Land to sea transitions in vertebrates : the dynamics of colonization*. 1–14.
1566 <https://doi.org/10.1017/pab.2017.37>
- 1567 Viana, A. G. A., Martins, A. M. A., Pontes, A. H., Fontes, W., Castro, M. S., & Ricart, C. A. O. (2018). Proteomic
1568 landscape of seminal plasma associated with dairy bull fertility. *Scientific Reports*, February, 1–13.
1569 <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34152-w>
- 1570 Wang, W., Wu, Z., Dai, Z., Yang, Y., Wang, J., & Wu, G. (2013). Glycine metabolism in animals and humans:
1571 Implications for nutrition and health. *Amino Acids*, 45(3), 463–477. <https://doi.org/10.1007/s00726-013-1493-1>
- 1572
- 1573 Wargo, M. J. (2013). Homeostasis and catabolism of choline and glycine betaine: Lessons from *Pseudomonas*
1574 *aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(7), 2112–2120.
1575 <https://doi.org/10.1128/AEM.03565-12>
- 1576 Wegler, C. ., Ölander, M. ., Wiśniewski, J. R. ., Lundquist, P. ., Zettl, K. ., Åsberg, A. ., & Artursson, P. (2020).
1577 Global variability analysis of mRNA and protein concentrations across and within human tissues. *NAR*
1578 *Genomics and Bioinformatics*, 2(1), lqz010.
- 1579 Wetzel, R. K., & Sweadner, K. J. (2001). Immunocytochemical localization of Na-K-ATPase α - and γ -subunits in
1580 rat kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 281(3), F531–F545.

- 1581 Wilhelm Filho, D., Sell, F., Ribeiro, L., Ghislandi, M., Carrasquedo, F., Fraga, C. G., Wallauer, J. P., Simões-
 1582 Lopes, P. C., & Uhart, M. M. (2002). Comparison between the antioxidant status of terrestrial and diving
 1583 mammals. *Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology*, 133(3),
 1584 885–892. [https://doi.org/10.1016/S1095-6433\(02\)00253-2](https://doi.org/10.1016/S1095-6433(02)00253-2)
- 1585 Wilhelm Filho, D., Torres, M. A., Marcon, J. L., Fraga, C. G., & Boveris, A. (2000). Comparative antioxidant
 1586 defenses in vertebrates-emphasis on fish and mammals. *Trends Comp. Biochem. Physiol*, 7, 33–45.
- 1587 Wursig, B., & Perrin, W. F. (2009). *Encyclopedia of marine mammals*. Academic Press.
- 1588 Wynen, L. P., Goldsworthy, S. D., Insley, S. J., Adams, M., Bickham, J. W., Francis, J., Gallo, J. P., Hoelzel, A.
 1589 R., Majluf, P., White, R. W. G., & Slade, R. (2001). Phylogenetic relationships within the eared seals
 1590 (Otariidae: Carnivora): Implications for the historical biogeography of the family. *Molecular Phylogenetics
 1591 and Evolution*, 21(2), 270–284. <https://doi.org/10.1006/mpev.2001.1012>
- 1592 Xu, S., Yang, Y., Zhou, X., Xu, J., Zhou, K., & Yang, G. (2013). Adaptive evolution of the osmoregulation-related
 1593 genes in cetaceans during secondary aquatic adaptation. *BMC Evolutionary Biology*, 13(1).
 1594 <https://doi.org/10.1186/1471-2148-13-189>
- 1595 Yancey, P. H., Clark, M. E., Hand, S. C., Bowlus, R. D., & Somero, G. N. (1982). *Living with Water Stress :
 1596 Evolution of Osmolyte Systems*. 217(September).
- 1597 Zhu, Y., Orre, L. M., Tran, Y. Z., Mermelekas, G., Johansson, H. J., Malyutina, A., Anders, S., & Lehtiö, J. (2020).
 1598 DEqMS: a method for accurate variance estimation in differential protein expression analysis. *Molecular &
 1599 Cellular Proteomics*, 19(6), 1047–1057.
- 1600 Zou, A.-P., Li, N., & Cowley Jr, A. W. (2001). Production and actions of superoxide in the renal medulla.
 1601 *Hypertension*, 37(2), 547–553.
- 1602

ANEXO

Tabela 1. Nomes das proteínas mais relevantes citadas neste estudo em Inglês com sua respectiva tradução para a língua portuguesa.

Gene	Proteína	Tradução
QDPR	Quinoid dihydropteridine reductase	Redutase de diidropteridina quinóide
RTCB	RNA-splicing ligase RtcB homolog	Ligase de splicing de RNA homóloga a RtcB
PRDX5	Peroxiredoxin-5	Peroxirredoxina-5
BPNT1	3'(2'),5'-bisphosphate nucleotidase 1	Nucleotidase 3'(2'),5'-bisfosfato 1
RBP1	Cytosolic fatty-acid binding proteins domain-containing protein	Proteína contendo domínio de proteínas de ligação a ácidos graxos citosólicos
TKFC	Triokinase/FMN cyclase	Triocinase/ciclase de FMN
HNRNPAB	Heterous nuclear ribonucleoprotein A/B	Ribonucleoproteína heteronuclear A/B
ADSS1	Adenylosuccinate synthetase isozyme	Isóxima da sintetase de adenylosuccinato
PTGR3	Prostaglandin reductase 3	Redutase de prostaglandina 3
IDH2	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Isocitrato desidrogenase [NADP]
GK	glycerol kinase	Glicerol quinase
GPD1	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD(+)]	Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD(+)]
TTC38	Tetrapeptide repeat protein 38	Proteína de repetição de tetrapeptídeo 38
PGD	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating	Desidrogenase decarboxilante de 6-fosfogluconato
EHHADH	Peroxisomal bifunctional enzyme	Enzima bifuncional peroxissomal
FREM2	FRAS1 related extracellular matrix 2	Matriz extracelular relacionada a FRAS1 2
CTSZ	cathepsin X	Catepsina X
ALAD	Delta-aminolevulinic acid dehydratase	Desidratase de ácido delta-aminolevulínico
RPN2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 2	Subunidade 2 da glicosiltransferase de proteína de oligossacarídeo doliquil difosfato