

ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

BRUNA DUTRA DE CASTRO

**ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA CARACTERIZAÇÃO
DO CICLO DE VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE ANUAL
NEOTROPICAL**

Porto Alegre
2019

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA
CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO DE UMA ESPÉCIE DE
PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

Bruna Dutra de Castro

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (051) 320-3500
CEP 90619-900 Porto Alegre - RS
Brasil

2019

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE

**ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA
CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO DE UMA ESPÉCIE DE
PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

Bruna Dutra de Castro

Orientador: Dr. Guendalina Turcato Oliveira

Co-orientador: Dr. Luis Esteban Krause Lanés

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE - RS – BRASIL**

2019

Sumário

Relação de Figuras	VI
Relação de Tabelas	VII
Agradecimentos	VIII
Resumo	IX
Abstract	X
Apresentação.....	XI
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO	XIII
CAPÍTULO II: ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE OXIDATIVO NA CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE ANUAL NEOTROPICAL	XX
1. Introdução.....	XXIV
2. Materiais e Métodos	XXIX
3. Resultados	XXXV
4. Discussão.....	XLI
5. Conclusão	XLIX
Agradecimentos	XLIX
Referências	L

Considerações Finais da Dissertação LXV

Referências da Dissertação LXVII

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO LXXV

Relação de Figuras

- Fig. 1: Foto da espécie *Cynopoecilus fulgens*. Fonte: Lanés, L.E.K. XII
- Fig. 2: Imagem de um dos Pontos de Coleta localizado nos arredores do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, nos municípios de Tavares e Mostardas, RS – Brasil. Fonte: Lanés, L.E.K..... XII
- Fig. 3: Ilustração esquemática do ciclo de vida do peixe anual na região Sul do Brasil, baseado no ciclo de vida da espécie *Austrofundulus myersi* Dahl, 1958, representante da família Rivulidae. Fonte: Modificado por Lanés (2011) de Wourms (1972)..... XVII
- Fig. 4: Níveis de Proteínas Totais (PT) (A, B e C), Comprimento Padrão (CP) (D, E e F), Massa Corporal (G, H e I)..... LVIII
- Fig. 5: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 1 (P1)..... LIX
- Fig. 6: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 2 (P2)..... LX
- Fig. 7: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 3 (P3)..... LXI
- Fig. 8: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* com todas as unidades amostrais (P1, P2 e P3) agrupadas LXII

Relação de Tabelas

Tabela 1: Parâmetros abióticos da água em cada unidade amostral por mês: Temperatura (°C), pH, Condutividade (Ms/cm), O₂ (mg/L), ORP (Potencial de redução da oxidação - mV), Turbidez (NTU), TDS (Sólidos totais dissolvido - ppm) e OD (Oxigênio dissolvido em %). LXIII

Tabela 2: Medida de cada área úmida temporária (unidade amostral) por mês: Área Superficial (m²) e Profundidade Máxima (cm). LXIII

Tabela 3: Variáveis ambientais selecionadas que apresentaram influência sobre os biomarcadores. Análises realizadas no ambiente estatístico Rstudio. LXIII

Agradecimentos

Primeiramente, gostaria de agradecer a minha família e meu namorado por todo incentivo, ajuda, atenção e pelas palavras de conforto nos momentos de estresse e cansaço durante a minha caminhada acadêmica.

Gostaria de agradecer especialmente a minha orientadora Dr^a. Guendalina Turcato Oliveira que me acompanha desde a graduação na Iniciação Científica no Laboratório de Fisiologia da Conservação - PUCRS. Obrigada por todo apoio, confiança, dedicação, oportunidade e pelos ensinamentos durante toda essa trajetória.

Também, agradeço ao meu co-orientador Dr. Luis Esteban Krause Lanés por todo apoio, estímulo e aporte de conhecimento que contribuíram e ajudaram no desenvolvimento deste trabalho com os peixes anuais.

Não posso deixar de valorizar e agradecer a dedicação e a parceria da estudante de Iniciação Científica que participou do projeto, Natália Medeiros de Albuquerque Wingen. Sempre muito disposta a ajudar, auxiliando em todas as bancadas e discutindo sobre os resultados alcançados.

Quero agradecer a nossa técnica maravilhosa, Gabriela Miranda. Muito obrigada por toda ajuda, parceria, dedicação, disponibilidade e auxílio de sempre. Também, gostaria de agradecer muito a doutoranda Tiziane Molina, que me ajudou e auxiliou nas bancadas de Proteína Carbonilada.

Agradeço a todos meus amigos e colegas do Laboratório de Fisiologia da Conservação pelo carinho, amizade, companheirismo e apoio no decorrer desses anos, obrigada: Artur, Diogo, Eduardo, Gabriela, Jéssica, Jéssica T., Leici, Natália, Patrícia e Tiziane. Foram muitos os momentos de trabalho, mas também merecíamos alguns intervalos regados de risadas, músicas, cafezinhos com pipoca e gifs para descontrair. Vocês são demais!!

Também, agradeço ao Laboratório de Ecologia e Conservação de Ecossistemas Aquáticos da Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) pela parceria científica.

Obrigada a Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da PUCRS, por ter proporcionado e fornecido meios para o aprimoramento da minha formação.

Agradeço ao CNPq pela concessão da bolsa de pesquisa durante todo o mestrado.

Resumo

Os peixes de água doce são considerados um dos grupos mais ameaçados do mundo, visto que os ecossistemas aquáticos atualmente estão enfrentando constantes interferências de ações antrópicas, principalmente, com a intensificação da agricultura que tem impactado e descaracterizado diversos habitats de muitas espécies. Frente a isto, para a conservação da diversidade biológica nesses ambientes aquáticos é de extrema importância obter informações sobre as espécies constituintes destes habitats. Desta forma, ferramentas fisiológicas podem ser utilizadas para caracterizar a diversidade biológica e suas implicações ecológicas, e abranger também, as respostas dos organismos às alterações ambientais e agentes estressores. Os peixes anuais são organismos que vivem em áreas úmidas temporárias que secam sazonalmente. Devido a isto, apresentam um ciclo de vida curto e rápido, mostrando um grande potencial para serem utilizados como modelos biológicos para diversas pesquisas, principalmente, aquelas ligadas ao estudo de envelhecimento. O objetivo do presente trabalho foi analisar marcadores fisiológicos relacionados ao balanço redox do peixe anual *Cynopocilus fulgens*, endêmico da região sul do Brasil, com variáveis ambientais e estimativas do período reprodutivo. Foram coletados 443 indivíduos compreendendo juvenis, adultos e senis, entre o mês de junho e novembro de 2016, nos arredores do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PNLP), localizado na Planície Costeira Externa do Rio Grande do Sul, em três diferentes unidades amostrais (P1, P2 e P3). Estes animais foram eutanasiados em campo e em laboratório foram medidos (comprimento padrão) e pesados (massa corporal). Após, foram homogeneizados para a realização dos ensaios da Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione S-transferase, e para determinação dos níveis de Lipoperoxidação, através do TBARS, Proteínas Carboniladas e Proteínas Totais. Os resultados mostraram que machos e fêmeas de *C. fulgens* empregam estratégias fisiológicas diferentes em seu balanço redox durante o ciclo de vida, sendo influenciados pelo período reprodutivo e variáveis ambientais (bióticas e abióticas). Dentre as estratégias, as fêmeas mostram investir bastante na reprodução, principalmente no período de maturação sexual e produção dos ovos, evidenciado pelos níveis mais elevados de TBARS quando comparadas aos machos que parecem investir no crescimento somático e massa corporal. Além disso, as variáveis que apresentaram maiores influências no balanço oxidativo destes animais foram: temperatura, abundância de predador, abundância do peixe anual *Austrolebias minuano* e abundância de *C. fulgens*. Também, a população de cada área úmida temporária apresenta respostas fisiológicas distintas frente à adaptação ao seu ciclo de vida, corroborando a influência de algum componente ambiental como modulador deste ciclo. Adicionalmente, foi observado que os animais das poças P2 e P3 se comportam de maneira semelhante entre si apresentando um ciclo mais longo; sugerindo que o sistema antioxidante destes animais apresenta alta eficiência mantendo os níveis de lipoperoxidação e proteínas carboniladas baixos. Enquanto os da P1 têm seu ciclo de vida pós-eclosão mais curto possivelmente devido ao incremento do estresse oxidativo evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação. Estes resultados demonstram que a utilização dos peixes anuais neotropicais na pesquisa é altamente promissora, permitindo um estudo aprofundado sobre o envelhecimento e ensaio toxicológico. Além disso, enfatizam a importância do desenvolvimento de estratégias de conservação ambiental para preservar as características das áreas úmidas temporárias, estabelecendo estes animais como espécies sentinelas.

Palavras-chave: Áreas úmidas temporárias, Balanço redox, Conservação ambiental, *Cynopocilus fulgens*, Envelhecimento, Variáveis ambientais

Abstract

Ecophysiology and Oxidative Stress Biomarkers in the characterization of the post-embryonic Life Cycle of a Neotropical Annual Fish Species

Freshwater fish are considered one of the most threatened groups in the world, as aquatic ecosystems are currently facing constant interference from anthropic actions, mainly with the intensification of agriculture that has impacted and de-characterized diverse habitats of many species. To conserve biological diversity in these aquatic environments, it is extremely important to obtain information about the species that constitute these habitats. In this way, physiological tools can be used to characterize biological diversity and its ecological implications, and also include organisms' responses to environmental changes and stressors. Annual fish are organisms that live in temporary wetlands that dry out seasonally. Due to this, the life cycle is considered short and fast, presenting great potential as biological models for several researches, mainly those related to the study of aging. The aim of the present study was to analyze physiological markers related to the redox balance of the annual fish *Cynopoecilus fulgens*, endemic to southern Brazil, with environmental variables and estimates of the reproductive period. A total of 443 individuals were collected, including juveniles, adults and senile, between June to November 2016, around the Parque Nacional da Lagoa do Peixe, located in the Coastal Plain of Rio Grande do Sul, in three sampling units (P1, P2 and P3). These animals were euthanized in the field and in the laboratory were measured and weighed. After, they were homogenized for the Superoxide Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase and Glutathione S-transferase assays, and for the determination of the levels of Lipoperoxidation, through TBARS, Carbonylated Proteins and Total Proteins. The results showed that males and females of *C. fulgens* use different physiological strategies of their redox balance during the life cycle, being influenced by the reproductive period and environmental variables (biotic and abiotic). Among the strategies, females show a great deal of investment in reproduction, especially in the period of sexual maturation and egg production, evidenced by the higher levels of TBARS when compared to males that seem to invest in somatic growth and body mass. In addition, the variables that had the greatest influence on the oxidative balance of these animals were: temperature, abundance of predator, abundance of annual fish *Austrolebias minuano* and abundance of *C. fulgens*. Also, the population of each temporary wetland presented different physiological responses to the adaptation to their life cycle, corroborating the influence of an environmental component as a modulator of this cycle. Additionally, it was observed that the animals of the pools P2 and P3 behave in a similar way among each other, presented a longer cycle; suggesting that the antioxidant system of these animals presents high efficiency, keeping the levels of lipoperoxidation and carbonylated proteins low. Fish of P1 have their shorter post-hatch life cycle possibly due to increased oxidative stress, evidenced by increased lipoperoxidation. These results demonstrate that the use of Neotropical annual fish in the research is highly promising, allowing in-depth study on aging and toxicology testing. In addition, they emphasize the importance of developing environmental conservation strategies to preserve the characteristics of temporary wetlands, establishing these animals as sentinel species.

Keywords: Aging, *Cynopoecilus fulgens*, Environmental Conservation, Environmental variables, Redox balance, Temporary wetlands

Apresentação

O presente trabalho intitulado “Ecofisiologia e Biomarcadores de Estresse Oxidativo na caracterização do Ciclo de Vida pós-embriônico de uma espécie de Peixe Anual Neotropical”, foi elaborado como parte das exigências ou requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

A dissertação está estruturada em capítulo I com marco teórico geral e capítulo II redigido em forma de artigo científico. O marco teórico abrange aspectos importantes sobre fisiologia da conservação, estresse oxidativo e peixes anuais. E, o capítulo em forma de artigo científico, apresenta os resultados obtidos durante a realização deste estudo. Posteriormente, o artigo será traduzido para a língua inglesa e submetido para a publicação na revista “Science of the Total Environment”, a qual é Qualis “A1” na plataforma Capes na área de “Biodiversidade”.

O artigo científico trata sobre o estudo de marcadores fisiológicos relacionados ao balanço redox de uma espécie nativa da região sul do Brasil, o peixe anual *Cynopocilus fulgens* (Fig. 1), em diferentes estágios de desenvolvimento pós-embriônico ou pós-eclosão, coletados em ambiente natural (Fig. 2) ao longo do ciclo de vida. Neste capítulo foi analisado o *status* oxidativo nos animais em ambos os sexos, sendo utilizado como indicadores às enzimas (Superóxido Dismutase, Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione S-transferase) e as medidas de dano oxidativo (Lipoperoxidação e Proteínas Carboniladas).

Com os resultados obtidos nessa pesquisa, foi realizada a caracterização do ciclo de vida, pós-eclosão, desta espécie; além da determinação da relação destes biomarcadores com a variação natural de parâmetros físico-químicos e biológicos.



Fig. 1: Foto da espécie *Cynopoecilus fulgens*. Fonte: Lanés, L.E.K.

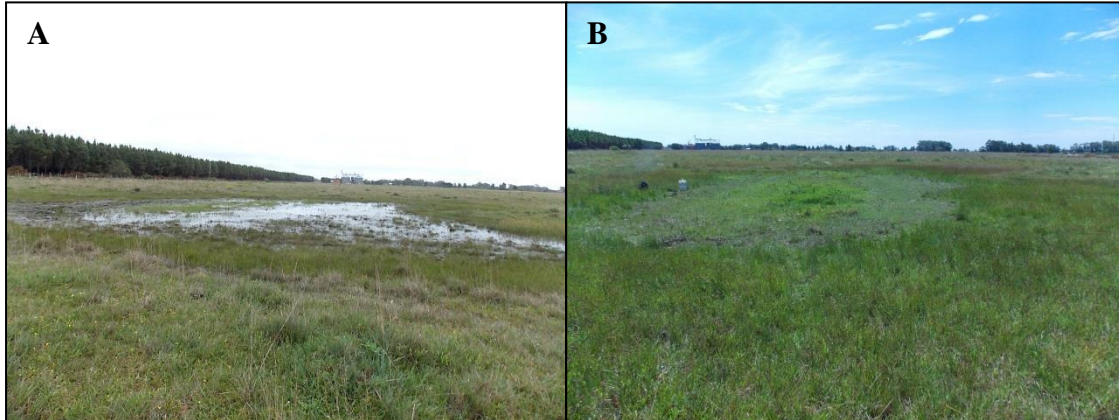


Fig. 2: Imagem de um dos Pontos de Coleta localizado nos arredores do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, nos municípios de Tavares e Mostardas, RS – Brasil. (A) Registro da área úmida temporária, durante época de chuva no inverno de 2016; (B) Registro da área seca, no verão de 2016. Fonte: Lanés, L.E.K

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

A fisiologia da conservação é definida como uma disciplina científica integrativa que emprega conceitos e conhecimentos fisiológicos buscando compreender como a diversidade biológica responde as alterações ambientais e a agentes estressores (COOKE et al., 2013). Sendo assim, a fisiologia tem como foco os mecanismos envolvidos no funcionamento do organismo/respostas funcionais (metabolismo, homeostase, aclimatação a alterações ambientais, entre outros) e a conservação, enfoca no estudo/refinamento de estratégias visando a proteção dos recursos naturais (COOKE et al., 2013). Além disso, cabe ressaltar que a fisiologia da conservação disponibiliza ferramentas que são fundamentais para a caracterização dos organismos frente às mudanças às quais estão expostos no meio ambiente, estando inserido neste contexto o estabelecimento de bioindicadores e biomarcadores.

Os bioindicadores (indicadores biológicos) são organismos vivos que indicam e fornecem informações sobre as condições ambientais (VAN GESTEL & VAN BRUMMELEN, 1996). Destaca-se a importância da padronização destes na pesquisa, principalmente, a utilização de organismos autóctones que podem proporcionar resultados mais próximos da realidade por serem adaptados às características do ambiente (PERSCH et al., 2017). Já os biomarcadores (marcadores biológicos) são considerados como um indicador de estado fisiológico do organismo/uma resposta biológica a exposição a uma substância química e/ou um estressor presente no ambiente. Sendo assim, podem ser consideradas as alterações moleculares e bioquímicas as primeiras e mais sensíveis respostas a essas mudanças no ambiente a serem detectadas e quantificadas. Frente a isso, dentre estes biomarcadores podemos destacar o padrão e a intensidade da atividade de enzimas, com especial destaque as enzimas do metabolismo intermediário, do balanço oxidativo e de biotransformação (BRAGHIROLI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; DANTZER et al., 2014; PERSCH et al., 2017). Assim, através da padronização de espécies consideradas bioindicadoras é possível obter o diagnóstico de mudanças fisiológicas no ciclo de vida destes organismos em ambiente natural ou mesmo no laboratório (BRAGHIROLI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016).

Balanço Oxidativo

As espécies Reativas de Oxigênio (EROs) estão envolvidas em diversos processos fisiológicos tanto aqueles pertinentes ao ciclo de vida do animal como aqueles decorrentes de alterações ambientais; constituindo um passo importante na modulação do sistema imunológico como por exemplo, defesa contra agentes patogênicos; na modulação do sistema endócrino e na oxidação de agentes químicos exógenos e endógenos (APEL & HIRT, 2004; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; DOWLING & SIMMONS, 2009). As EROs são derivadas de moléculas de oxigênio (O₂) e sua produção ocorre principalmente na mitocôndria de forma contínua e equilibrada apresentando grande importância no sistema biológico do animal (DOWLING & SIMMONS, 2009). Contudo, quando ocorre uma elevada produção de EROs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes, isto pode conduzir a efeitos deletérios em diferentes moléculas como: lipídios, proteínas, DNA e RNA; este desequilíbrio pode conduzir a dano oxidativo e pode induzir, a instalação de um quadro patológico no organismo comprometendo sua sobrevivência e/ou alterando o tempo de seu ciclo de vida (APEL; HIRT, 2004; COSTANTINI, 2014; SIES, 2018). Dentre estes efeitos alguns podem ser quantificados e usados como marcadores do dano oxidativo, assim podemos citar, a oxidação de proteínas, com a consequente formação de proteínas carboniladas (PC) e a oxidação de lipídios ou lipoperoxidação (LPO).

O Estresse Oxidativo pode ser determinado como um desequilíbrio entre os agentes pró-oxidantes e os antioxidantes (SIES, 1991, 2018). Dentre os agentes pró-oxidantes (EROs) estão: Ânion Radical Superóxido (O₂•-), Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) e Radical Hidroxila (OH•). O Ânion Radical Superóxido é produzido continuamente em vários processos celulares e tem importância vital para as células de defesa; o Peróxido de Hidrogênio é gerado pela dismutação do O₂•- catalisada por enzimas que se encontram em diferentes compartimentos celulares e apesar de não ser um radical livre, como o ânion superóxido, é considerado mais lesivo a célula que este; e, o Radical Hidroxila que é considerado o mais reativo, lesivo e deletério das EROs produzidas pelo organismo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS et al., 2007). Para combater as EROs e manter o equilíbrio redox, os organismos apresentam um sistema antioxidante classificado em enzimático e não enzimático (VASCONCELOS et al., 2007). Segundo BARBOSA et al. (2010), este sistema de

defesa antioxidante tem o papel de diminuir/impedir os efeitos prejudiciais provocados pela ação das espécies reativas de oxigênio quando formadas em excesso.

O sistema antioxidante enzimático é representado pelas enzimas: Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathione Peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo-o em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (APEL & HIRT, 2004; BARBOSA et al., 2010; COSTANTINI, 2014; VASCONCELOS et al., 2007). A CAT está localizada principalmente nos peroxissomos e é responsável por catalisar a conversão de H_2O_2 em O_2 e H_2O (APEL; HIRT, 2004; BARBOSA et al., 2010; COSTANTINI, 2014; VASCONCELOS et al., 2007). E, a GPX catalisa a redução não só do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) como também, dos peróxidos orgânicos em moléculas menos reativas, utilizando a forma reduzida da glutathione (GSH) para manter sua atividade (COSTANTINI, 2014; FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS et al., 2007). Já o sistema antioxidante não enzimático é representado por moléculas, de baixo peso molecular, de origem tanto endógena como exógenas, podendo-se destacar a Glutathione (GSH), a Melatonina, o Ácido Úrico, as Vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico) entre outras (BARBOSA et al., 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A biotransformação de metabólitos endógenos e exógenos pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio e com isto, pode induzir as enzimas antioxidantes, alterar as concentrações dos antioxidantes não-enzimáticos e produzir lesões que são associadas ao estresse oxidativo. O processo de biotransformação tem como objetivo tornar a molécula mais polar, aumentar o tamanho e o peso molecular tornando as moléculas endo e xenobióticas mais fáceis de serem excretadas. Este processo envolve reações de oxidação/redução e hidrólise (Fase I, principalmente no complexo P450), e de conjugação (fase II, com a glutathione ou com o ácido glicurônico, entre outros). Entre as enzimas de biotransformação mais estudadas em diferentes organismos vivos estão as glutathione S-transferases (GSTs) que pertencem a uma família multifuncional de enzimas que catalisam a conjugação da molécula de glutathione a várias outras moléculas, e possuem um papel fundamental em mecanismos de biotransformação intracelular. As GSTs desempenham vários papéis fisiológicos, tais como sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteroides, grupamentos heme, bilirrubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (CNUBBEN et al., 2001; PINHEIRO; OLIVEIRA, 2016).

Peixes Como Indicadores Biológicos

Segundo FAUSCH et al. (1990), os peixes são organismos indicadores da degradação do meio ambiente podendo ser usados como marcadores de qualidade do ecossistema aquático, pois são bastante sensíveis a mudanças ambientais, a estressores e a perturbações ambientais. Em peixes, os tecidos e órgãos são ferramentas suscetíveis a alterações ambientais e têm sido utilizadas quanto a aspectos ligados ao metabolismo intermediário e ao balanço redox. Contudo, ainda não há estudos que tenham avaliado o estresse oxidativo ao longo do ciclo de vida em três populações naturais distintas (organismos que vivem em diferentes áreas úmidas temporárias dentro da mesma região de coleta) de uma mesma espécie de peixe anual neotropical e relacionando os resultados com as variáveis ambientais.

Além disso, segundo LUCAS-SÁNCHEZ et al. (2014), os peixes apresentam grande potencial para o uso como modelos em pesquisas não só de toxicologia como também, no estudo do envelhecimento, devido à facilidade na adaptação as condições ambientais, a sensibilidade às variações de manutenção, como a dieta, e as oportunidades reprodutivas. Também, para a obtenção de um bom modelo biológico na pesquisa de envelhecimento, o organismo necessita mostrar mudanças ou deteriorações relacionadas à idade, principalmente, apresentar um ciclo de vida curto para o estudo ser realizado em pouco tempo (LUCAS-SÁ et al., 2014).

Peixes Anuais

Os peixes anuais compreendem um grupo da ordem Cyprinodontiformes com distribuição na África e nas Américas, sendo representado pelas famílias Nothobranchiidae e Rivulidae que estão intimamente relacionadas e apresentam características fisiológicas e ecológicas recíprocas (LANÉS, 2011).

O termo “peixes anuais” é designado às espécies que vivem ou são encontradas em áreas úmidas temporárias que secam sazonalmente (COSTA, 1998). Sendo assim, o ciclo de vida destes organismos é considerado curto e rápido, pois está intimamente relacionado à formação das áreas úmidas temporárias. Estas áreas se formam em épocas de chuva na qual proporciona o desenvolvimento, a reprodução e a deposição dos ovos no substrato, como uma estratégia de sobrevivência da população para o período em que ocorre a dessecação desta área. Na estação seca, estes ovos permanecem em estado de dormência (diapausa) no substrato até a próxima estação chuvosa que acarretará na

formação das áreas úmidas e, conseqüentemente, na eclosão dos ovos para a continuidade do ciclo de vida destes organismos (Fig. 3) (BEROIS et al., 2012; PODRABSKY; CARPENTER; HAND, 2001; PODRABSKY; HAND, 2015).

Contudo, estes ambientes temporários constituem diversas restrições no comportamento destes organismos exigindo mecanismos de adaptação específicos para que estes sobrevivam ao meio, tais como: elevada plasticidade fenotípica, rápida taxa de crescimento, maturação sexual precoce e produção de ovos resistentes à estação seca (LAUFER et al., 2009).

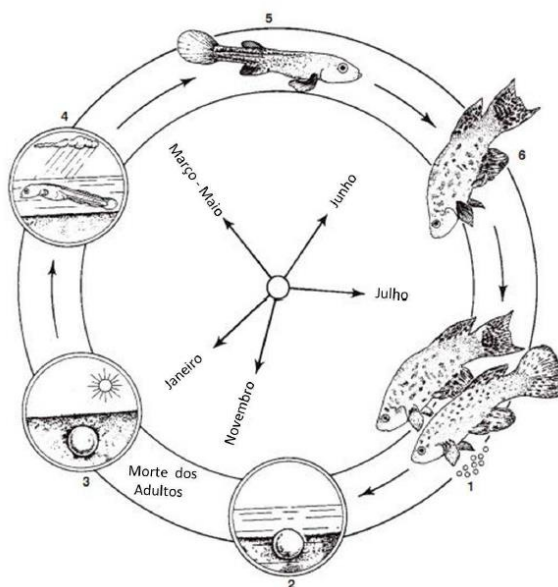


Fig. 3: Ilustração esquemática do ciclo de vida do peixe anual na região Sul do Brasil, baseado no ciclo de vida da espécie *Austrofundulus myersi* Dahl, 1958, representante da família Rivulidae. Fonte: Modificado por Lanés (2011) de Wourms (1972).

O mecanismo de diapausa é a adaptação mais notável dos peixes anuais, a qual permite a manutenção destas populações de peixes anuais em ambientes que secam completamente. Esta estratégia é análoga a determinados tipos de plantas (GUTTERMAN, 2002) e microcrustáceos (PODRABSKY; HAND, 2015). De maneira geral os ovos dos peixes anuais que são depositados no substrato apresentam diferentes fases de desenvolvimento embrionário (Diapausa I, II e III), estando o estágio de desenvolvimento intimamente relacionado com as condições ambientais. A diapausa I ocorre no início do desenvolvimento e está associada à dispersão e a reagregação dos blastômeros. Na diapausa II ocorre a formação do eixo embrionário, o estabelecimento das fundações do sistema nervoso central e o surgimento de baixos batimentos cardíacos (BEROIS et al., 2012; WOURMS, 1972). E, por fim, a diapausa III que acontece antes da eclosão, quando o embrião está bem desenvolvido eclodindo apenas

quando as condições do ambiente apresentarem-se favoráveis (BEROIS et al., 2012; PODRABSKY; HAND, 1999).

Segundo BEROIS et al. (2012), os peixes anuais apresentam diversas características semelhantes à de outros peixes, como: oviparidade, transparência de ovos e embriões, período reprodutivo intenso e longo, e fácil manutenção em laboratório. Em função de características como, ciclo de vida curto e rápido, crescimento acelerado, maturidade sexual precoce, e capacidade de estocagem dos ovos por meses, em condições laboratoriais, fazem com que estes organismos sejam reconhecidos como potenciais modelos biológicos para a pesquisa tanto básica como aplicada. Destacando-se ainda, que estes animais podem permitir o desenvolvimento de estudos que avaliem diferentes aspectos funcionais ao longo de fases específicas do ciclo de vida e do envelhecimento destes organismos (BEROIS et al., 2012).

A família Rivulidae ocorre desde a Argentina até o Sul da Flórida (LOUREIRO et al., 2018) e tem entre os seus representantes a espécie *Cynopoecilus fulgens* Costa, 2002, a qual é endêmica de áreas costeiras da região sul do Brasil. Estes organismos habitam ambientes aquáticos muito rasos e isolados, são de pequeno porte e caracterizam-se por uma dieta oportunista e generalista, se alimentando de organismos aquáticos (LAUFER et al., 2009). Além disso, a espécie *C. fulgens* encontra-se na categoria “*Vulnerável*” da Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção do Brasil (BRASIL, 2014) e do Rio Grande do Sul (RIO GRANDE DO SUL, 2014), devido à ação antrópica, principalmente a agricultura que tem destruído e alterado drasticamente seus habitats (VOLCAN et al., 2010). Cabe ressaltar, que apesar da grande representatividade de espécies da família Rivulidae e vários trabalhos enfatizando as espécies desta família como possível modelo biológico na pesquisa, estudos ainda são incipientes em relação à história natural, a ecologia e a fisiologia destes animais.

Frente a isto, este estudo propõe estabelecer e analisar marcadores fisiológicos relacionados ao balanço oxidativo em indivíduos de diferentes estágios de desenvolvimento pós-embrionário de *Cynopoecilus fulgens*, coletados em ambiente natural. Deste modo, obtendo uma caracterização do ciclo de vida pós-embrionário desses organismos, em termos de alterações fisiológicas naturais que podem contribuir para entendimento das adaptações da espécie ao meio e obter informações sobre a qualidade do ambiente aquático. Com isso, permitindo que tanto esta espécie como estes parâmetros fisiológicos possam ser utilizados em estudos que visem compreender

melhor aspectos ligados ao envelhecimento como também realizar ensaios toxicológicos em fases específicas do ciclo de vida.

**CAPÍTULO II: ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE
OXIDATIVO NA CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO
DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

1 **ECOFISIOLOGIA E BIOMARCADORES DE ESTRESSE**
2 **OXIDATIVO NA CARACTERIZAÇÃO DO CICLO DE**
3 **VIDA PÓS-EMBRIONÁRIO DE UMA ESPÉCIE DE PEIXE**
4 **ANUAL NEOTROPICAL**

5
6 Bruna Dutra de Castro^a, Natália Medeiros de Albuquerque Wingen^b, Robson Souza
7 Godoy^c, Leonardo Maltchik Garcia^c, Luis Esteban Krause Lanés^a, Guendalina Turcato
8 Oliveira^{a*}

9
10
11 ^a PUCRS, Escola de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Evolução da Biodiversidade,
12 Laboratório de Fisiologia da Conservação, Porto Alegre, RS, Brasil

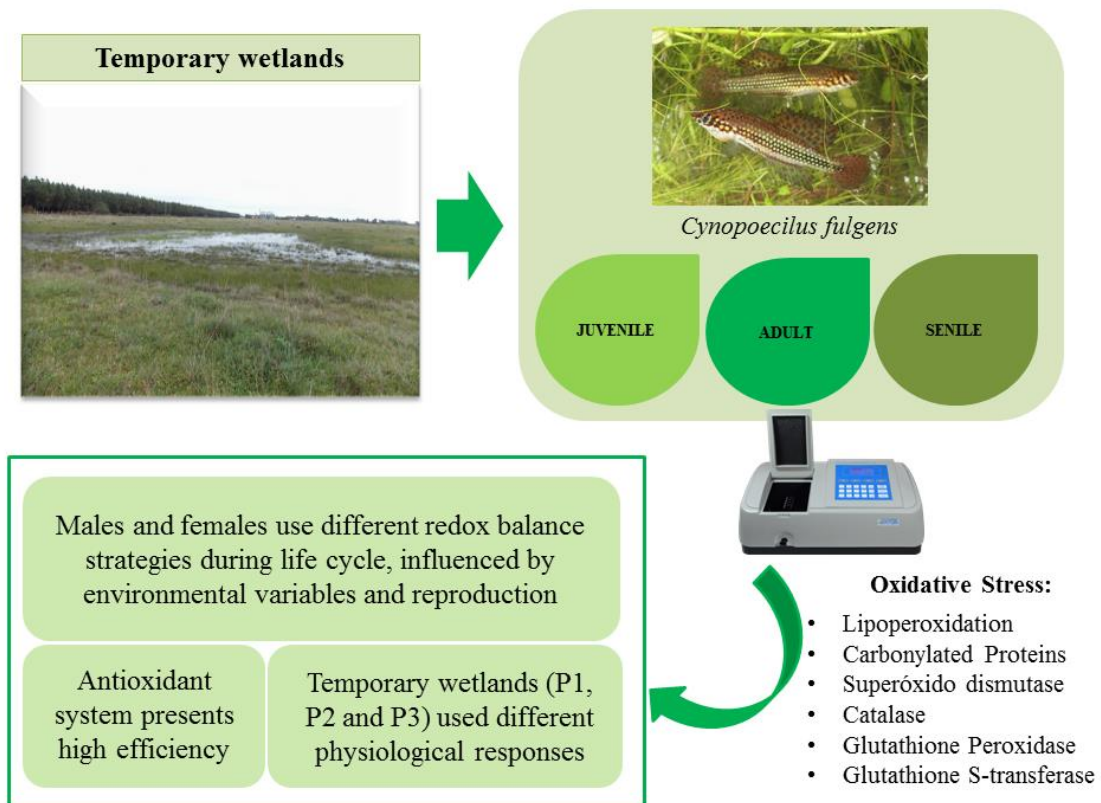
13 ^b PUCRS, Escola de Ciências, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Laboratório de Fisiologia
14 da Conservação, Porto Alegre, RS, Brasil

15 ^c UNISINOS, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biologia, Diversidade e
16 Manejo de Vida Silvestre, Laboratório de Ecologia e Conservação de Ecossistemas Aquáticos, São
17 Leopoldo, RS, Brasil

18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29 ***Autor Correspondente:** Guendalina Turcato Oliveira

30 Laboratório de Fisiologia da Conservação, Departamento de Ciências Morfofisiológicas, Escola de
31 Ciências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Avenida Ipiranga, 6681 Pd. 12, Bloco
32 C, Sala 270, 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

33
34
35 **Endereços de e-mail:** bruna.castro.001@acad.pucrs.br (B.D. Castro), natalia.wingen@acad.pucrs.br
36 (N.M.A. Wingen), lelanes@gmail.com (L.E.K. Lanés), robsonn_godoy@hotmail.com (R.S. Godoy),
37 maltchik@unisininos.br (L.M. Garcia), guendato@pucrs.br (G.T. Oliveira)



50

51

52 ***Highlights***

- 53 • Females show considerable investment in sexual maturation and egg production.
- 54 • Males indicated greater investment in somatic growth and body mass.
- 55 • Abiotic variables had a greater influence on TBARS, PT and GST.
- 56 • SOD and CAT were more influenced by biotic variables.
- 57 • Temporary wetlands fish P2/P3 presented similar in most oxidative balance markers.

58

59

60 **Resumo**

61 Peixes anuais são conhecidos por habitarem áreas úmidas temporárias que secam
62 sazonalmente e que determinam um ciclo de vida curto para estes organismos. Estas
63 características são consideradas promissoras para o uso destes animais como modelos
64 biológicos em pesquisas que envolvam processos de senescência, contudo ressalta-se a
65 falta de informações sobre o balanço oxidativo ao longo do ciclo de vida associado ao
66 processo de envelhecimento natural destes animais neotropicais em ambiente natural.
67 Neste estudo, padronizamos e analisamos marcadores fisiológicos relacionados ao
68 balanço redox do peixe anual *Cynopoeilus fulgens*, e testamos a influência de variáveis
69 ambientais nestes biomarcadores. Os espécimes foram coletados em diferentes estágios
70 do ciclo de vida (juvenis, adultos e senis) durante cinco meses, nos arredores do Parque
71 Nacional da Lagoa do Peixe - Rio Grande do Sul, em três diferentes unidades amostrais.
72 Os peixes foram eutanasiados, medidos (comprimento padrão), pesados (massa
73 corporal) e homogeneizados para a realização dos ensaios da Superóxido Dismutase,
74 Catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione S-transferase, e para determinação dos
75 níveis de Lipoperoxidação (TBARS), Proteínas Carboniladas e Proteínas Totais. Os
76 resultados mostraram que as populações da espécie estudada em cada unidade amostral
77 (área úmida temporária) apresentaram respostas fisiológicas distintas frente à adaptação
78 ao seu ciclo de vida pós-embriônico, evidenciando a influência do componente
79 ambiental como modulador do ciclo de vida destes animais. Adicionalmente, foi
80 observado que os animais das unidades amostrais P2 e P3 se comportam de maneira
81 semelhante entre si apresentando um ciclo de vida mais longo; sugerindo que o sistema
82 antioxidante destes animais apresenta alta eficiência mantendo os níveis de
83 lipoperoxidação e proteínas carboniladas baixos. Enquanto os da P1 têm seu ciclo de
84 vida pós-eclosão mais curto possivelmente devido ao incremento do estresse oxidativo
85 evidenciado pelo aumento da lipoperoxidação. Machos e fêmeas desta espécie se
86 utilizam de estratégias fisiológicas diferentes de seu balanço redox durante o ciclo de
87 vida, sendo este balanço influenciado pelo período reprodutivo, machos parecem
88 investir grande parte da energia para obter crescimento e massa corporal, e para a
89 procura pela parceira reprodutiva, enquanto fêmeas mostram investir esse gasto
90 energético na maturação sexual e produção dos ovos. Além disto, o perfil de resposta
91 destes biomarcadores é modulado por variáveis abióticas, como a temperatura, e
92 bióticas, como a abundância de predadores, abundância de *C. fulgens* e de uma espécie

93 simpátrica, *Austrolebias minuano*. Os resultados apontam que a utilização dos peixes
94 anuais neotropicais na pesquisa é altamente promissora, permitindo um estudo
95 aprofundado sobre o envelhecimento e ensaio toxicológico. Também, ressaltam a
96 necessidade do desenvolvimento de estratégias de conservação ambiental com o intuito
97 de manter as características deste habitat, estabelecendo estes animais como espécies
98 sentinelas.

99

100 Palavras-chave: Áreas úmidas temporárias; Balanço redox; Biomarcadores; Ciclo de
101 Vida; *Cynopoecilus fulgens*; Peixes anuais

102

103 **Abreviaturas**

104 PNPL, Parque Nacional da Lagoa do Peixe; ICMBIO, Instituto Chico Mendes de
105 Conservação da Biodiversidade; CEUA, Comissão de Ética para Uso de Animais;
106 PUCRS, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul; RS, Rio Grande do
107 Sul; P1, poça temporária 1; P2, poça temporária 2; P3, poça temporária 3; ORP,
108 potencial de redução da oxidação; NTU, turbidez; TDS, sólidos totais dissolvidos; OD,
109 oxigênio dissolvido; EROS, espécies reativas de oxigênio; GST, glutathione S-
110 transferase; CAT, catalase; SOD, superóxido dismutase; GPx, glutathione peroxidase;
111 LPO, lipoperoxidação; TBARS, ácido tiobarbitúrico; PC, proteína carbonilada; PT,
112 proteínas totais.

113

114 **1. Introdução**

115 Globalmente, os ecossistemas aquáticos estão sofrendo constantes interferências
116 e modificações através de ações antrópicas, desencadeando alterações marcantes na
117 qualidade do habitat e composição da biodiversidade (SAUNDERS; MEEUWIG;
118 VINCENT, 2002). Segundo Tylianakis et al. (2007), a principal causa global da
119 extinção e modificação na abundância de espécies é a alteração do habitat natural que,
120 consequentemente, pode influenciar na capacidade de interação entre os organismos.
121 São diversas as espécies presentes nestes ambientes aquáticos que podem estar correndo
122 risco de extinção e redução da população, destacando-se as espécies de peixes de água
123 doce que são consideradas um dos grupos mais ameaçado do mundo (SAUNDERS;
124 MEEUWIG; VINCENT, 2002).

125 A diversidade de peixes de água doce enfrenta uma grave crise em todo o mundo
126 (COLLEN et al., 2014; DARWALL; FREYHOF, 2015; DUDGEON et al., 2006).
127 Destacando-se a região sul do Brasil, que com a intensificação da atividade humana,
128 com destaque para a agricultura e a urbanização, está provocando diversas alterações
129 em ecossistemas naturais (ARIM et al., 2010; FONSECA et al., 2013; VOLCAN et al.,
130 2015). Dentre esses ecossistemas, as áreas úmidas são consideradas as mais ameaçadas,
131 principalmente, os ambientes efêmeros/ temporários (CALHOUN et al., 2017; LANÉS
132 et al., 2018; MALTCHIK et al., 2010, 2014) que são habitats aquáticos que secam
133 periodicamente e sofrem diversas variações físico-químicas da água (*e.g.*: O₂,
134 luminosidade, temperatura), como também, alterações em componentes bióticos (*e.g.*:
135 disponibilidade de alimento) (AREZO et al., 2007; BEROIS et al., 2012) ao longo de
136 seu ciclo de inundação.

137 Contudo, ressalta-se a grande diversidade biológica presente nestes ambientes
138 aquáticos temporários e a grande relevância ecológica que representam para esses
139 ecossistemas (CALHOUN et al., 2017; CREED et al., 2017). Além disso, abrangem
140 organismos especialistas, tais quais os peixes anuais que apresentam populações
141 pequenas e geograficamente isoladas, estando mais expostas às ações antrópicas e
142 possuindo maior vulnerabilidade e risco de extinção (FONSECA et al., 2013; BEROIS;
143 AREZO; DE SÁ, 2014; VOLCAN et al., 2015). Adicionalmente, a área de distribuição
144 das espécies de peixes anuais na região sul do Brasil, coincide com áreas
145 tradicionalmente utilizadas para o cultivo de arroz e soja, que além de provocarem
146 alteração e destruição de habitats aquáticos temporários (LANÉS et al., 2018), utilizam
147 grandes quantidades de agrotóxicos, principalmente herbicidas e inseticidas (VOLCAN
148 et al., 2015).

149 Os peixes anuais são definidos como um grupo da ordem Cyprinodontiformes e,
150 na sua maioria, compreendem espécies de pequeno porte e de água doce (ARENZON;
151 LEMOS; BOHRER, 2002; ARENZON; PERET; BOHRER, 2001; FONSECA et al.,
152 2013). Distribuem-se na região Neotropical (Família Rivulidae) e África (família
153 Nothobranchiidae) (FURNESS et al., 2015). São conhecidos por habitarem áreas
154 úmidas temporárias (ambientes efêmeros), as quais determinam o ciclo de vida curto
155 desses organismos, os quais exibem um crescimento rápido, maturidade sexual precoce
156 e reprodução contínua, além da produção de ovos de resistência (ARENZON; PERET;
157 BOHRER, 2001; ERREA & DANULAT, 2001; ARENZON; LEMOS; BOHRER,
158 2002; BEROIS et al., 2012; FONSECA et al., 2013; LANÉS; KEPPELER;

159 MALTCHIK, 2014). Assim, estes peixes são reconhecidos como excelentes modelos
160 biológicos para estudos de envelhecimento e ensaios toxicológicos devido às
161 peculiaridades acima citadas e facilidade de manutenção e estocagem de seus ovos por
162 meses em condições laboratoriais (ARENZON; PERET; BOHRER, 2001; ARENZON;
163 LEMOS; BOHRER, 2002; BEROIS et al., 2012)

164 O envelhecimento refere-se à deterioração da integridade fisiológica ao longo do
165 tempo, ou seja, é o processo que exhibe o aumento do risco da mortalidade relacionado à
166 idade devido ao declínio das funções vitais (BLAŽEK et al., 2017; DONG et al., 2017).
167 Segundo Dong et al. (2017) estes declínios, podem estar relacionados com disfunções
168 mitocondriais que ocorrem com o envelhecimento, podendo induzir a produção
169 exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) que por sua vez, podem conduzir a
170 um dano celular. No entanto, considera-se que o desenvolvimento de pesquisas no
171 processo de envelhecimento em vertebrados é limitado pela falta de modelos que
172 apresentem um ciclo de vida curto (GENADE et al., 2005). Segundo Liu et al. (2012),
173 os peixes anuais mostram diferentes padrões de envelhecimento e já foram realizados
174 alguns estudos em laboratório com espécies representantes da ordem
175 Cyprinodontiformes envolvendo pesquisas sobre testes de toxicidade (ARENZON et al.,
176 2003) e, também, no processo de envelhecimento em peixes anuais africanos (DI
177 CICCIO et al., 2011). Contudo, cabe ressaltar a inexistência de dados sobre o balanço
178 oxidativo ao longo do ciclo de vida associado ao processo de envelhecimento natural de
179 peixes anuais neotropicais em ambiente natural. Os trabalhos realizados com peixes
180 anuais africanos são baseados em estudos em condições controladas de laboratório,
181 sendo imprescindíveis pesquisas em ambiente natural para o avanço do entendimento do
182 processo de envelhecimento (REICHARD, 2016).

183 Considerando o balanço oxidativo, destaca-se a utilização de marcadores de
184 dano oxidativo, como as proteínas carboniladas e a peroxidação lipídica, além da
185 atividade das enzimas antioxidantes para avaliar o papel dos diferentes componentes do
186 sistema antioxidante, por exemplo, ao longo do envelhecimento ou sob a influência de
187 estressores ambientais (LIU et al., 2012). Segundo Cooke et al. (2013), tais ferramentas
188 fisiológicas podem ser utilizadas para caracterizar a diversidade biológica e suas
189 implicações ecológicas; como também, compreender as respostas dos organismos às
190 variações ambientais e a agentes estressores, sendo essas alterações acompanhadas de
191 estratégias bioquímicas e fisiológicas do animal em resposta a adaptação ao meio
192 (BRAGHIROLI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; PINHEIRO & OLIVEIRA, 2016).

193 Este sistema de defesa antioxidante dos animais tem como função neutralizar as
194 EROs produzidas em excesso, prevenindo danos as estruturas celulares. Neste contexto,
195 como parte do sistema antioxidante enzimático as enzimas superóxido dismutase
196 (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) representam a primeira linha de
197 defesa contra o estresse oxidativo. A SOD tem o papel de prevenir a peroxidação
198 lipídica, pois catalisa a dismutação do ânion radical superóxido (O_2^{\bullet}) convertendo em
199 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). Apesar do peróxido de hidrogênio ser
200 mais lesivo as células que o próprio ânion superóxido, ele é rapidamente convertido em
201 O_2 e H_2O por ação da CAT, encontra-se ativa preferencialmente nos peroxissomas
202 (APEL; HIRT, 2004). A enzima glutathione peroxidase (GPx) que catalisa a redução do
203 peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e dos peróxidos orgânicos em moléculas menos reativas,
204 atuando principalmente na mitocôndria e eventualmente no citosol (APEL; HIRT,
205 2004; HERMES-LIMA, 2004). As GSTs estão presentes em quase todos os organismos
206 e são um importante mecanismo de biotransformação intracelular de endo e
207 xenobióticos (PAPADOPOULOS et al., 2004); além disto, dentre suas funções não
208 associadas diretamente com a biotransformação estão o reparo de macromoléculas
209 oxidadas por espécies reativas de oxigênio, a regeneração de proteínas S-tioladas e a
210 biossíntese de metabólitos fisiologicamente importantes (ARMSTRONG, 1997;
211 SHEEHAN et al., 2001).

212 A espécie *Cynopoecilus fulgens* Costa, 2002 é um peixe anual pertencente à
213 família Rivulidae, endêmica da Planície Costeira da região sul do Brasil, onde a
214 atividade agrícola constitui a principal atividade econômica (LANÉS, 2011). Estudo
215 realizado por Lanés et al. (2016), demonstrou a existência de uma única coorte etária
216 nas suas populações, sendo a expectativa de vida destes organismos de
217 aproximadamente oito meses em ambiente natural. Estes animais apresentam um
218 tamanho corporal reduzido (aproximadamente ~50 mm), aumentando gradualmente ao
219 longo do ciclo de vida, sendo os machos mais coloridos e geralmente maiores que as
220 fêmeas (LANÉS; KEPPELER; MALTCHIK, 2014; LANÉS et al., 2016). A densidade
221 das populações de *C. fulgens* diminui gradualmente ao longo do seu ciclo de vida,
222 ocorrendo diferença na taxa de mortalidade entre os sexos, com os machos apresentando
223 uma taxa de mortalidade mais elevada, o que pode estar relacionado a diferenças
224 fisiológicas entre os sexos e ao padrão de coloração que aumenta o risco de predação
225 (LANÉS et al., 2014, 2016).

226 No habitat efêmero, esses rivulídeos são considerados predadores de topo,
227 generalistas e oportunistas, apresentando uma dieta que consiste em organismos
228 aquáticos (e.g.: zooplâncton, ovos, larvas de insetos, algas e diatomáceas)
229 (GONÇALVES; SOUZA; VOLCAN, 2011; LAUFER et al., 2009). Contudo, após
230 períodos de precipitação intensa as áreas úmidas temporárias podem se conectar com
231 massas d'água permanentes e serem colonizadas por outras espécies de peixes com ciclo
232 de vida não-anual, inclusive grandes predadores. A distinção da dieta dos peixes anuais
233 está relacionada com as transformações do seu tamanho corporal, pois à medida que
234 aumentam de tamanho são acrescentadas presas maiores à dieta e presas menores são
235 suprimidas (KEPPELER et al., 2013, 2014; LAUFER et al., 2009). De maneira geral, os
236 peixes anuais são considerados um grupo taxonômico de grande importância
237 conservacionista (VOLCAN; LANÉS, 2018), representando um dos grupos de
238 vertebrados mais ameaçados do Brasil. Inclusive, os peixes anuais são considerados
239 espécies bandeira para a conservação destas áreas úmidas temporárias (LANÉS et al.,
240 2016, 2018). Particularmente, a espécie *C. fulgens* encontra-se enquadrada na categoria
241 “Vulnerável” da lista de espécies ameaçadas de extinção do Brasil e do Rio Grande do
242 Sul (BRASIL, 2014; RIO GRANDE DO SUL, 2014).

243 Dessa forma, compreender os impactos do ciclo de vida e das variações
244 ambientais geradas sobre as populações de peixes anuais torna-se fundamental.
245 Investigações quanto à resposta ao estresse fisiológico podem ser avaliadas utilizando
246 biomarcadores fisiológicos, por meio da atividade das enzimas do metabolismo
247 intermediário, do balanço oxidativo e de biotransformação (BRAGHIOLLI;
248 OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; COOKE et al., 2013; DANTZER et al., 2014).

249 Nesse sentido, o objetivo deste trabalho é estabelecer e analisar marcadores
250 fisiológicos relacionados ao balanço redox do peixe anual *Cynopoecilus fulgens*, em
251 diferentes estágios de desenvolvimento pós-embrionário, coletados em ambiente natural
252 ao longo do ciclo de vida da espécie. Isto é especialmente importante, já que
253 recentemente ZEBRAL et al. (2018) demonstraram efeitos deletérios de herbicida a
254 base de glifosato, o qual provocou uma redução da fertilidade, tolerância termal e
255 alteração no desenvolvimento embrionário de uma espécie de peixe anual endêmica da
256 região Sul do Brasil. Inclusive nessa mesma região QUINTELA et al. (2019)
257 verificaram uma contaminação por arsênio sem precedentes em peixes não anuais,
258 atribuída à utilização indiscriminada de agrotóxicos utilizados para a produção agrícola.

259 Assim, a expectativa deste estudo foi verificar e estabelecer um padrão dos
260 biomarcadores relacionado com o início, o meio e o fim do ciclo de vida pós-eclosão
261 para esta espécie. Esperava-se que o início do ciclo fosse marcado pelo aumento dos
262 marcadores de dano oxidativo associados à reprodução (maturação e cópula), aliado a
263 um incremento das enzimas antioxidantes a fim de manterem o balanço oxidativo; e que
264 o final do ciclo de vida (fase senescente) fosse marcado pelo declínio das atividades das
265 enzimas e aumento do dano oxidativo, culminando com o envelhecimento e morte dos
266 animais. Adicionalmente, testamos a influência de variáveis ambientais de diferentes
267 tipos (parâmetros físico-químicos da água, habitat e bióticas) nos diferentes
268 biomarcadores analisados.

269 **2. Materiais e Métodos**

270 Todos os procedimentos executados nessa pesquisa, foram realizados com as
271 devidas autorizações do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
272 (ICMBio - sob o número: 43251-4), chefia do Parque Nacional da Lagoa do Peixe
273 (PNLP) e da Comissão de Ética para Uso de Animais da Universidade do Vale do Rio
274 dos Sinos (CEUA- UNISINOS: PPECEUA 12.2015) que englobam a coleta e a
275 eutanásia dos animais. Como também, com a aprovação da Comissão de Ética para Uso
276 de Animais da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (CEUA- PUCRS:
277 8271) para a realização dos protocolos experimentais, contando com cadastro no
278 Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional
279 Associado (SisGen: A732684).

280 **2.1 Procedimentos em Campo**

281 Foram coletados exemplares de *Cynopoecilus fulgens*, em diferentes unidades
282 amostrais/áreas úmidas temporárias (P1, P2 e P3), durante os meses de junho (etapa
283 inicial do ciclo), julho, setembro, outubro e novembro (final do ciclo de vida) durante o
284 ano de 2016, considerando à época de chuvas em que há a formação dos ambientes
285 aquáticos temporários e consequentemente, a presença destes animais. Contudo, no mês
286 de novembro mesmo que as unidades amostrais apresentassem um volume mínimo de
287 água não havia mais peixes anuais. Coordenadas geográficas de cada unidade amostral:
288 **P1** (W 51°05'15", S 31°18'13"), **P2** (W 51°05' 17", S 31°18'14") e **P3** (W 51°08'03", S
289 31°16'46").

290 A periodicidade das amostragens foi delineada de forma a permitir o
291 acompanhamento de todo o ciclo de vida pós-eclosão da espécie estudada. A coleta foi
292 realizada nos municípios de Tavares e Mostardas, arredores do Parque Nacional da
293 Lagoa do Peixe (31° 02' –31° 48' S; 50° 77' –51° 15' W) localizado na Planície Costeira
294 Externa do Rio Grande do Sul, a qual apresenta uma elevada biodiversidade e grande
295 quantidade de áreas úmidas de diferentes tipologias (LANÉS & MALTCHIK, 2010;
296 LANÉS et al., 2016).

297 Durante cada campanha de coleta foram medidos e registrados os parâmetros
298 físico-químicos da água (temperatura, potencial de oxiredução (ORP), turbidez (NTU),
299 oxigênio, oxigênio dissolvido (OD), sólidos totais dissolvidos (TDS), salinidade, pH e
300 condutividade), com uso de uma sonda multi-Parâmetros HORIBA U-50. Além disso,
301 foi realizada a medida de cada área úmida temporária durante cada amostragem no
302 local, como a área superficial (m²), através de GPS percorrendo os limites da área úmida
303 temporária para posteriormente calcular e a profundidade máxima da água (cm), por
304 meio de régua milimetrada. Para obter uma estimativa sobre o hidroperíodo das áreas
305 úmidas temporárias, a temperatura e a luminosidade foram determinadas por meio de
306 data logger (Hobo UA-002-08; Onset Ltd), com registro de 3h-3h, até a dissecação
307 completa de cada poça temporária.

308 O procedimento de captura no campo foi realizado através de coleta ativa com o
309 auxílio de um puçá/rede de mão (60 × 40 cm e 2 mm de malha), seguindo a
310 metodologia já aplicada para o grupo de interesse (LANÉS et al., 2016; VOLCAN et
311 al., 2015). O número total de espécimes de *C. fulgens* coletados nesse estudo foi de 443
312 animais, de ambos os sexos e em diferentes estágios do ciclo de vida (juvenis, adultos e
313 senis). Após, esses exemplares foram sexados e eutanasiados no local de coleta,
314 considerando a baixa massa corporal como também a necessidade de não ter
315 interferência química nos parâmetros a serem analisados, conforme as recomendações
316 do CONCEA (Diretrizes e Práticas de Eutanásia do CONCEA, 2013). Todo o material
317 biológico foi etiquetado, armazenado em caixas térmicas com gelo e transportado para o
318 Laboratório de Fisiologia da Conservação – PUCRS, onde foram armazenados em
319 freezer (-80°C) para realização a posteriori das análises bioquímicas.

320 Os dados bióticos (riqueza de predadores, abundância de predadores, abundância
321 de *Austrolebias minuano*, espécie simpátrica de peixe anual, abundância de *C. fulgens*,
322 riqueza de peixes e abundância de peixes não anuais) também foram registrados. Foram
323 considerados espécies de peixes potencialmente predadoras de rivulídeos: *Hoplias*

324 *malabaricus*, *Oligosarcus jenynsii*, *Oligosarcus robustus*, *Cichlassoma portalegrensis*,
325 além de larvas de insetos da ordem Odonata, hemípteros aquáticos da família
326 Belostomatidae e lagostins do gênero *Parastacus*.

327

328 **2.2 Procedimentos em Laboratório**

329 No laboratório, os animais foram separados pelo sexo, mês de coleta (estágio do
330 ciclo) e unidade amostral (P1, P2 ou P3) em que foram coletados. Posteriormente, estes
331 foram divididos: uma parte para quantificação de Proteínas Carboniladas e outra
332 formando *pools* para a quantificação das enzimas, Proteína Total e Lipoperoxidação.
333 Foram realizados de 3 até 8 *pools* por sexo, composto de dois até três animais, para cada
334 poça em cada mês. Para os animais das poças 3 (P3) coletados no mês de outubro o
335 homogeneizado foi feito por indivíduo, sendo usado no mínimo três indivíduos para
336 cada parte; tal procedimento foi adotado pois encontramos e coletamos um número
337 menor de animais. Já para a poça P1 não encontramos animais no mês de outubro.

338 Todos os animais foram pesados (massa corporal) e medidos (comprimento
339 padrão) paquímetro digital (0,01 cm) e com balança analítica (0,001 g) respectivamente,
340 para serem em seguida homogeneizados e analisados.

341

342 **2.2.1 Preparação do Homogeneizado para as medidas de Dano Oxidativo e para os** 343 **Ensaio Enzimáticos**

344 Os indivíduos inteiros (*pool* de dois a três animais, exceção do P3 outubro que foi
345 por indivíduo) foram homogeneizados, em solução de tampão Fosfato (20 mM, pH 7,4,
346 acrescida de PSMF 1 mM e cloreto de potássio a 140 mM), em volume de sete vezes a
347 massa obtido (1g: 7ml), com o auxílio de um Ultra-Turrax® (IKA-WERK), em banho
348 de gelo (0-4°C). Em seguida, o homogeneizado foi centrifugado (SORVALL RC-5B
349 Refrigerated Superseed Centrifuge), sob refrigeração (4°C) a 1000 xg, por 10 minutos.
350 O sobrenadante foi utilizado para os ensaios enzimáticos da SOD, CAT, GPx e GST, e
351 quantificação das Proteínas Totais e da LPO, todas as amostras foram conservadas em -
352 20°C até a realização das quantificações; conforme método já descrito por PERSCH et
353 al. (2017, 2018).

354

355

356

357 2.2.2 *Proteínas Totais do Sobrenadante*

358 A amostra de proteínas do sobrenadante foi quantificada usando o kit comercial
359 de Proteína Total da BioTécnica. O ensaio é baseado na reação das proteínas presentes
360 na amostra com íons de cobre, em meio alcalino. O produto dessa reação resulta numa
361 cor violácea que é detectada numa absorvância de 550nm.

362

363 2.2.3 *Dano Oxidativo*

364 Lipoperoxidação (LPO): A lipoperoxidação foi determinada seguindo o método
365 descrito por BUEGE & AUST (1978), técnica bastante utilizada para medir o dano dos
366 lipídios de membrana, através da detecção de substâncias que reagem ao ácido
367 tiobarbitúrico (TBARS). Para a quantificação dos níveis de Lipoperoxidação foram
368 adicionados em microtubos: 300µL de ácido tricloroacético (TCA), 200µL de ácido
369 tiobarbitúrico (TBA), 100µL de água Milli-Q e 100µL da amostra do homogeneizado.
370 Estes microtubos foram aquecidos a 100°C durante 15 minutos e resfriados durante 10
371 minutos. Em seguida, foi acrescentado 600µL de álcool n-butílico, agitados em Vórtex e
372 centrifugados em 1200 xg durante 10 minutos (LIMA; ABDALLA, 2001). A
373 concentração de TBARS foi medida em espectrofotômetro com comprimento de onda
374 de 535nm e o resultado foi expresso em nmoles TBA. mg de proteínas⁻¹.

375

376 Proteínas Carboniladas (PC): A quantificação de carbonilação de proteínas é um
377 método para determinar a existência de estresse oxidativo em amostras biológicas, que
378 levam a uma maior oxidação e, conseqüentemente, à degradação das mesmas. A
379 quantificação foi por espectrofotometria com comprimento de onda de 370nm, e com o
380 resultado expresso em µmoles. mg de proteínas⁻¹, baseada no método descrito por
381 LEVINE et al. (1994).

382

383 2.2.4 *Ensaio Enzimáticos*

384 Superóxido dismutase: Para a determinação da atividade da SOD foi empregado
385 o método que se baseia na inibição da reação entre o radical superóxido e a epinefrina.
386 Com a oxidação da epinefrina, obtém-se a formação de um produto colorido
387 (adrenocromo), que é detectado através de cinética enzimática por espectrofotometria a
388 480nm. O meio de reação consiste de glicina-NaOH (50mM, pH 11) e epinefrina
389 (1mM) (BOVERIS & CADENAS, 1982). Para a realização desse procedimento,

390 primeiramente, as amostras foram centrifugadas em 1000 xg durante 3 minutos a 4°C; e
391 para a determinação da atividade da SOD as curvas foram verificadas em 20µL, 30µL e
392 40µL de amostra. Os resultados foram expressos em unidades de SOD. mg de PT⁻¹. min⁻¹,
393 sendo uma unidade de SOD correspondente a quantidade de enzima que inibe em
394 50% a velocidade de oxidação do detector utilizado, neste caso a epinefrina.

395

396 Catalase: A atividade da CAT foi determinada por meio da avaliação do
397 decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Para a realização deste protocolo,
398 primeiramente foi feita a centrifugação das amostras em 3000 xg durante 5 minutos a
399 4°C; em seguida, foi utilizada uma cubeta de quartzo, na qual foi adicionado 955µL do
400 tampão fosfato de sódio e uma alíquota de 10µL de amostra, para posteriormente ser
401 feita a calibração do espectrofotômetro e ser descontado do branco do tampão fosfato.
402 Após a calibração, foi acrescentado 35µL de peróxido de hidrogênio e monitorada a
403 atividade da enzima em 240nm, sendo considerada a leitura a cada 10 seg., durante por
404 X min. Os resultados foram expressos em nmoles H₂O₂ min⁻¹. mg de proteínas⁻¹
405 (BOVERIS & CHANCE, 1973).

406

407 Glutathione Peroxidase: A atividade da GPx foi determinada por cinética através
408 da dismutação do t-BuOOH pela oxidação da GSH e formação de GSSG, catalisada
409 pela GPx, na qual a oxidação do NADPH é detectada em 340nm. Para a realização do
410 protocolo as amostras foram centrifugadas a 1000 xg durante 3 minutos a 4°C. Após, foi
411 utilizado uma cubeta de quartzo e acrescentado 350ul da mistura de reação e 45ul do
412 sobrenadante obtido após a centrifugação. O resultado foi expresso em µmoles de
413 NADPH consumido. min⁻¹. mg de proteínas⁻¹ (WENDEL; FEUERSTEIN, 1981).

414

415 Glutathione S-transferase: A atividade da GST foi quantificada seguindo o
416 método descrito por BOYLAND e CHASSEAUD (1969), por meio da conjugação do 1-
417 cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB), com a glutathione reduzida (GSH). As amostras foram
418 centrifugadas em 1000 xg durante 3 minutos antes dos procedimentos de leitura do
419 sobrenadante no espectrofotômetro. A atividade da GST é medida em absorbância de
420 340nm e o resultado é expresso em nmoles de conjugado CNDB. min⁻¹. mg de
421 proteínas⁻¹.

422

423

424 2.3 Análises Estatísticas

425 Antes das análises, todos os dados foram avaliados examinando possíveis *outliers*
426 ou padrões incomuns de distribuição, e testados quanto à sua normalidade pelo teste de
427 Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade através do teste de Levene. Para dados com
428 distribuição normal ($p > 0,05$) foram utilizados testes paramétricos.

429 Para analisar a variação dos biomarcadores foi utilizado o teste de análise de
430 variância de uma via (*one-way* ANOVA), com correção de Bonferroni, comparando os
431 biomarcadores por mês (período da amostragem), e o teste de análise de variância de
432 duas vias (*two-way* ANOVA), comparando os biomarcadores por mês e por sexo. As
433 análises com ANOVA para os biomarcadores foram realizadas com dados agrupados de
434 todas as unidades amostrais (P1, P2 e P3) e, também, separadamente para cada unidade
435 amostral. A variação do tamanho corpóreo e do peso dos indivíduos foram testadas
436 através de *one-way* ANOVA (comparando os meses entre si) e *two-way* ANOVA
437 considerando o período e o sexo, separadamente para cada poça temporária. As análises
438 estatísticas de variância foram realizadas no Programa SPSS Statistics, versão 17.0.
439 Foram consideradas significativas quando o $p < 0,05$ e todos os resultados foram
440 expressos com média \pm erro padrão.

441 Para testar a influência das variáveis ambientais nos biomarcadores, foram
442 utilizados modelos de regressões lineares múltiplas para cada uma das variáveis
443 resposta avaliadas (Proteínas totais, TBARS, PC, SOD, CAT, GPx e GST). As variáveis
444 dependentes (biomarcadores) foram transformadas para coeficiente de *Hellinger*. Para
445 eliminar os efeitos das colinearidades entre as variáveis explicativas foi realizada uma
446 pré-seleção em cada matriz de variáveis explicativas, por meio de seleção *Forward*. A
447 matriz ambiental final foi, portanto, constituída daquelas variáveis explicativas que não
448 foram excluídas pelo fator de inflação de variância (VIF). O VIF é geralmente utilizado
449 como um indicador de multicolinearidade entre as variáveis explicativas, sendo que
450 valores acima de 1 ($VIF > 1$) indicam que a variável não está relacionada a nenhuma
451 outra variável preditora do modelo, enquanto valores acima de 10 ($VIF > 10$) sugerem
452 forte colinearidade (ZUUR; IENO; ELPHICK, 2010). A contribuição relativa de cada
453 categoria de variável ambiental foi obtida através de Análise de Partição de Variância
454 (rotina VARPARP) (PERES-NETO et al., 2006). Para tanto, as variáveis ambientais
455 foram categorizadas em (i) “Habitat”, (ii) “Bióticas” e (iii) “Físico-Químicas”. As
456 variáveis incluídas no componente “Habitat” foram constituídas pela área (tamanho da
457 área úmida) e profundidade. As variáveis “Bióticas” foram representadas pela riqueza

458 de predadores, abundância de predadores, abundância de *Austrolebias minuano*,
459 abundância de *Cynopoeilus fulgens*, riqueza de peixes não anuais e abundância de
460 peixes não anuais. As variáveis físico-químicas da água foram temperatura, pH,
461 condutividade, NTU (turbidez) e oxigênio dissolvido (OD). A matriz de resposta foi
462 composta pelos biomarcadores analisados (Proteínas totais, TBARS, CAT, GST, SOD)
463 e as matrizes explicativas foram constituídas por X1 - habitat; X2 – variáveis bióticas;
464 X3 – variáveis físico-químicas da água. As análises estatísticas referentes à relação das
465 variáveis ambientais com os biomarcadores de metabolismo e stress oxidativo
466 investigados foram todas realizadas no ambiente estatístico R (versão 3.5.1), através dos
467 pacotes *vegan* (OKSANEN et al., 2018) para as análises de regressão múltipla, e
468 *adespatial* (DRAY et al., 2018) para a partição da variância. Estas análises foram
469 realizadas com dados agrupados de todas as unidades amostrais (P1, P2 e P3) e ambos
470 os sexos.

471 3. Resultados

472 3.1 Crescimento, peso e níveis de proteínas totais dos indivíduos

473 Os resultados mostram que na poça P1 as fêmeas tiveram um aumento nos níveis
474 de PT no mês de julho (Fig. 4A). Este padrão também foi observado para os machos da
475 P1 (Fig.4A); não havendo assim, diferença estatística entre os sexos em cada mês na P1
476 para PT ($F_2 = 0,944$; $p = 0,40$). Em relação aos dados do crescimento, estes indicam que
477 tanto as fêmeas como os machos apresentaram um aumento no comprimento padrão do
478 mês de junho para julho (Fig.4D). Houve diferença estatística entre os sexos, ao longo
479 dos meses, na P1 para o CP ($F_2 = 10,247$; $p < 0,01$). Já os resultados referentes à massa
480 corporal mostraram que as fêmeas da P1 têm um aumento da massa no mês de setembro
481 (Fig.4G). Em machos da P1 é observado um declínio na massa corporal; contudo, tem-
482 se no último mês (setembro) o incremento desta, sendo semelhante à massa inicial no
483 mês de junho (Fig.4G). Houve diferença significativa entre os sexos no decorrer dos
484 meses, na P1, para massa corporal ($F_2 = 13,682$; $p < 0,01$).

485 Na poça P2, os resultados mostraram que os níveis de PT em fêmeas e em machos
486 apresentam um aumento do mês de junho para julho (Fig.4B). Não houve diferença
487 estatística entre os sexos ao longo dos meses na P2 para PT ($F_3 = 1,667$; $p = 0,19$). Já os
488 resultados observados para o comprimento padrão, mostraram que ambos os sexos

489 apresentaram uma tendência em crescimento linear ao longo dos meses; contudo, as
490 fêmeas apresentaram um crescimento mais tardio (outubro) comparado aos machos que
491 apresentaram já no mês de setembro (Fig.4E). Houve diferença significativa entre os
492 sexos ao longo dos meses na P2 para CP ($F_3 = 4,623$; $p < 0,01$). Além disso, observou-se
493 que as fêmeas da P2 parecem manter a massa corporal durante o mês de junho e julho, e
494 após ocorre um incremento de massa corporal nos meses finais do ciclo (Fig.4H). Já os
495 machos tiveram uma diminuição da massa corporal do mês de junho para julho, contudo
496 nos últimos meses apresentaram um incremento da massa como as fêmeas (Fig.4H).
497 Houve diferença estatística entre machos e fêmeas ao longo do ciclo na P2 para massa
498 corporal ($F_3 = 4,184$; $p < 0,01$).

499 Os dados referentes à poça P3 mostraram que os níveis de PT em fêmeas e
500 machos apresentaram um aumento nos meses finais (setembro e outubro) quando
501 comparado aos iniciais estudados (Fig.4C). Além disso, na poça P3 observou-se que
502 ambos os sexos apresentaram um crescimento linear ao longo dos meses (Fig.4F). Este
503 mesmo padrão foi observado para o resultado da massa corporal em fêmeas e machos da
504 P3, que segue uma linearidade no decorrer dos meses, porém os machos já apresentam
505 um aumento da massa corporal no mês de julho, enquanto as fêmeas só em setembro
506 (Fig. 4I). Não houve diferença estatística entre os sexos ao longo dos meses para PT
507 ($F_3 = 0,684$; $p = 0,06$), comprimento padrão ($F_3 = 0,143$; $p = 0,93$) e massa corporal ($F_3 =$
508 $1,587$; $p = 0,20$) na P3.

509 Quando comparamos os resultados das unidades amostrais, observamos que os
510 níveis de PT aumentaram no mês de julho para as poças P1 e P2 para ambos os sexos
511 (Fig. 4A e 4B), contudo na P3 este aumento só foi observado nos últimos meses (Fig.
512 4C). Já o comprimento padrão destes animais, mostrou que as poças P2 e P3 (Fig. 4E e
513 4F) apresentaram uma tendência a crescimento linear em machos e fêmeas, mas na P1
514 este crescimento foi destacado no mês de julho (Fig. 4D). E, a massa corporal destes
515 animais mostrou que em fêmeas de todas as poças tem-se um aumento da massa no mês
516 de setembro (Fig. 4G, 4H e 4I). Contudo, em machos da P1 e da P2 observa-se um
517 declínio de massa corporal no mês de julho, seguido de um aumento nos meses
518 seguintes (Fig. 4G e 4H). Já na P3 os machos tiveram um aumento linear ao longo do
519 ciclo de vida (Fig. 4I).

520

521

522

523 3.2 Níveis de dano oxidativo

524 Os níveis de lipoperoxidação (TBARS) nas fêmeas da P1 mostraram-se constantes
525 ao longo do ciclo, mesmo apresentando uma tendência de aumento ao longo dos meses
526 (Fig. 5). Contudo, machos da P1 apresentaram um aumento significativo no último mês
527 (setembro) quando comparado aos meses iniciais (Fig. 5). Não houve diferença
528 estatística entre os sexos ao longo dos meses na P1 para TBARS ($F_2 = 1,122$; $p = 0,34$).
529 Já os níveis de proteínas carboniladas (PC) em fêmeas e machos da P1 apresentaram-se
530 altos no mês de junho seguido de um declínio até o último mês estudado (setembro)
531 (Fig. 5). Houve diferença significativa entre machos e fêmeas da P1, ao longo dos
532 meses para PC ($F_2 = 10,536$; $p < 0,01$).

533 As fêmeas e os machos da P2 apresentaram uma diminuição dos níveis de
534 TBARS ao longo do ciclo (Fig. 6). Os testes não mostraram diferença significativa entre
535 os sexos, ao longo dos meses, na P2 para TBARS ($F_3 = 0,513$; $p = 0,68$). Já os
536 resultados das PC para ambos os sexos da P2 indicaram um pico de PC no início do
537 ciclo, seguido de um declínio destes níveis e posterior aumento no mês de outubro (Fig.
538 6). Teve diferença significativa entre machos e fêmeas ao longo dos meses na P2 para
539 PC ($F_3 = 35,225$; $p < 0,01$).

540 Os resultados do TBARS na P3 em fêmeas mostraram um pico no mês de junho,
541 declínio destes níveis até setembro e o retorno para valores semelhantes aos iniciais no
542 último mês (Fig. 7). Já em machos estes níveis mostraram-se constantes ao longo do
543 ciclo (Fig. 7). Além disso, os resultados observados de PC em fêmeas e machos da P3
544 apresentaram oscilações no decorrer dos meses, contudo ambos os sexos apresentaram
545 um pico de PC no mês de junho e diminuição desses níveis no último mês (outubro)
546 (Fig. 7). Não houve diferença estatística para ambos os sexos ao longo dos meses na P3
547 para TBARS ($F_3 = 2,441$; $p = 0,09$) e PC ($F_3 = 2,891$; $p = 0,06$).

548 Em relação aos níveis de TBARS quando comparamos todas as unidades
549 amostrais, foi possível observar que temos comportamentos diferentes das poças (P1, P2
550 e P3). Contudo, os resultados da P2 e P3 indicam um aumento de TBARS no mês de
551 junho e um posterior declínio destes níveis (Fig. 6 e 7), o que não foi visto para a P1 que
552 apresenta uma tendência ao aumento dos níveis de TBARS ao longo dos meses (Fig. 5).
553 Já para as PC das fêmeas e dos machos em todas as poças verificamos um pico nos
554 níveis de PC no mês de junho e uma redução no mês de julho (Fig. 5, 6 e 7). Contudo,
555 na P2 observa-se um aumento dos níveis de PC no último mês (outubro) tanto em

556 machos como em fêmeas (Fig. 6); e, na P3 este aumento dos níveis de PC, em ambos os
557 sexos, ocorre em setembro, mas seguido de uma diminuição no último mês (Fig.7).

558

559 3.3 *Atividade das enzimas antioxidantes e de biotransformação*

560 Os resultados da SOD na poça P1 mostraram que tanto fêmeas como machos
561 apresentaram um pico de atividade no último mês (setembro) (Fig. 5). Houve diferença
562 estatística entre os sexos ao longo dos meses na poça P1 para SOD ($F_2 = 3,656$; $p < 0,04$).
563 Além disso, os níveis de atividade da CAT em ambos os sexos na P1 mantiveram-se
564 constantes ao longo do ciclo (Fig. 5). Não houve diferença significativa na P1 para CAT
565 ($F_2 = 0,726$; $p = 0,49$). Já a atividade da GPx nas fêmeas da poça P1 apresentou-se
566 constante ao longo do ciclo, como a CAT (Fig. 5); enquanto os machos da poça P1
567 indicam uma diminuição da atividade da GPx no mês de julho e um incremento na
568 atividade desta enzima no final do ciclo (setembro) (Fig.5). Houve diferença estatística
569 entre os sexos ao longo dos meses na poça P1 para GPx ($F_2 = 6,466$; $p < 0,02$). E a
570 atividade da GST na P1 em ambos os sexos segue o mesmo padrão da enzima SOD,
571 apresentando um pico de atividade no mês de setembro (Fig. 5). Houve diferença
572 estatística na P1 para GST ($F_2 = 4,652$; $p < 0,02$).

573 Já os resultados observados da SOD na poça P2 mostraram que tanto machos
574 como fêmeas apresentam uma alta atividade da enzima no começo de ciclo (junho) e um
575 declínio já nos meses seguintes (Fig.6). A CAT em fêmeas da poça P2 mostrou uma
576 atividade constante da enzima ao longo do ciclo, contudo em machos tem-se um pico de
577 atividade da CAT em junho e diminuição no decorrer dos meses (Fig. 6). Também, a
578 atividade da GPx para ambos os sexos da poça P2 manteve-se constante ao longo do
579 ciclo (Fig. 6). E, a enzima GST apresentou o mesmo padrão de atividade que a SOD
580 para ambos os sexos da poça P2, ou seja, uma alta atividade no início do ciclo e seguido
581 de uma diminuição (Fig. 6). Não houve diferença estatística entre os sexos ao longo dos
582 meses para SOD ($F_3 = 0,099$; $p = 0,96$), CAT ($F_3 = 1,512$; $p = 0,22$), GPx ($F_3 = 0,503$; p
583 $= 0,69$) e GST ($F_3 = 0,196$; $p = 0,90$) na P2.

584 Em relação aos resultados da poça P3, os dados de atividade da SOD mostraram
585 que fêmeas e machos tiveram uma alta atividade da enzima nos meses iniciais (junho e
586 julho) e uma diminuição dessa atividade nos últimos meses estudados (setembro e
587 outubro) (Fig. 7). Os resultados da SOD mostraram diferença estatística entre os sexos
588 ao longo dos meses na poça P3 ($F_3 = 4,273$; $p < 0,02$). Já os resultados da CAT
589 mantiveram-se constantes para ambos os sexos na P3 (Fig. 7). Não houve diferença

590 estatística para CAT na P3 ($F_3 = 1,128$; $p = 0,36$). Da mesma forma, a atividade da GPx
591 em fêmeas da poça P3 manteve-se constante ao longo do ciclo, contudo em machos
592 têm-se um pico de atividade da GPx no mês de julho e declínio nos meses seguintes
593 (Fig. 7). Houve diferença estatística entre os sexos ao longo dos meses na poça P3 para
594 GPx ($F_3 = 6,475$; $p < 0,01$). Além disso, a GST apresentou o mesmo padrão de atividade
595 que a SOD para ambos os sexos, com um pico de atividade nos dois primeiros meses e
596 um declínio nos meses finais (Fig. 7). Não houve diferença estatística na poça P3 para
597 GST ($F_3 = 2,081$; $p = 0,13$).

598 Comparando as unidades amostrais observa-se que as poças P2 e P3 apresentam
599 semelhanças na atividade das enzimas tanto em machos como em fêmeas (Fig. 6 e 7). Já
600 a poça P1 mostra um comportamento distinto em alguns destes biomarcadores,
601 principalmente, da SOD e GST que apresentam um pico de atividade no último mês
602 (setembro), em ambos os sexos (Fig. 5). Nas poças P2 e P3 estas enzimas (SOD e GST)
603 apresentaram um pico de atividade nos meses iniciais em machos e fêmeas (Fig. 6 e 7).

604 Observamos que os gráficos referentes a todas as unidades amostrais (P1, P2 e P3)
605 agrupadas interferiu na real interpretação dos resultados de cada poça temporária, tanto
606 para fêmeas como para machos (Fig. 8). Além disso, os testes não mostraram diferença
607 estatística entre os sexos ao longo dos meses para cada biomarcador, com todas as poças
608 agrupadas (Fig.8); contudo, isso foi observado quando analisamos as unidades
609 amostrais separadamente (Fig. 5, 6 e 7).

610

611 3.4 *Balanço oxidativo e variáveis ambientais*

612 As diferentes variáveis ambientais registradas durante o estudo variaram durante
613 os meses e unidades amostrais (Tabela 1). Destes dados referentes aos parâmetros
614 abióticos da água, principalmente, a temperatura e o oxigênio alteraram-se bastante,
615 destacando que quando a temperatura da água estava alta os níveis de oxigênio eram
616 menores (Tabela 1). Os valores registrados da temperatura foram aumentando conforme
617 passavam os meses, ficando entre 8 e 23°C, e o oxigênio entre 2 e 14 mg/L (Tabela 1).
618 Entretanto, observamos que estes parâmetros estavam relacionados conforme o tamanho
619 (área e profundidade) de cada área úmida temporária (Tabela 2). As medidas referentes
620 a cada unidade amostral mostraram que as áreas aumentavam até o mês de setembro e
621 em outubro começavam a diminuir, tanto a área superficial como a profundidade. A

622 maior unidade amostral registrada foi a P3 em relação à área superficial e a maior
623 profundidade a unidade P2 (Tabela 2).

624 O dado relacionado às PT mostrou que foi somente influenciada pela temperatura,
625 que explicou aproximadamente 11,5% da variação ($R^2 = 0.1159142$, $F = 15.864$, $p =$
626 $0,001$) (Tabela 3). Já os resultados para TBARS mostraram que este foi influenciado
627 pelas variáveis físico-químicas (15%), habitat (12%) e bióticas (4%). Dentre as físico-
628 químicas a temperatura explicou 3% ($R^2 = 0.03413963$, $F = 7.096042$, $p = 0.009$), pH
629 14% ($R^2 = 0.14353308$, $F = 20.278078$, $p = 0.001$), NTU 2% ($R^2 = 0.02605025$, $F =$
630 4.504172 , $p = 0.044$) e condutividade 4% ($R^2 = 0.04845357$, $F = 8.138135$, $p = 0.008$)
631 da variação nos níveis de TBARS. Na categoria habitat foram as variáveis, área que
632 explicou 9% ($R^2 = 0.09950035$, $F = 15.773540$, $p = 0.001$) e profundidade 6% ($R^2 =$
633 0.06272652 , $F = 12.386964$, $p = 0.002$). E, nas bióticas apenas a abundância de *A.*
634 *minuano* que explicou 3% ($R^2 = 0.03232224$, $F = 5.816746$, $p = 0.020$) da variação
635 (Tabela 3) foi significativa.

636 Os resultados da SOD mostraram que a enzima foi explicada por variáveis
637 bióticas (7%) e físico-químicas (6%). Dentre as variáveis bióticas, a abundância de *A.*
638 *minuano* explicou 3% ($R^2 = 0.03523132$, $F = 4.944652$, $p = 0.022$) e a abundância de *C.*
639 *fulgens* 4% ($R^2 = 0.04557978$, $F = 6.700949$, $p = 0.007$) da variação na SOD. Na
640 categoria físico-química somente a temperatura explicou 10% ($R^2 = 0.10975228$, $F =$
641 14.917225 , $p = 0.001$) (Tabela 3).

642 Já para a CAT, os resultados mostraram que foi influenciada pelas variáveis
643 bióticas (32%) e habitat (2%). Dentre as variáveis bióticas a abundância de *A. minuano*
644 explicou 36% ($R^2 = 0.36385923$, $F = 69.209472$, $p = 0.001$), riqueza de não anuais 4%
645 ($R^2 = 0.04579076$, $F = 9.307852$, $p = 0.002$), abundância de *C. fulgens* 5% ($R^2 =$
646 0.05987385 , $F = 13.431308$, $p = 0.001$) e abundância de predador 5% ($R^2 =$
647 0.05359829 , $F = 13.262510$, $p = 0.001$). Dentre as variáveis de habitat somente a área
648 que explicou 2% ($R^2 = 0.02093794$, $F = 5.372941$, $p = 0.018$) (Tabela 3) foi
649 significativa.

650 A variação da GST foi explicada pelas variáveis físico-químicas (16%), bióticas
651 (9%) e habitat (5%). Entre as físico-químicas foi apenas a temperatura que explicou
652 26% ($R^2 = 0.26917321$, $F = 44.565907$, $p = 0.001$). Na categoria biótica somente a
653 abundância de *A. minuano* que explicou 4% ($R^2 = 0.04294921$, $F = 7.492474$, $p =$
654 0.008). Já em habitat foram a área 3% ($R^2 = 0.03203049$, $F = 5.811764$, $p = 0.017$) e a

655 profundidade 2% ($R^2 = 0.02529656$, $F = 4.733948$, $p = 0.029$) as variáveis que
656 influenciaram a GST (Tabela 3).

657 As variáveis ambientais não apresentaram influência sobre as proteínas
658 carboniladas (PC) e para a glutatona peroxidase (GPx).

659 **4. Discussão**

660 Este estudo constituiu a primeira contribuição sobre a variação temporal do
661 estresse oxidativo em peixes anuais neotropicais, obtida em ambiente natural e
662 abrangendo o ciclo de vida pós-eclosão de uma espécie.

663 Sabe-se que o período reprodutivo de *Cynopoecilus fulgens* representa um longo
664 período temporal (de 3 até 4 meses) em relação ao ciclo de vida total pós-eclosão (de 5
665 até 8 meses), consistindo este em maturidade sexual, desova e comportamentos
666 reprodutivos (interações de corte e agonísticas) (BEROIS et al., 2012; GONÇALVES;
667 SOUZA; VOLCAN, 2011; LANÉS; KEPPELER; MALTCHIK, 2014). Sendo assim
668 exige, possivelmente, uma alta demanda energética para que estes animais obtenham
669 sucesso reprodutivo; como também, requer uma alta capacidade do sistema antioxidante
670 a fim de combater as EROs formadas em excesso nesta situação, auxiliando no controle
671 da homeostase do organismo. Como já evidenciado para outros animais por diferentes
672 autores (BRAGHIROLI; OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2016; OLIVEIRA et al., 2007;
673 PINHEIRO; OLIVEIRA, 2016). Nossos resultados mostram que machos e fêmeas desta
674 espécie se utilizam de estratégias diferentes de seu balanço redox durante o ciclo de
675 vida, sendo este balanço influenciado, tanto pelo período reprodutivo, como também,
676 por variáveis ambientais (bióticas e abióticas). Além disso, observou-se que as
677 populações da espécie *C. fulgens* presentes em cada unidade amostral (P1, P2 e P3)
678 apresentaram respostas fisiológicas distintas frente à adaptação ao seu ciclo de vida,
679 portanto foram analisadas separadamente (por unidade amostral) o que evidência a
680 influência do componente ambiental como modulador do ciclo de vida destes animais
681 (Fig. 5, 6 e 7).

682 Tendo em vista a característica dos ambientes que estes animais habitam, não foi
683 possível obter um registro do mês de outubro da P1 devido à secagem mais precoce
684 desta área úmida temporária em relação às demais (P2 e P3) determinando assim, a
685 ausência de peixes pós-eclosão na mesma. Também, cabe ressaltar a diminuição do
686 número de indivíduos encontrados nas poças (P1, P2 e P3) ao longo dos meses,

687 principalmente, de machos em relação às fêmeas. Segundo LANÉS et al. (2014, 2016),
688 os machos apresentam uma taxa de mortalidade mais elevada do que as fêmeas em
689 ambiente natural. Como o ciclo de vida pós-eclosão está terminando em outubro,
690 acreditamos que os animais tenham seu pico de maturação sexual em junho, com as
691 interações reprodutivas ocorrendo entre julho e agosto, seguindo-se um aumento da
692 postura em setembro que diminui em outubro, onde verificamos a morte dos animais.
693 Tal perfil do ciclo de vida pós-eclosão é reforçado pelos dados encontrados por
694 (LANÉS et al. 2014, 2016).

695 Os níveis de proteínas totais foram registrados em valores máximos no período
696 pós-maturação sexual (julho) na poça P1, seguidos de uma redução em setembro. Este
697 padrão de resposta observado tanto para fêmeas como para machos pode refletir uma
698 condição ambiental adversa sobre esta população. Normalmente, fêmeas de peixes
699 alocam uma quantidade significativa de nutrientes para o desenvolvimento de ovos do
700 tipo megalócitos, caracterizados por uma grande quantidade de vitelo. A vitelogênese
701 consiste no sequestro de um precursor plasmático, a vitelogenina, derivada do fígado,
702 que se acumula no citoplasma do ovócito sob a forma de grânulos de vitelo.
703 Possivelmente a síntese de vitelo aliada a adversidades ambientais parece ser
704 determinante para impedir o aumento de massa corporal verificado nas fêmeas em julho
705 e setembro, na poça P1. Já os machos apresentam um incremento da massa corporal
706 somente ao final do ciclo de vida (setembro). Cabe lembrar que na P1 não encontramos
707 animais adultos vivos no mês de outubro, pois a poça havia secado.

708 Na poça P2 observamos um pico de proteínas totais em julho, período de início da
709 reprodução, seguido de uma redução em setembro e posterior aumento ao final do ciclo
710 de vida (outubro) (Fig. 4B). A manutenção de níveis elevados de PT nas poças P2 e P3
711 (Fig. 4B e C) podem estar associadas à manutenção da massa corporal nos meses
712 seguintes à maturação, ou seja, o aumento das PT pode estar auxiliando e permitindo
713 que estes animais invistam no crescimento somático. Tal hipótese é reforçada pelo
714 resultado apresentado pelas fêmeas que não investiram em crescimento somático nos
715 meses iniciais (junho e julho) em ambas as poças; sugerindo que estariam utilizando
716 suas reservas para eventos reprodutivos, principalmente, aqueles ligados a maturação
717 sexual e a produção dos ovos (Fig.4E, F, H e I).

718 Segundo VRTÍLEK & REICHARD (2015), pela pressão ambiental, determinada
719 pela iminência da seca, as fêmeas de peixes anuais devem investir na reprodução
720 mesmo que sejam baixas as condições de alimento no ambiente. Além disso, estudo

721 realizado com a espécie *Nothobranchius furzeri* mostrou que as fêmeas têm a
722 capacidade de modular a alocação de energia para o crescimento e reprodução em
723 resposta as condições de alimento (VRTÍLEK & REICHARD, 2015).

724 Por outro lado, os machos mantêm um crescimento somático lento e gradual,
725 principalmente naqueles coletados na poça P3, sendo este intensificado ao final do ciclo
726 de vida (P2 e P3). Deste modo, com o aumento da PT, sugere-se que os machos
727 invistam mais em crescimento somático do que as fêmeas, sendo este padrão indicado
728 pelo tamanho superior dos machos ao longo do ciclo, tanto em termos de massa
729 corporal como de comprimento padrão. Segundo VRTÍLEK & REICHARD (2015) a
730 alocação de energia para o crescimento do animal pode ser interpretada como um
731 investimento futuro em reprodução. Dessa forma, pode-se relacionar este investimento
732 no crescimento com a procura por parceira reprodutiva, visto que as fêmeas são
733 consideradas bastante seletivas, preferindo machos com maior tamanho corporal
734 (PASSOS et al., 2013, 2014). Esta preferência pode ser explicada por diversas causas,
735 sendo uma delas o tamanho do corpo que está relacionado com status de dominância do
736 macho e seleção sexual; com isso, as fêmeas poderiam apresentar potenciais benefícios
737 de locais de desova e viabilidade dos ovos (PASSOS et al., 2013).

738 Nas fêmeas da P1, observamos ao longo do ciclo de vida pós-eclosão uma
739 manutenção dos níveis de lipoperoxidação aliados a uma diminuição das proteínas
740 carboniladas a partir de julho (início das interações reprodutivas) até o final do ciclo de
741 vida (setembro). O incremento da atividade da SOD e da GST ao final do ciclo aliado a
742 manutenção da atividade da CAT e da GPx parecem ser determinantes para a
743 diminuição do dano oxidativo descrito anteriormente. Estes resultados sugerem que as
744 fêmeas conseguem manter um sistema antioxidante eficiente ao longo de seu ciclo de
745 vida pós-eclosão, apesar do investimento de parte de seus recursos energéticos para a
746 reprodução. Já os machos apresentaram um incremento dos níveis de lipoperoxidação
747 no final do ciclo de vida, apesar do aumento da atividade das enzimas antioxidantes
748 (SOD, GPx e GST). Estes resultados corroboram com os resultados observados por
749 LANÉS et al. (2014, 2016) que mostram que os machos apresentam uma mortalidade
750 mais elevada do que as fêmeas nesta fase do desenvolvimento.

751 Níveis mais elevados de lipoperoxidação foram observados na fase de
752 predominância da maturação sexual (junho) tanto para as fêmeas da P2 como para os
753 machos da P2 e da P3 (Fig. 6 e 7), apresentando uma diminuição até o final do ciclo de
754 vida dos organismos. Já as fêmeas da poça P3 apresentam uma variação em forma de U

755 na lipoperoxidação, onde observamos níveis mais elevados em junho (maturação) e
756 outubro (senescência). Para todas as poças estudadas (P1, P2 e P3) percebe-se que as
757 fêmeas apresentaram níveis mais altos de lipoperoxidação do que os machos, indicando
758 um pico de TBARS no período de predominância da maturação sexual e surgimento dos
759 comportamentos reprodutivos que coincide com o período de maior demanda
760 energética, onde as fêmeas necessitam sintetizar e/ou alocar vitelogenina, vitaminas,
761 moléculas antioxidantes, entre outras moléculas para o ovo.

762 As proteínas carboniladas podem ser formadas através da ação de pró-oxidantes,
763 entre eles as EROs, que oxidam proteínas alterando suas estruturas e funções, podendo
764 resultar em uma situação de estresse oxidativo. Em nosso estudo, os níveis elevados de
765 proteínas carboniladas coincidem com os baixos níveis de TBARS em todas as poças
766 (Fig. 5, 6 e 7), sugerindo que existe uma relação inversa entre a peroxidação lipídica e a
767 oxidação de proteínas (proteínas carboniladas). Segundo ALMROTH et al. (2005) o
768 aumento da peroxidação lipídica poderia estar atuando para prevenir a formação de
769 proteínas carboniladas.

770 Segundo HSU et al. (2008), a biologia do envelhecimento é caracterizada pela
771 deterioração funcional dos organismos vivos ao longo do tempo. Esta deterioração é
772 induzida entre outros fatores, pelo aumento da geração de EROs associada com o
773 avanço da idade, que podem danificar partes componentes da célula e macromoléculas,
774 afetar a atividade de enzimas antioxidantes, provocando assim, acúmulo de dano
775 oxidativo (DONG et al., 2017; HSU et al., 2008). Em nosso estudo foi observado que o
776 animal mostra um aumento dos níveis de oxidação de proteínas, verificado pelo
777 incremento das proteínas carboniladas tanto em fêmeas como em machos na poça P2, e
778 de peroxidação lipídica nas fêmeas da poça P3 no final do ciclo de vida. Tal padrão de
779 resposta coincidindo com o declínio da atividade das enzimas antioxidantes ao longo do
780 ciclo, onde observamos uma redução da atividade da SOD e GST em ambos os sexos e
781 poças, aliado a uma diminuição da CAT nos machos da P2 e da GPx nos machos da P3
782 (Fig. 6 e 7). Estes resultados evidenciam uma estreita relação entre a lipoperoxidação, a
783 oxidação de proteínas e a atividade de enzimas antioxidantes, podendo caracterizar um
784 possível processo de deterioração funcional destes organismos na fase de senescência
785 determinando possivelmente a morte desses animais. Novamente, os resultados
786 reforçam a hipótese apresentada por LANÉS et al. (2014, 2016) que as fêmeas tornam-
787 se prevalentes no ambiente na fase final do ciclo de vida pós-eclosão.

788 Neste contexto, relacionado ao processo de envelhecimento, um padrão
789 semelhante, mas obtido sob condições controladas de laboratório, foi registrado em
790 peixes anuais africanos, *Nothobranchius rachovii* e *Nothobranchius guentheri*, que
791 apresentaram um aumento de peroxidação lipídica e oxidação de proteínas, aliado a uma
792 diminuição das enzimas antioxidantes com o avanço da idade. Além disto, estes estudos
793 sugerem que estas espécies podem ser consideradas como modelos em potencial para
794 estudos de envelhecimento (HSU et al., 2008; LIU et al., 2012).

795 Segundo GARCÍA et al. (2008), os peixes anuais necessitam de altas taxas
796 metabólicas para manter a sobrevivência da população às condições extremas de
797 ambientes efêmeros. Inclui-se neste contexto, o esforço gasto por esses peixes no
798 período reprodutivo ao longo de uma única estação (PASSOS et al., 2014), o qual exige
799 um grande investimento energético em ambos os sexos para alocar reservas endógenas
800 que serão utilizadas na sustentação da reprodução (maturação sexual, desova e
801 comportamentos reprodutivos). Sendo assim, com a mobilização das reservas
802 energéticas endógenas e o aumento da síntese de ATP para sustentar os eventos
803 reprodutivos, podemos ter o incremento da produção de EROs o que exige do
804 organismo um aumento tanto da atividade como possivelmente da expressão gênica das
805 enzimas antioxidantes a fim de auxiliarem na manutenção do balanço redox. Como
806 sugerido por PINHEIRO; OLIVEIRA (2016) para o lagostim de água doce *Parastacus*
807 *brasiliensis promatensis*, coletados em ambiente natural.

808 Os animais da poça P1 apresentaram um perfil de resposta das enzimas
809 antioxidantes que difere dos peixes coletados nas poças P2 e P3; onde verificamos, ao
810 final do ciclo de vida desta população (setembro), um incremento da atividade da SOD
811 e da GST tanto para fêmeas como para os machos, e da CAT somente em machos. Além
812 disto, a faixa de variação dos níveis de lipoperoxidação, proteínas carboniladas e de
813 todas as enzimas antioxidantes estudadas (SOD, CAT, GPx e GST) foi mais ampla
814 atingindo valores mais elevados que aqueles verificados nos animais das poças P2 e P3.
815 Tais peculiaridades reforçam a hipótese de algum estresse agregado à poça P1, o que
816 talvez possa estar associado à secagem precoce do ambiente.

817 Já para os animais da P2 e P3, a atividade da SOD mostra-se mais elevada na fase
818 de maturação sexual (junho), diminuindo a partir de julho até o final do ciclo de vida,
819 nas poças P2 e P3 (Fig. 6 e 7). Este perfil de atividade da SOD foi observado tanto em
820 machos como em fêmeas, o que pode indicar um preparo ou antecipação do sistema
821 antioxidante face ao aumento de EROs produzidas possivelmente nos eventos

822 reprodutivos subsequentes, no qual o animal está metabolicamente mais ativo e
823 desviando a carga significativa da energia para atingir a maturidade sexual e realizar
824 comportamentos reprodutivos, mantendo ou evitando que altos níveis de TBARS e PC
825 sejam gerados. Corroborando com a Teoria de Preparo para o Estresse Oxidativo
826 proposta por HERMES-LIMA et al. (2015) para animais que enfrentam situações
827 extremas.

828 A atividade da CAT em fêmeas se manteve constante em todas as poças. Já nos
829 machos a atividade desta enzima apresentou uma diminuição ao longo do ciclo de vida
830 nos peixes da poça P2, entretanto, nas outras poças também se manteve constante. A
831 CAT é uma enzima antioxidante altamente eficiente e abundante em quase todos os
832 tecidos vivos que utilizam o oxigênio, ela pode decompor milhões de moléculas de
833 peróxido de hidrogênio em um segundo completando assim o processo iniciado pela
834 SOD (IGHODARO; AKINLOYE, 2017). A manutenção da atividade da catalase, ao
835 longo do ciclo de vida pós-eclosão, nestes animais, parece representar uma alta
836 eficiência do sistema antioxidante.

837 A enzima GPx apresenta uma atividade complementar a CAT, visto que ambas
838 atuam de forma conjunta para catalisar a redução do H₂O₂, derivado principalmente do
839 metabolismo oxidativo; se distribuindo em ambientes celulares diferentes, uma nas
840 mitocôndrias (GPx) e a outra nos peroxissomas (CAT). Além disto, a GPx é
841 considerada, por alguns autores, mais eficaz do que a CAT por catalisar, além da
842 redução do H₂O₂, a de outros peróxidos como os lipídicos (TRENZADO et al., 2006).
843 Em nosso estudo, sugere-se que a GPx esteja atuando juntamente com a CAT, na
844 manutenção do TBARS e PC em ambos os sexos (Fig. 5, 6 e 7).

845 As GSTs estão presentes em quase todos os organismos e são um importante
846 mecanismo de biotransformação intracelular de endo e xenobióticos
847 (PAPADOPOULOS et al., 2004); além disto, dentre suas funções não associadas
848 diretamente com a biotransformação estão o reparo de macromoléculas oxidadas por
849 espécies reativas de oxigênio, a regeneração de proteínas S-tioladas e a biossíntese de
850 metabólitos fisiologicamente importantes (ARMSTRONG, 1997; SHEEHAN et al.,
851 2001).

852 Nosso estudo mostrou altos níveis de atividade da GST no início do ciclo de vida
853 pós-eclosão (período de maturação sexual) em peixes de ambos os sexos coletados nas
854 poças P2 e P3 (Fig. 6 e 7). Os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a GST
855 pode ter uma função importante durante o período de maturação sexual e pré-postura,

856 atuando não só no processo de biotransformação, possivelmente de hormônios sexuais
857 secretados intensamente nesta fase de vida, como também atuando como um agente
858 antioxidante. FREITAS et al. (2008) e PINHEIRO; OLIVEIRA (2016) também
859 sugerem um papel semelhante ao aqui proposto para a GST nesta fase do ciclo de vida
860 dos animais; contudo, os autores trabalharam com carrapatos e lagostins,
861 respectivamente.

862 Já na poça P1 estes níveis aumentaram no mês de setembro tanto em machos
863 como em fêmeas. Esta atividade da GST em machos e fêmeas pode indicar uma
864 tentativa de reparo de dano a macromoléculas geradas pelo incremento da formação de
865 EROs ao longo do ciclo de vida, auxiliando a manter os níveis de LPO, em fêmeas, e de
866 proteínas carboniladas, em ambos os sexos (Fig 5). Apesar deste aumento da GST
867 observamos em machos um incremento da lipoperoxidação; além disto, os machos
868 apresentaram maiores valores de atividade da GST do que as fêmeas, o que pode ser
869 justificado pelo comportamento territorial e agressivo durante a reprodução, além de um
870 aumento nos níveis de testosterona circulantes, visto que as fêmeas dessa espécie
871 incitam a competição entre os machos para aumentar a chance de reproduzir com o
872 dominante (PASSOS et al., 2013). Além de dano oxidativo gerado pelas características
873 do ciclo de vida destes animais (maturação precoce, atividade reprodutiva longa e
874 intensa, produção de um número elevado de ovos de resistência) não podemos descartar
875 a presença de dano oxidativo mais intenso gerado pela interação dos animais com o seu
876 habitat visto que os peixes desta poça (P1) morrem antes dos animais presentes nas
877 poças P2 e P3. Lembrando que todos os marcadores de dano oxidativo (TBARS e PC),
878 além das enzimas antioxidantes estudadas (SOD, CAT, GST e GPx) mantém uma faixa
879 de atividade mais ampla e elevada que aquelas verificadas nas outras poças. Juntamente
880 com estes processos, ocorre o envelhecimento concomitante das fêmeas e dos machos
881 que culminará com sua morte após a postura dos ovos, no período de seca ambiental.

882 Em nosso estudo, podemos verificar variações amplas de temperatura, oxigênio
883 dissolvido e pH na água das poças, além de um período de duração efêmero das
884 mesmas. Em peixes anuais os estágios de desenvolvimento são influenciados pelas
885 condições abióticas do meio, pois estes animais vivem em ambientes extremamente
886 variáveis, com flutuações de temperatura e disponibilidade de oxigênio (FONSECA et
887 al., 2013). Além disso, dependendo do estágio de vida, estes organismos apresentam
888 preferências térmicas como é visto para peixes da espécie *Austrolebias nigrofasciatus*
889 que apresentam maior taxa de crescimento inicial em temperaturas mais altas (22°C) e

890 para manter esse crescimento somático torna-se necessário a utilização de temperaturas
891 mais baixas (VOLCAN et al., 2012). Igualmente, estudo realizado com a espécie de
892 peixe anual africano *Nothobranchius furzeri* mostrou que a redução da temperatura
893 retarda o início de déficit locomotor e de aprendizagem relacionados à idade, ou seja,
894 aumenta o tempo de vida (VALENZANO et al., 2006).

895 Os resultados relacionados às variáveis ambientais e as de balanço oxidativo
896 mostraram que os fatores físico-químicos e bióticos estudados apresentaram influência
897 sobre os biomarcadores. Dos fatores físico-químicos destacou-se a temperatura, e dentre
898 os bióticos a abundância de predador, a abundância de *C. fulgens* (processos denso-
899 dependentes) e a abundância de *A. minuano*, uma espécie simpátrica de peixe anual.
900 Cabe ressaltar que para obtenção destes resultados foram utilizados os valores médios
901 obtidos para cada um dos marcadores de estresse oxidativo nas três poças agrupadas
902 (Fig. 8). A temperatura apresentou influência sobre os níveis de PT, TBARS e GST.
903 Segundo LUSHCHAK (2011) o aumento da temperatura estimula processos
904 metabólicos como a intensificação da produção de EROs por meio do aumento do
905 consumo de oxigênio, o que pode explicar o aumento dos níveis de TBARS. O
906 incremento da temperatura determina um aumento da atividade exploratória dos
907 animais, sendo isto associado ao ganho de massa corporal, verificado do meio para o
908 final do ciclo de vida, o que coincide com o maior espectro alimentar dos animais
909 (LANÉS et al. 2014, 2016) e o incremento da atividade da GST. Lembrando que esta
910 enzima tem sua atividade influenciada tanto por metabolitos endógenos como exógenos,
911 como também atuando como antioxidante em moléculas geradas a partir do alimento
912 digerido. FREITAS et al. (2008) sugerem um dano oxidativo endógeno gerado pelos
913 produtos do metabolismo do alimento ingerido por carrapatos estando isto associado a
914 um aumento da atividade da GST. Observamos também que a profundidade das poças é
915 um fator importante de influência tanto nos níveis de TBARS como nos de atividade da
916 GST, isto parece explicar o perfil de resposta observado principalmente nos animais
917 coletados na poça P1, aquela que se apresentou seca em outubro e onde foram coletados
918 os animais de menor ciclo de vida (duração).

919 Segundo VAZ-FERREIRA et al. (1973) conexões de áreas úmidas temporárias
920 com corpos d'água permanentes podem contribuir para a colonização de espécies de
921 peixes não anuais a essas áreas temporárias. Além disso, as interações competitivas e de
922 predação por peixes não anuais, macroinvertebrados e aves podem desempenhar um
923 papel relevante na diminuição da abundância e na eliminação de peixes anuais adultos

924 em lagoas sazonais (LANÉS; KEPPELER; MALTCHIK, 2014). Em nosso estudo a
925 abundância de predador e a abundância de *A. minuano* apresentaram influência sobre a
926 atividade da CAT, e a abundância de *C. fulgens* sobre a enzima SOD, o que pode
927 explicar parcialmente a atividade da CAT e da SOD. Segundo LANÉS (2011) a
928 diminuição progressiva da abundância de espécies de peixes anuais ao longo do ciclo de
929 vida pode ser devido aos mecanismos de competição e predação. No início do período
930 chuvoso tem-se uma maior abundância desses organismos anuais e a diminuição ao
931 longo do ciclo está associada ao aumento da abundância de peixes não anuais (LANÉS,
932 2011).

933 **5. Conclusão**

934 Os resultados obtidos mostram que *Cynopoecilus fulgens*, uma espécie de peixe
935 anual que vive em ambientes efêmeros apresentando condições abióticas e bióticas
936 extremamente variáveis, aliadas a um ciclo de vida pós-eclosão caracterizado por
937 crescimento rápido, maturação sexual precoce e reprodução intensa e acelerada que
938 exige uma alta demanda energética, parece utilizar estratégias capazes de suportar tais
939 desafios. Tal perfil de resposta encontrado sugere que o sistema antioxidante destes
940 animais apresenta alta eficiência, mantendo os níveis de lipoperoxidação e proteínas
941 carboniladas baixos, ou seja, indicando a capacidade dos animais de manterem a
942 homeostase.

943 Os animais das poças P2 e P3 se comportam de maneira semelhante entre si; já os
944 da poça P1 tem seu ciclo de vida pós-eclosão encurtado, possivelmente, por estressores
945 ambientais aliados as peculiaridades deste ciclo. Evidenciando que o padrão e o tempo
946 do ciclo de vida pós-eclosão podem ser moldados de forma significativa, por aspectos
947 ambientais, como a temperatura e a presença de predadores. Tais resultados apontam
948 para a necessidade de desenvolvimento de estratégias de conservação ambiental que
949 mantenham as características deste habitat a fim de conservarem estas espécies.

950 **Agradecimentos**

951 Agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
952 Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa a BDC e a bolsa de produtividade a GTO
953 (n°307071/2015-4) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
954 (CAPES) pela bolsa no Programa Nacional de Pós-Doutorado (PNPD) a LEKL. À

955 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por todo o suporte
956 técnico e ao Laboratório de Ecologia e Conservação de Ecossistemas Aquáticos, da
957 Universidade do Vale do Rio dos Sinos (UNISINOS) pela parceria científica. Também,
958 agradecemos à chefia do Parque Nacional da Lagoa do Peixe, comunidade da região e
959 em especial aos proprietários das áreas, em especial ao Sr. Sudeni pela recepção e
960 hospitalidade durante as atividades de campo.

961 **Referências**

962 ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as
963 protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171–
964 180, 2005.

965 APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress,
966 and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399,
967 2004.

968 ARENZON, A; LEMOS, C. A; BOHRER, M. B. C. The influence of temperature on
969 the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia*
970 (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4B, p. 743–
971 747, 2002.

972 ARENZON, A. et al. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus*
973 *melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances.
974 **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 22, n. 9, p. 2188–90, 2003.

975 ARENZON, A.; PERET, A. C.; BOHRER, M. B. C. Growth of the annual fish
976 *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan, 1912) based in a Temporary Water Body
977 Population in Estado Rio Grande Do Sul, Brazil (Cyprinodontiformes, Rivulidae).
978 **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p. 117–123, 2001.

979 AREZO, M. J. et al. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua*
980 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Tissue and Cell**, v. 39, n. 2, p. 89–98, 2007.

981 ARIM, M. et al. Food web structure and body size: Trophic position and resource
982 acquisition. **Oikos**, v. 119, n. 1, p. 147–153, 2010.

983 ARMSTRONG, R. N. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the
984 Glutathione Transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2–18,
985 1997.

986 BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores
987 modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.

- 988 BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. Estresse Oxidativo: Relação entre
989 Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p.
990 113–123, 2006.
- 991 BEROIS, N. et al. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment.
992 **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 595–602,
993 2012.
- 994 BEROIS, N.; AREZO, M. J.; DE SÁ, R. O. The Neotropical Genus *Austrolebias*: An
995 Emerging Model of Annual Killifishes. **Cell & Developmental Biology**, v. 03, n. 02, p.
996 1–9, 2014.
- 997 BLAŽEK, R. et al. Repeated intraspecific divergence in life span and aging of African
998 annual fishes along an aridity gradient. **Evolution**, v. 71, n. 2, p. 386–402, 2017.
- 999 BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen
1000 peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W. (Ed.). **Superoxide dismutase**.
1001 Flórida: Boca Raton: CRC Press, 1982. v. 2p. 15–30.
- 1002 BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.
1003 General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical journal**, v. 134,
1004 n. 3, p. 707–716, 1973.
- 1005 BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The Role of Glutathione and Glutathione S-
1006 transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis. **Advances in enzymology and related**
1007 **areas of molecular biology**, v. 32, p. 173–219, 1969.
- 1008 BRAGHIROLI, F. M.; OLIVEIRA, M. R.; OLIVEIRA, G. T. Seasonal variability of
1009 metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang*
1010 (Crustacea, Amphipoda). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 177–
1011 184, 2016.
- 1012 BRASIL. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção -**
1013 **Peixes e Invertebrados Aquáticos. Portaria N° 445. Diário oficial da**
1014 **União. Ministério do Meio Ambiente, , 2014.**
- 1015 BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods Enzym**, p. 302–
1016 310, 1978.
- 1017 CALHOUN, A. J. K. et al. Temporary wetlands: challenges and solutions to conserving
1018 a “disappearing” ecosystem. **Biological Conservation**, v. 211, p. 3–11, 2017.
- 1019 CNUBBEN, N. H. P. et al. The interplay of glutathione related processes in antioxidant
1020 defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141–152, 2001.
- 1021 COLLEN, B. et al. Global patterns of freshwater species diversity, threat and
1022 endemism. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 1, p. 40–51, 2014.
- 1023 COOKE, S. J. et al. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly
1024 integrated and essential science. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2013.

- 1025 COSTA, W. J. E. M. Origin and Evolution of Annualism and Miniaturization in.
1026 **Journal of Comparative Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–62, 1998.
- 1027 COSTANTINI, D. **Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and**
1028 **Physiology**. Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2014.
- 1029 CREED, I. F. et al. Enhancing protection for vulnerable waters. **Nature Geoscience**, v.
1030 10, n. 11, p. 809–815, 2017.
- 1031 DANTZER, B. et al. Measures of physiological stress: A transparent or opaque window
1032 into the status, management and conservation of species? **Conservation Physiology**, v.
1033 2, n. 1, p. 1–18, 2014.
- 1034 DARWALL, W.; FREYHOF, J. Lost fishes, who is counting? The extent of the threat
1035 to freshwater fish biodiversity. In: CLOSS, G.; KRKOSEK, M.; OLDEN, J. (Eds.).
1036 **Conservation of Freshwater Fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 2015. p.
1037 1–36.
- 1038 DI CICCIO, E. et al. The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical
1039 teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias.
1040 **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 249–256, 2011.
- 1041 DONG, Y. et al. Aging asymmetry: systematic survey of changes in age-related
1042 biomarkers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Fish Physiology and**
1043 **Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 309–319, 2017.
- 1044 DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints
1045 in life-history evolution. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276,
1046 n. 1663, p. 1737–45, 2009.
- 1047 DRAY, S. et al. **Multivariate Multiscale Spatial Analysis**, 2018.
- 1048 DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and
1049 conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**,
1050 v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006.
- 1051 ERREA, A.; DANULAT, E. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius*
1052 (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions.
1053 **Environmental Biology of Fishes**, v. 61, n. 3, p. 261–268, 2001.
- 1054 FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation.
1055 **American Fisheries Society Symposium 8**, n. July, p. 123–144, 1990.
- 1056 FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças
1057 relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68,
1058 1997.
- 1059 FONSECA, A. P. DA et al. Growth of Critically Endangered annual fish *Austrolebias*
1060 *wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. **Neotropical**
1061 **Ichthyology**, v. 11, n. 4, p. 837–844, 2013.

- 1062 FREITAS, D. R. .; VAZ JUNIOR, I. D. S.; MASUDA, A. Expressão e Atividade
1063 Enzimática de Glutathione S-Transferase em Tecidos de Fêmeas de *Boophilus microplus*.
1064 **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 2, p. 99–104, 2008.
- 1065 FURNESS, A. I. et al. Convergent evolution of alternative developmental trajectories
1066 associated with diapause in African and South American killifish. **Proceedings of the**
1067 **Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1802, p. 1–9, 2015.
- 1068 GARCÍA, D. et al. Reproductive behavior in the annual fish. v. 6, n. 2, p. 243–248,
1069 2008.
- 1070 GENADE, T. et al. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for
1071 aging research. **Aging Cell**, v. 4, n. 5, p. 223–233, 2005.
- 1072 GONÇALVES, C. DA S.; SOUZA, U. P.; VOLCAN, M. V. The opportunistic feeding
1073 and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia*
1074 (cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil.
1075 **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 191–200, 2011.
- 1076 GUTTERMAN, Y. **Survival Strategies of Annual Desert Plants**. HERMES-LIMA,
1077 M. Role of Free Radicals. In: STOREY, K. B. (Ed.). . **Funcional Metabolism:**
1078 **Regulation and Adaptation**. John Wiley ed. Hoboken, 2004. p. 319–368.
- 1079 HERMES-LIMA, M. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic
1080 depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and**
1081 **Medicine**, v. 89, p. 1122–1143, 2015.
- 1082 HSU, C. Y. et al. Age-related markers assayed at different developmental stages of the
1083 annual fish *Nothobranchius rachovii*. **Journals of Gerontology - Series A Biological**
1084 **Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1267–1276, 2008.
- 1085 IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide
1086 dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental
1087 role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n.
1088 4, p. 287–293, 2017.
- 1089 KEPPELER, F. W. et al. The diet of *Cynopoecilus fulgens* Costa, (Cyprinodontiformes :
1090 Rivulidae) in Southern Brazil wetlands. **Italian Journal of Zoology**, v. 80, n. May, p.
1091 291–302, 2013.
- 1092 KEPPELER, F. W. et al. The morphology-diet relationship and its role in the
1093 coexistence of two species of annual fishes. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 24, n. 1, p.
1094 77–90, 2014.
- 1095 LANÉS, L. E. K. **Dinâmica e Conservação de Peixes Anuais (Cyprinodontiformes:**
1096 **Rivulidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe**. Dissertação (Mestrado), São
1097 Leopoldo: UNISINOS, 2011.

- 1098 LANÉS, L. E. K. et al. Seasonal dynamics in community structure, abundance, body
1099 size and sex ratio in two species of Neotropical annual fishes. **Journal of Fish Biology**,
1100 v. 89, n. 5, p. 2345–2364, 2016.
- 1101 LANÉS, L. E. K. et al. Environmental predictors for annual fish assemblages in
1102 subtropical grasslands of South America: the role of landscape and habitat
1103 characteristics. **Environmental Biology of Fishes**, v. 101, n. 6, p. 963–977, 2018.
- 1104 LANÉS, L. E. K.; KEPPELER, F. W.; MALTCHIK, L. Abundance variations and life
1105 history traits of two sympatric species of Neotropical annual fish (Cyprinodontiformes:
1106 Rivulidae) in temporary ponds of southern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 48,
1107 n. 31-32, p. 1971–1988, 2014.
- 1108 LANÉS, L. E. K.; MALTCHIK, L. Discovery of the Critically Endangered annual
1109 killifish *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in
1110 Lagoa do Peixe National Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of**
1111 **Threatened Taxa**, v. 2, p. 1282–1285, 2010.
- 1112 LAUFER, G. et al. Diet of four annual killifishes: An intra and interspecific
1113 comparison. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 1, p. 77–86, 2009.
- 1114 LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified
1115 proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.
- 1116 LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em
1117 amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p.
1118 293–303, 2001.
- 1119 LIU, C. et al. Differential expression of aging biomarkers at different life stages of the
1120 annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Biogerontology**, v. 13, n. 5, p. 501–510, 2012.
- 1121 LOUREIRO, M. et al. Review of the family Rivulidae (Cyprinodontiformes,
1122 Aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus
1123 *Austrolebias* Costa 1998. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 3, p. 1–20, 2018.
- 1124 LUCAS-SÁ, A. et al. *Nothobranchius* as a model for aging studies. A review. **aging**
1125 **and disease**, v. 5, n. 4, p. 281–291, 2014.
- 1126 LUSHCHAK, V. I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic**
1127 **animals** **Aquatic Toxicology** Elsevier B.V., 2011. Disponível em:
1128 <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>>
- 1129 MALTCHIK, L. et al. Species-area relationship and environmental predictors of fish
1130 communities in coastal freshwater wetlands of southern Brazil. **Environmental Biology**
1131 **of Fishes**, v. 88, n. 1, p. 25–35, 2010.
- 1132 MALTCHIK, L. et al. Landscape and habitat characteristics associated with fish
1133 occurrence and richness in southern Brazil palustrine wetland systems. **Environmental**
1134 **Biology of Fishes**, v. 97, n. 3, p. 297–308, 2014.

- 1135 OKSANEN, J. et al. **Community Ecology Package**, 2018.
- 1136 OLIVEIRA, G. T. et al. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla*
1137 *platensis* (Crustacea, Aeglidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A**
1138 **Molecular and Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 600–606, 2007.
- 1139 PAPADOPOULOS, A. I. et al. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera*
1140 *macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST
1141 isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology - C**
1142 **Toxicology and Pharmacology**, v. 139, n. 1-3, p. 93–97, 2004.
- 1143 PASSOS, C. et al. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual
1144 killifish *Austrolebias charrua*. **Behavioural Processes**, v. 96, p. 20–26, 2013.
- 1145 PASSOS, C. et al. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in
1146 wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.
- 1147 PERES-NETO, A. P. R. et al. Variation partitioning of species data matrices:
1148 Estimation and Comparison of Fractions. **Ecology**, v. 87, n. 10, p. 2614–2625, 2006.
- 1149 PERSCH, T. S. P. et al. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile
1150 *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®.
1151 **Chemosphere**, v. 174, p. 98–109, 2017.
- 1152 PERSCH, T. S. P. et al. Changes in intermediate metabolism and oxidative balance
1153 parameters in sexually matured three-barbeled catfishes exposed to herbicides from rice
1154 crops (Roundup®, Primoleo® and Facet®). **Environmental Toxicology and**
1155 **Pharmacology**, v. 58, p. 170–179, 2018.
- 1156 PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA, G. T. Oxidative Status Profile in Different Tissues of
1157 *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a
1158 Seasonal Cycle. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and**
1159 **Physiology**, v. 325, n. 5, p. 318–328, 2016.
- 1160 PODRABSKY, J. E.; CARPENTER, J. F.; HAND, S. C. Survival of water stress in
1161 annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers.
1162 **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative**
1163 **physiology**, v. 280, n. 1, p. R123–31, 2001.
- 1164 PODRABSKY, J. E.; HAND, S. C. The Bioenergetics of Embryonic Diapause in an
1165 Annual Killifish, *Austrofundulus limnaeus*. **The Journal of experimental biology**, v.
1166 202, p. 2567 – 2580, 1999.
- 1167 PODRABSKY, J. E.; HAND, S. C. Physiological strategies during animal diapause:
1168 lessons from brine shrimp and annual killifish. **J Exp Biol**, v. 218, n. Pt 12, p. 1897–
1169 1906, 2015.
- 1170 QUINTELA, F. M. et al. High arsenic and low lead concentrations in fish and reptiles
1171 from Taim wetlands, a Ramsar site in southern Brazil. **Science of The Total**
1172 **Environment**, v. 660, p. 1004–1014, 2019.

- 1173 REICHARD, M. Evolutionary ecology of aging: Time to reconcile field and laboratory
1174 research. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 2988–3000, 2016.
- 1175 RIO GRANDE DO SUL. **Dispõe sobre a Reavaliação da Lista das Espécies da**
1176 **Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul. DECRETO**
1177 **Nº51.797**.Porto Alegre, 2014.
- 1178 SAUNDERS, D. L.; MEEUWIG, J. J.; VINCENT, A C. J. Freshwater Protected Areas:
1179 Strategies for Conservation Áreas Protegidas de Agua Dulce: Estrategias para la
1180 Conservación. **Conservation Biology**, v. 16, n. 1, p. 30–41, 2002.
- 1181 SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases:
1182 implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme
1183 superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1–16, 2001.
- 1184 SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American**
1185 **Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, p. 31–38, 1991.
- 1186 SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current
1187 development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122–126, 2018.
- 1188 TRENZADO, C. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon
1189 *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture**,
1190 v. 254, n. 1-4, p. 758–767, 2006.
- 1191 TYLIANAKIS, J. M.; TSCHARNTKE, T.; LEWIS, O. T. Habitat modification alters
1192 the structure of tropical host-parasitoid food webs. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 202–205,
1193 2007.
- 1194 VALENZANO, D. R. et al. Temperature affects longevity and age-related locomotor
1195 and cognitive decay in the short-lived fish: *Nothobranchius furzeri*. **Aging Cell**, v. 5, n.
1196 3, p. 275–278, 2006.
- 1197 VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker
1198 concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p.
1199 217–225, 1996.
- 1200 VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio,
1201 Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais
1202 Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338,
1203 2007.
- 1204 VAZ-FERREIRA, RAUL; SIERRA, B. Los generos de Cyprinodontidae de aguas
1205 temporales sudamericana. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, n. 2, p. 36–
1206 42, 1973.
- 1207 VOLCAN, M. V. et al. Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae, *Austrolebias periodicus*
1208 (Costa, 1999): Distribution extension in state of Rio Grande do Sul, southern Brazil.
1209 **Journal of Species Lists and Distribution**, p. 234–236, 2010.

- 1210 VOLCAN, M. V. et al. Effect of temperature on growth of the threatened annual fish
1211 *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 4, p. 1–6,
1212 2012.
- 1213 VOLCAN, M. V. et al. Annual fishes (Rivulidae) from southern Brazil: a broad-scale
1214 assessment of their diversity and conservation. In: BEROIS, N.; GARCÍA, G.; SÁ, R.
1215 O. (Eds.). **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. Boca
1216 Raton: CRC Press, 2015. p. 185–204.
- 1217 VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v.
1218 361, n. 6400, p. 340–341, 2018.
- 1219 VRTÍLEK, M.; REICHARD, M. Highly plastic resource allocation to growth and
1220 reproduction in females of an African annual fish. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 24,
1221 n. 4, p. 616–628, 2015.
- 1222 WENDEL, A.; FEUERSTEIN, S. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I
1223 Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. **Biochemical**
1224 **Pharmacology**, v. 30, n. 18, p. 2513–2520, 1981.
- 1225 WOURMS, J. P. The Developmental Biology of Annual Fishes. **J. Exp. Zool.**, v. 182,
1226 p. 389–414, 1972.
- 1227 ZEBRAL, Y. D. et al. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper
1228 thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish
1229 *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260–269, 2018.
- 1230 ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; ELPHICK, C. S. A protocol for data exploration to avoid
1231 common statistical problems. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 3–14,
1232 2010.
- 1233

Apêndices

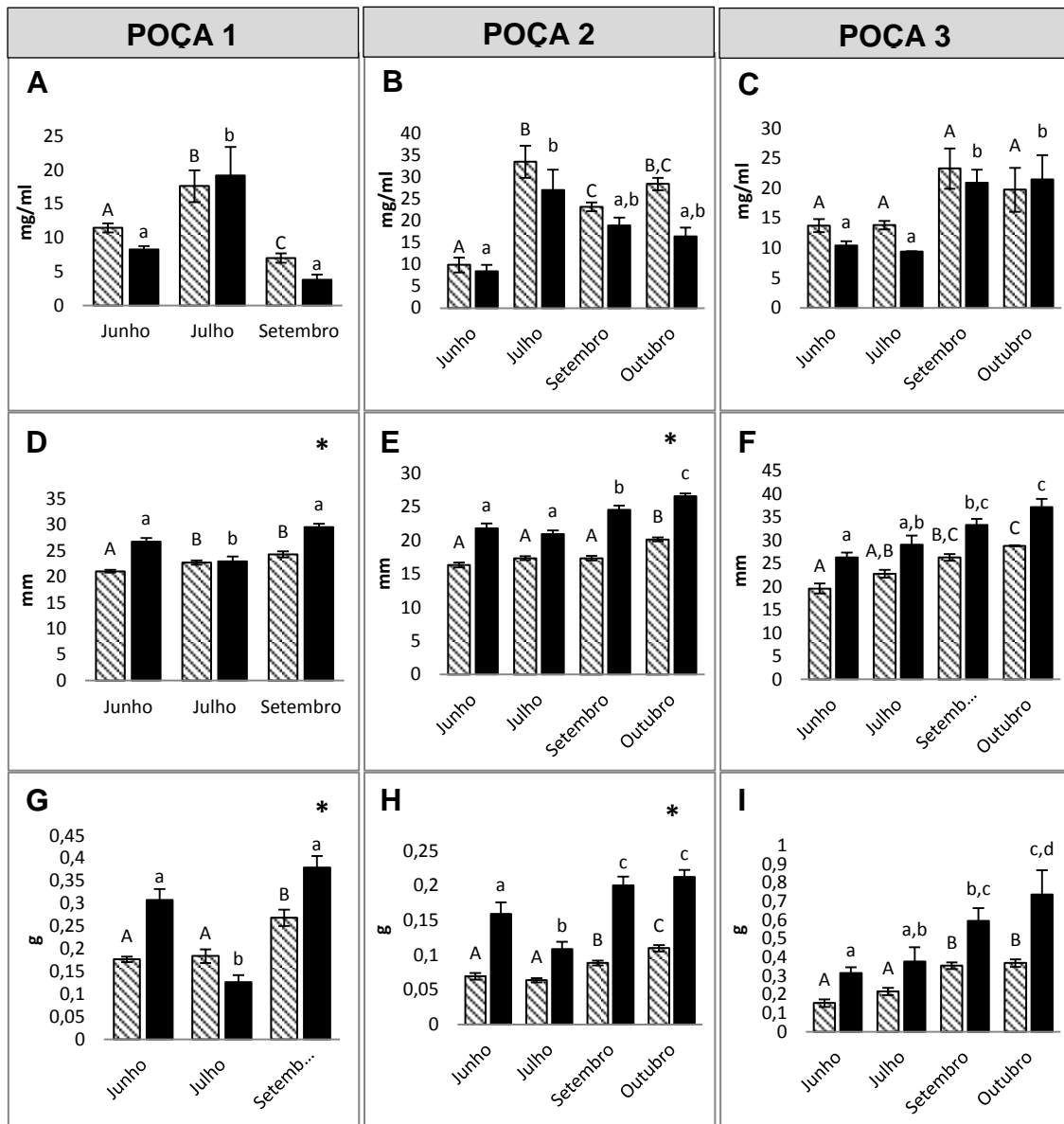


Fig. 4: Níveis de Proteínas Totais (PT) (A, B e C), Comprimento Padrão (CP) (D, E e F), Massa Corporal (G, H e I). As barras representam as médias \pm erro padrão. Para referenciar, as barras listradas indicam as fêmeas e barras pretas os machos. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas utilizadas para as fêmeas e minúsculas para os machos. O símbolo “*” no gráfico representa diferença estatística entre machos e fêmeas em cada mês.

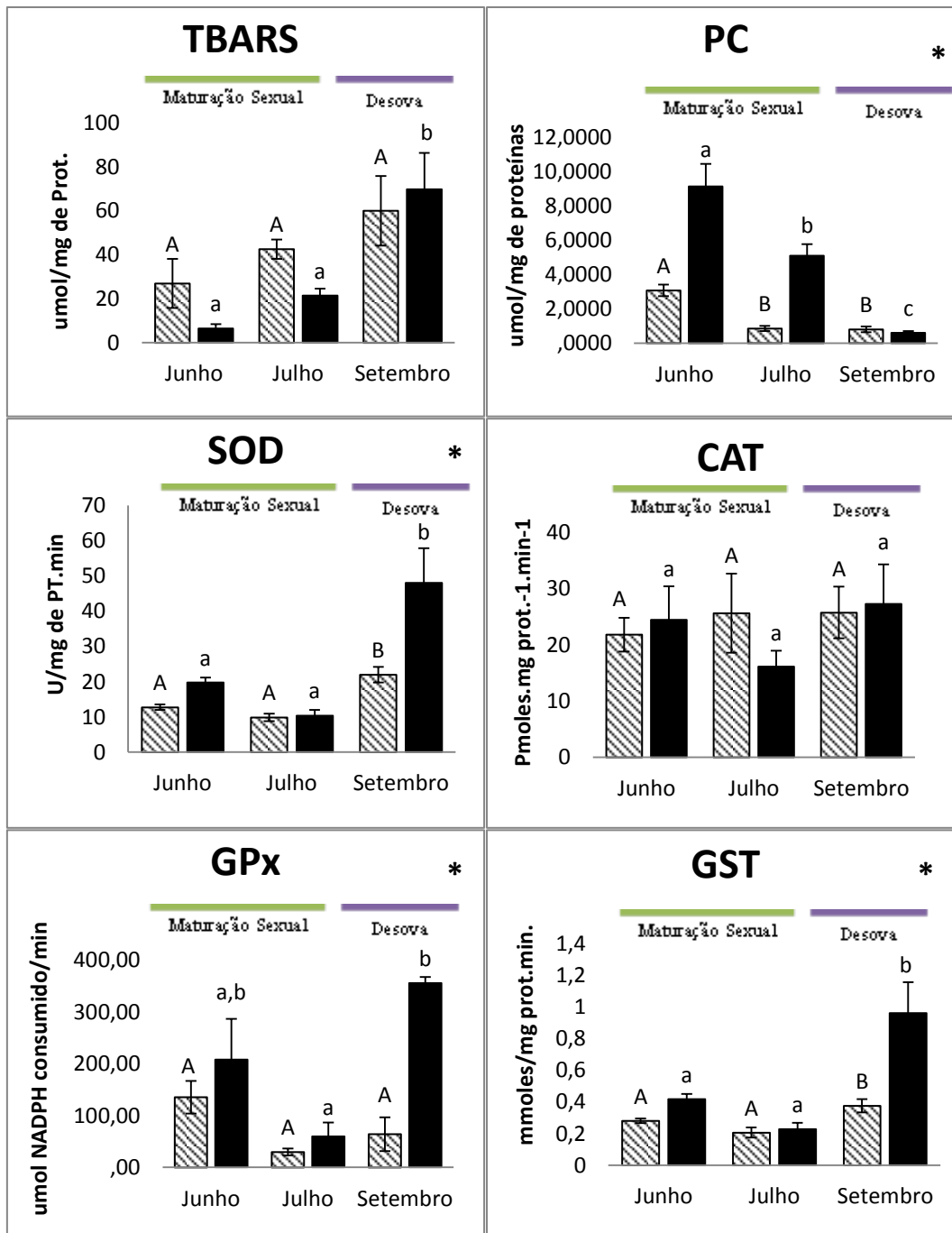


Fig. 5: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 1 (P1). As barras representam as médias \pm erro padrão. Para referenciar, as barras listradas indicam as fêmeas e barras pretas os machos. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas utilizadas para as fêmeas e minúsculas para os machos. O símbolo “*” no gráfico representa diferença estatística entre machos e fêmeas em cada mês.

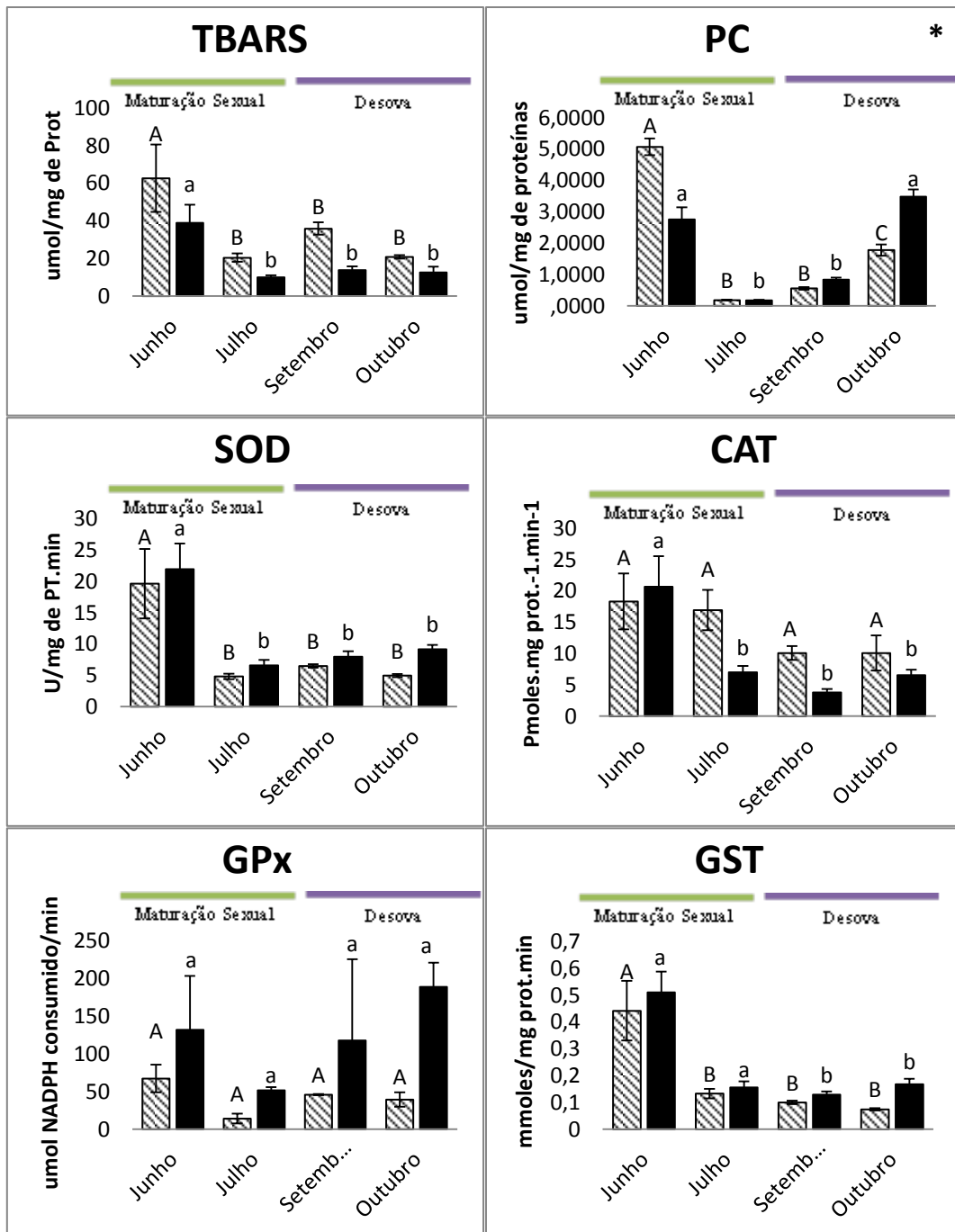


Fig. 6: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 2 (P2). As barras representam as médias \pm erro padrão. Para referenciar, as barras listradas indicam as fêmeas e barras pretas os machos. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas utilizadas para as fêmeas e minúsculas para os machos. O símbolo “*” no gráfico representa diferença estatística entre machos e fêmeas em cada mês.

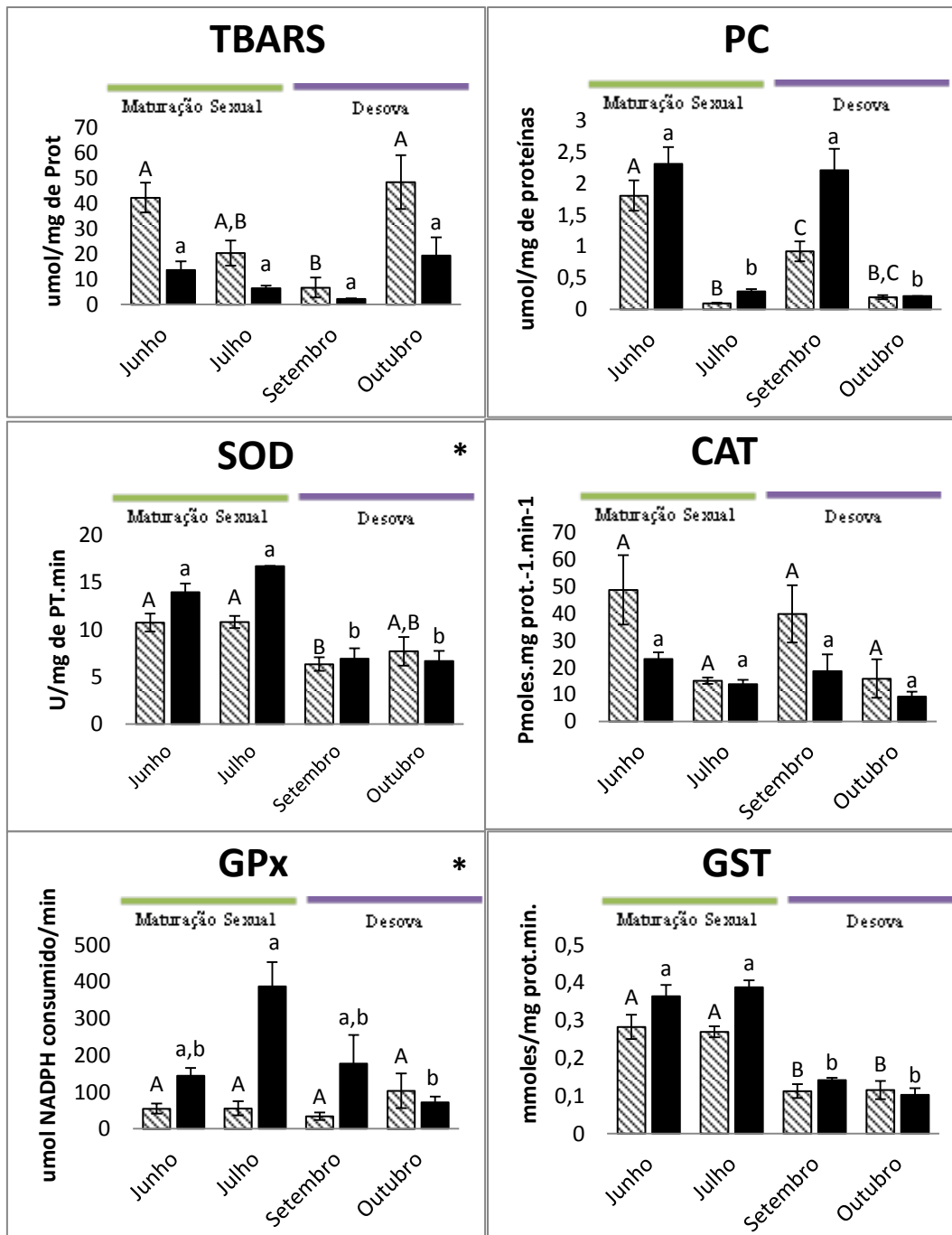


Fig. 7: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoecilus fulgens* na Poça 3 (P3). As barras representam as médias \pm erro padrão. Para referenciar, as barras listradas indicam as fêmeas e barras pretas os machos. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas utilizadas para as fêmeas e minúsculas para os machos. O símbolo “*” no gráfico representa diferença estatística entre machos e fêmeas em cada mês.

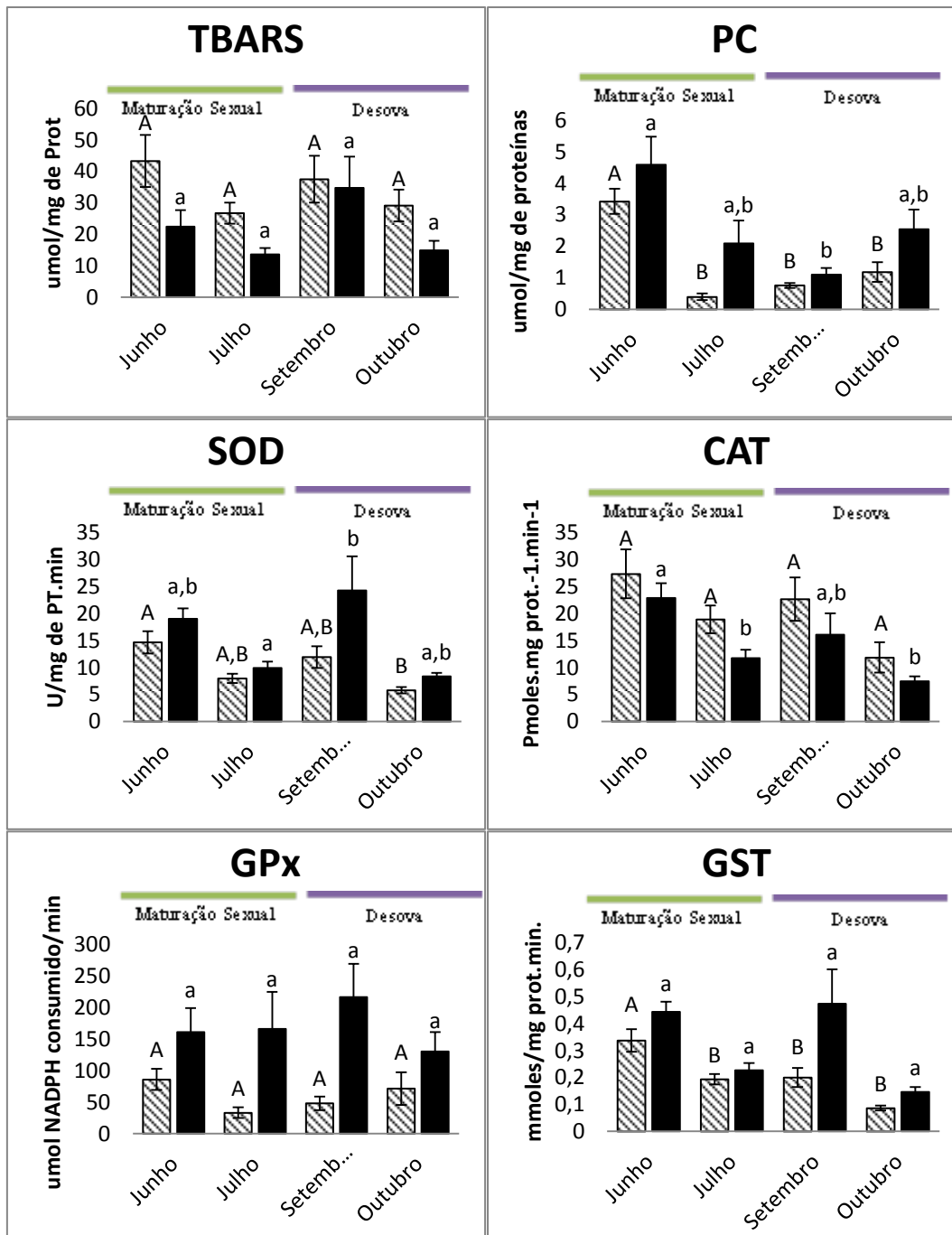


Fig. 8: Níveis de Lipoperoxidação (TBARS) e Proteínas Carboniladas (PC), e atividade das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) e de Biotransformação (GST) em fêmeas e machos da espécie *Cynopoeilus fulgens* com todas as unidades amostrais (P1, P2 e P3) agrupadas. As barras representam as médias \pm erro padrão. Para referenciar, as barras listradas indicam as fêmeas e barras pretas os machos. As letras diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$), sendo letras maiúsculas utilizadas para as fêmeas e minúsculas para os machos. Se houver o símbolo “*” no gráfico representa diferença estatística entre machos e fêmeas em cada mês.

Tabela 1: Parâmetros abióticos da água em cada unidade amostral por mês: Temperatura (°C), pH, Condutividade (Ms/cm), O₂ (mg/L), ORP (Potencial de redução da oxidação - mV), Turbidez (NTU), TDS (Sólidos totais dissolvido - ppm) e OD (Oxigênio dissolvido em %).

Parâmetros Abióticos	JUNHO			JULHO			SETEMBRO			OUTUBRO		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Temperatura	12,8	8,7	14,2	15,6	14,2	8,2	17,3	19	14,6	-	22,3	23,3
pH	6,5	5,6	5,5	5,1	5,2	5,9	5,1	5,2	5,9	-	6,4	4,3
Condutividade	0,16	0,04	0,11	0,05	0,04	0,12	0,04	0,04	0,12	-	0,05	0,25
O ₂	14,9	10,7	10,8	8,9	7,4	4,5	6,1	6,5	5,2	-	6,2	2,9
ORP	240,7	268,3	249,3	275	255,3	225,7	263,3	273	279,3	-	250,3	133,3
NTU	86,3	15,9	210,3	17,7	5,1	103,3	22,5	8,2	37,7	-	47,5	774
TDS	0,02	0,03	0,07	0,03	0,03	0,08	0,03	0,03	0,08	-	0,03	0,16
OD	149,9	93	107,7	90,9	73,8	38,6	64,4	71,2	51,6	-	72,6	33,5

Tabela 2: Medida de cada área úmida temporária (unidade amostral) por mês: Área Superficial (m²) e Profundidade Máxima (cm).

Medida: Área Úmida Temporária	JUNHO			JULHO			SETEMBRO			OUTUBRO		
	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3	P1	P2	P3
Área Superficial	871,2	544,6	2308,7	932,6	746,7	2472,4	1384,5	1378,5	3306,6	-	244,1	4,7
Profundidade Máxima	25	29	22	29	25	25	37	46	37	-	27	20

Tabela 3: Variáveis ambientais selecionadas que apresentaram influência sobre os biomarcadores. Análises realizadas no ambiente estatístico Rstudio.

Biomarcador	R ² ajustado (conjunto)	R ² (variável ambiental)	F (conjunto)	F (variável ambiental)	P (conjunto)	P (variável ambiental)
PT	0,11	-	15,86	-	0,001	-
Temperatura	-	0,11	-	15,86	-	0,001
TBARS	0,41	-	13,26	-	0,001	-
Temperatura	-	0,03	-	7,09	-	0,009
Área	-	0,09	-	15,77	-	0,001
Condutividade	-	0,04	-	8,13	-	0,008
NTU	-	0,02	-	4,50	-	0,044
Abundância <i>A. minuano</i>	-	0,03	-	5,81	-	0,020
Profundidade	-	0,06	-	12,38	-	0,002
pH	-	0,14	-	20,27	-	0,001
SOD	0,17	-	9,33	-	0,001	-

Abundância <i>A. minuano</i>	-	0,03	-	4,94	-	0,022
Abundância <i>C. fulgens</i>	-	0,04	-	6,70	-	0,007
Temperatura	-	0,10	-	14,91	-	0,001
CAT	0,52	-	27,92	-	0,001	-
Abundância <i>A. minuano</i>	-	0,36	-	69,20	-	0,001
Riqueza não anuais	-	0,04	-	9,30	-	0,002
Abundância <i>C. fulgens</i>	-	0,05	-	13,43	-	0,001
Abundância predador	-	0,05	-	13,26	-	0,001
Área	-	0,02	-	5,37	-	0,018
GST	0,35	-	17,28	-	0,001	-
Temperatura	-	0,26	-	44,56	-	0,001
Abundância <i>A. minuano</i>	-	0,04	-	7,49	-	0,008
Área	-	0,03	-	5,81	-	0,017
Profundidade	-	0,02	-	4,73	-	0,029
GPx	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-
PC	-	-	-	-	-	-
-	-	-	-	-	-	-

Considerações Finais da Dissertação

Os resultados do presente trabalho mostram que o período reprodutivo da espécie é longo considerando a duração do ciclo de vida pós-eclosão; exigindo assim, uma alta demanda energética para que estes organismos obtenham sucesso na reprodução. Deste modo, estes animais demonstram diversas alterações fisiológicas, como uma alta capacidade do sistema antioxidante para proteger/combater a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), com o intuito de manter a homeostase permitindo o sucesso em sustentar este longo período reprodutivo e concluir o seu ciclo de vida anual. Além disso, nossos resultados apontam que machos e fêmeas de *C. fulgens* utilizam estratégias fisiológicas distintas de seu balanço redox durante o ciclo de vida pós-embrionário. Entretanto, o balanço oxidativo de ambos os sexos demonstra ser influenciado não só pelo processo reprodutivo como também por diferentes variáveis ambientais, ressaltando que a temperatura, a abundância de predadores, abundância de *A. minuano* e a abundância de *C. fulgens* foram fatores que apresentaram um papel determinante no desenvolvimento durante o ciclo de vida destes animais.

Em relação às unidades amostrais, observamos que as populações de cada unidade (P1, P2 e P3) apontaram respostas fisiológicas distintas. Este resultado parece salienta a influência de fatores ambientais no ciclo de vida desta espécie. Adicionalmente, demonstramos que as populações das unidades P2 e P3 mostraram comportamentos semelhantes em relação à duração do ciclo de vida e a maioria dos marcadores do balanço oxidativo quando comparadas a P1. Os animais da P1 apresentaram um ciclo de vida encurtado, sendo isto possivelmente explicado por algum estresse ambiental que determinou um aumento da lipoperoxidação apesar do incremento das enzimas antioxidantes, valores exacerbados nos machos.

Sabe-se que a área de distribuição de peixes anuais, em nosso estado, coincide com áreas utilizadas para a agricultura (arroz e soja) cultivos que tradicionalmente se valem do uso de agrotóxicos; além disto, soma-se a expansão da urbanização o que possivelmente tornem-se uma ameaça a populações de peixes anuais. Com isso, a caracterização destas variáveis se faz importante para uma melhor compreensão ao longo do ciclo de vida destes animais, permitindo que tanto esta espécie como estes marcadores possam ser utilizados em estudos que envolvam ensaios toxicológicos com o intuito de verificar o efeito de herbicidas em fases específicas ou para o

desenvolvimento de estudos longitudinais considerando todo o ciclo de vida pós-eclosão.

Cabe ressaltar que os parâmetros aqui analisados mostram-se adequados para serem utilizados em estudos de biomonitoramento permitindo avaliar as condições deste animal em resposta a mudanças do habitat. E, também, apontam a relevância e necessidade do desenvolvimento de estratégias para a conservação ambiental e das espécies que ali habitam.

Em relação à biologia do envelhecimento, o nosso estudo mostrou que em duas unidades amostrais houve aumento da oxidação de proteínas (P2) ou da lipoperoxidação (P3) no final do ciclo de vida coincidindo com o declínio do sistema antioxidante, podendo estar caracterizando um processo de deterioração funcional na fase de senescência destes organismos. Deste modo, nossos resultados demonstram que a utilização dos peixes anuais neotropicais é altamente promissora, permitindo um estudo aprofundado na área de envelhecimento, como também o delineamento de ensaios toxicológicos em diferentes fases do desenvolvimento biológico tendo uma espécie de vertebrado como modelo, e investigando marcadores de estresse oxidativo.

Finalmente, esperamos que estes resultados possam contribuir para o estabelecimento dos peixes anuais como espécies sentinelas para a conservação das áreas úmidas temporárias. Além disso, que estes animais subsidiem através das ferramentas proporcionadas pela análise do balanço oxidativo, futuras abordagens de biomonitoramento direcionadas para espécies ameaçadas em vulneráveis e negligenciados ecossistemas.

Referências da Dissertação

- ALMROTH, B. C. et al. Oxidative damage in eelpout (*Zoarces viviparus*), measured as protein carbonyls and TBARS, as biomarkers. **Aquatic Toxicology**, v. 73, n. 2, p. 171–180, 2005.
- APEL, K.; HIRT, H. REACTIVE OXYGEN SPECIES: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. **Annual Review of Plant Biology**, v. 55, n. 1, p. 373–399, 2004.
- ARENZON, A.; LEMOS, C. A.; BOHRER, M. B. C. The influence of temperature on the embryonic development of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Brazilian journal of biology**, v. 62, n. 4B, p. 743–747, 2002.
- ARENZON, A. et al. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. **Environmental toxicology and chemistry / SETAC**, v. 22, n. 9, p. 2188–90, 2003.
- ARENZON, A.; PERET, A. C.; BOHRER, M. B. C. Growth of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan, 1912) based in a Temporary Water Body Population in Estado Rio Grande Do Sul, Brazil (Cyprinodontiformes, Rivulidae). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 61, p. 117–123, 2001.
- AREZO, M. J. et al. Sex differentiation pattern in the annual fish *Austrolebias charrua* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Tissue and Cell**, v. 39, n. 2, p. 89–98, 2007.
- ARIM, M. et al. Food web structure and body size: Trophic position and resource acquisition. **Oikos**, v. 119, n. 1, p. 147–153, 2010.
- ARMSTRONG, R. N. Structure, Catalytic Mechanism, and Evolution of the Glutathione Transferases. **Chemical Research in Toxicology**, v. 10, n. 1, p. 2–18, 1997.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: Conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutricao**, v. 23, n. 4, p. 629–643, 2010.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. Estresse Oxidativo: Relação entre Geração de Espécies Reativas e Defesa do Organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BEROIS, N. et al. Annual fish: Developmental adaptations for an extreme environment. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology**, v. 1, n. 4, p. 595–602, 2012.
- BEROIS, N.; AREZO, M. J.; DE SÁ, R. O. The Neotropical Genus *Austrolebias*: An Emerging Model of Annual Killifishes. **Cell & Developmental Biology**, v. 03, n. 02, p. 1–9, 2014.

- BLAŽEK, R. et al. Repeated intraspecific divergence in life span and aging of African annual fishes along an aridity gradient. **Evolution**, v. 71, n. 2, p. 386–402, 2017.
- BOVERIS, A.; CADENAS, E. Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide in mitochondria. In: OBERLEY, L. W. (Ed.). **Superoxide dismutase**. Flórida: Boca Raton: CRC Press, 1982. v. 2p. 15–30.
- BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. **The Biochemical journal**, v. 134, n. 3, p. 707–716, 1973.
- BOYLAND, E.; CHASSEAUD, L. F. The Role of Glutathione and Glutathione S-transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis. **Advances in enzymology and related areas of molecular biology**, v. 32, p. 173–219, 1969.
- BRAGHIROLI, F. M.; OLIVEIRA, M. R.; OLIVEIRA, G. T. Seasonal variability of metabolic markers and oxidative balance in freshwater amphipod *Hyaella kaingang* (Crustacea, Amphipoda). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 130, p. 177–184, 2016.
- BRASIL. **Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos. Portaria N° 445. Diário oficial da União.** Ministério do Meio Ambiente, , 2014.
- BUEGE, J. A.; AUST, S. D. Microsomal Lipid Peroxidation. **Methods Enzym**, p. 302–310, 1978.
- CALHOUN, A. J. K. et al. Temporary wetlands: challenges and solutions to conserving a “disappearing” ecosystem. **Biological Conservation**, v. 211, p. 3–11, 2017.
- CNUBBEN, N. H. P. et al. The interplay of glutathione related processes in antioxidant defense. **Environ. Toxicol. Pharmacol.**, v. 10, p. 141–152, 2001.
- COLLEN, B. et al. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 1, p. 40–51, 2014.
- COOKE, S. J. et al. What is conservation physiology? Perspectives on an increasingly integrated and essential science. **Conservation Physiology**, v. 1, n. 1, p. 1–23, 2013.
- COSTA, W. J. E. M. Origin and Evolution of Annualism and Miniaturization in. **Journal of Comparative Biology**, v. 3, n. 1, p. 1–62, 1998.
- COSTANTINI, D. **Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology**. Springer Heidelberg New York Dordrecht London, 2014.
- CREED, I. F. et al. Enhancing protection for vulnerable waters. **Nature Geoscience**, v. 10, n. 11, p. 809–815, 2017.

DANTZER, B. et al. Measures of physiological stress: A transparent or opaque window into the status, management and conservation of species? **Conservation Physiology**, v. 2, n. 1, p. 1–18, 2014.

DARWALL, W.; FREYHOF, J. Lost fishes, who is counting? The extent of the threat to freshwater fish biodiversity. In: CLOSS, G.; KRKOSEK, M.; OLDEN, J. (Eds.). **Conservation of Freshwater Fishes**. Cambridge: Cambridge University Press, 2015. p. 1–36.

DI CICCIO, E. et al. The short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri* shows a typical teleost aging process reinforced by high incidence of age-dependent neoplasias. **Experimental Gerontology**, v. 46, n. 4, p. 249–256, 2011.

DONG, Y. et al. Aging asymmetry: systematic survey of changes in age-related biomarkers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 43, n. 2, p. 309–319, 2017.

DOWLING, D. K.; SIMMONS, L. W. Reactive oxygen species as universal constraints in life-history evolution. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 276, n. 1663, p. 1737–45, 2009.

DRAY, S. et al. **Multivariate Multiscale Spatial Analysis**, 2018.

DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity: Importance, threats, status and conservation challenges. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 81, n. 2, p. 163–182, 2006.

ERREA, A.; DANULAT, E. Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. **Environmental Biology of Fishes**, v. 61, n. 3, p. 261–268, 2001.

FAUSCH, K. D. et al. Fish communities as indicators of environmental degradation. **American Fisheries Society Symposium 8**, n. July, p. 123–144, 1990.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Medicina**, v. 43, n. 1, p. 61–68, 1997.

FONSECA, A. P. DA et al. Growth of Critically Endangered annual fish *Austrolebias wolterstorffi* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 4, p. 837–844, 2013.

FREITAS, D. R. .; VAZ JUNIOR, I. D. S.; MASUDA, A. Expressão e Atividade Enzimática de Glutathione S-Transferase em Tecidos de Fêmeas de *Boophilus microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.**, v. 17, n. 2, p. 99–104, 2008.

FURNESS, A. I. et al. Convergent evolution of alternative developmental trajectories associated with diapause in African and South American killifish. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 282, n. 1802, p. 1–9, 2015.

GARCÍA, D. et al. Reproductive behavior in the annual fish. v. 6, n. 2, p. 243–248, 2008.

GENADE, T. et al. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. **Aging Cell**, v. 4, n. 5, p. 223–233, 2005.

GONÇALVES, C. DA S.; SOUZA, U. P.; VOLCAN, M. V. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 191–200, 2011.

GUTTERMAN, Y. **Survival Strategies of Annual Desert Plants**. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2002.

HERMES-LIMA, M. ROLE OF FREE RADICALS. In: STOREY, K. B. (Ed.). **Funcional Metabolism: Regulation and Adaptation**. John Wiley ed. Hoboken, 2004. p. 319–368.

HERMES-LIMA, M. et al. Preparation for oxidative stress under hypoxia and metabolic depression: Revisiting the proposal two decades later. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 1122–1143, 2015.

HSU, C. Y. et al. Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii*. **Journals of Gerontology - Series A Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 63, n. 12, p. 1267–1276, 2008.

IGHODARO, O. M.; AKINLOYE, O. A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 54, n. 4, p. 287–293, 2017.

KEPPELER, F. W. et al. The diet of *Cynopoecilus fulgens* Costa, (Cyprinodontiformes : Rivulidae) in Southern Brazil wetlands. **Italian Journal of Zoology**, v. 80, n. May, p. 291–302, 2013.

KEPPELER, F. W. et al. The morphology-diet relationship and its role in the coexistence of two species of annual fishes. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 24, n. 1, p. 77–90, 2014.

LANÉS, L. E. K. **Dinâmica e Conservação de Peixes Anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no Parque Nacional da Lagoa do Peixe**. Dissertação (Mestrado), São Leopoldo: UNISINOS, 2011.

LANÉS, L. E. K. et al. Seasonal dynamics in community structure, abundance, body size and sex ratio in two species of Neotropical annual fishes. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 5, p. 2345–2364, 2016.

LANÉS, L. E. K. et al. Environmental predictors for annual fish assemblages in subtropical grasslands of South America: the role of landscape and habitat characteristics. **Environmental Biology of Fishes**, v. 101, n. 6, p. 963–977, 2018.

LANÉS, L. E. K.; KEPPELER, F. W.; MALTCHIK, L. Abundance variations and life history traits of two sympatric species of Neotropical annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in temporary ponds of southern Brazil. **Journal of Natural History**, v. 48, n. 31-32, p. 1971–1988, 2014.

LANÉS, L. E. K.; MALTCHIK, L. Discovery of the Critically Endangered annual killifish *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924) (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in Lagoa do Peixe National Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Threatened Taxa**, v. 2, p. 1282–1285, 2010.

LAUFER, G. et al. Diet of four annual killifishes: An intra and interspecific comparison. **Neotropical Ichthyology**, v. 7, n. 1, p. 77–86, 2009.

LEVINE, R. L. et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. **Methods in Enzymology**, v. 233, p. 346–357, 1994.

LIMA, É. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 37, n. 3, p. 293–303, 2001.

LIU, C. et al. Differential expression of aging biomarkers at different life stages of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Biogerontology**, v. 13, n. 5, p. 501–510, 2012.

LOUREIRO, M. et al. Review of the family Rivulidae (Cyprinodontiformes, Aplocheiloidei) and a molecular and morphological phylogeny of the annual fish genus *Austrolebias* Costa 1998. **Neotropical Ichthyology**, v. 16, n. 3, p. 1–20, 2018.

LUCAS-SÁ, A. et al. *Nothobranchius* as a model for aging studies. A review. **aging and disease**, v. 5, n. 4, p. 281–291, 2014.

LUSHCHAK, V. I. **Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals** *Aquatic Toxicology*. Elsevier B.V., , 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2010.10.006>>

MALTCHIK, L. et al. Species-area relationship and environmental predictors of fish communities in coastal freshwater wetlands of southern Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 88, n. 1, p. 25–35, 2010.

MALTCHIK, L. et al. Landscape and habitat characteristics associated with fish occurrence and richness in southern Brazil palustrine wetland systems. **Environmental Biology of Fishes**, v. 97, n. 3, p. 297–308, 2014.

OKSANEN, J. et al. **Community Ecology Package**, 2018.

OLIVEIRA, G. T. et al. Seasonal variations in the intermediate metabolism of *Aegla platensis* (Crustacea, Aeglidae). **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 147, n. 3, p. 600–606, 2007.

PAPADOPOULOS, A. I. et al. Glutathione S-transferase in the insect *Apis mellifera macedonica*: Kinetic characteristics and effect of stress on the expression of GST

isoenzymes in the adult worker bee. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 139, n. 1-3, p. 93–97, 2004.

PASSOS, C. et al. Intra- and intersexual selection on male body size in the annual killifish *Austrolebias charrua*. **Behavioural Processes**, v. 96, p. 20–26, 2013.

PASSOS, C. et al. Seasonal variation in female mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish, *Austrolebias reicherti*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014.

PERES-NETO, A. P. R. et al. Variation partitioning of species data matrices: estimation and comparison of fractions. **Ecology**, v. 87, n. 10, p. 2614–2625, 2006.

PERSCH, T. S. P. et al. Metabolic parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. **Chemosphere**, v. 174, p. 98–109, 2017.

PERSCH, T. S. P. et al. Changes in intermediate metabolism and oxidative balance parameters in sexually matured three-barbeled catfishes exposed to herbicides from rice crops (Roundup®, Primoleo® and Facet®). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 58, p. 170–179, 2018.

PINHEIRO, L. C.; OLIVEIRA, G. T. Oxidative Status Profile in Different Tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a Seasonal Cycle. **Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology**, v. 325, n. 5, p. 318–328, 2016.

PODRABSKY, J. E.; CARPENTER, J. F.; HAND, S. C. Survival of water stress in annual fish embryos: dehydration avoidance and egg envelope amyloid fibers. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 280, n. 1, p. R123–31, 2001.

PODRABSKY, J. E.; HAND, S. C. The bioenergetics of embryonic diapause in an annual killifish, *Austrofundulus Limnaeus*. **The Journal of experimental biology**, v. 202, p. 2567 – 2580, 1999.

PODRABSKY, J. E.; HAND, S. C. Physiological strategies during animal diapause: lessons from brine shrimp and annual killifish. **J Exp Biol**, v. 218, n. Pt 12, p. 1897–1906, 2015.

QUINTELA, F. M. et al. High arsenic and low lead concentrations in fish and reptiles from Taim wetlands, a Ramsar site in southern Brazil. **Science of The Total Environment**, v. 660, p. 1004–1014, 2019.

REICHARD, M. Evolutionary ecology of aging: Time to reconcile field and laboratory research. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 2988–3000, 2016.

RIO GRANDE DO SUL. **Dispõe sobre a Reavaliação da Lista das Espécies da Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Rio Grande do Sul. DECRETO N°51.797**. Porto Alegre, 2014.

SAUNDERS, D. L.; MEEUWIG, J. J.; VINCENT, A. C. J. Freshwater Protected Areas: Strategies for Conservation Áreas Protegidas de Agua Dulce: Estrategias para la Conservación. **Conservation Biology**, v. 16, n. 1, p. 30–41, 2002.

SHEEHAN, D. et al. Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. **Biochemical Journal**, v. 360, n. 1, p. 1–16, 2001.

SIES, H. Oxidative stress: From basic research to clinical application. **The American Journal of Medicine**, v. 91, n. 3 SUPPL. 3, p. 31–38, 1991.

SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122–126, 2018.

TRENZADO, C. et al. Antioxidant enzymes and lipid peroxidation in sturgeon *Acipenser naccarii* and trout *Oncorhynchus mykiss*. A comparative study. **Aquaculture**, v. 254, n. 1-4, p. 758–767, 2006.

TYLIANAKIS, J. M.; TSCHARNTKE, T.; LEWIS, O. T. Habitat modification alters the structure of tropical host-parasitoid food webs. **Nature**, v. 445, n. 7124, p. 202–205, 2007.

VALENZANO, D. R. et al. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish: *Nothobranchius furzeri*. **Aging Cell**, v. 5, n. 3, p. 275–278, 2006.

VAN GESTEL, C. A. M.; VAN BRUMMELEN, T. C. Incorporation of the biomarker concept in ecotoxicology calls for a redefinition of terms. **Ecotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 217–225, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio, Antioxidantes e Marcadores de Dano Oxidativo em Sangue Humano: Principais Métodos Analíticos para sua Determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VAZ-FERREIRA, RAUL; SIERRA, B. Los generos de Cyprinodontidae de aguas temporales sudamericana. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, n. 2, p. 36–42, 1973.

VOLCAN, M. V. et al. Pisces, Cyprinodontiformes, Rivulidae, *Austrolebias periodicus* (Costa, 1999): Distribution extension in state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Species Lists and Distribution**, p. 234–236, 2010.

VOLCAN, M. V. et al. Effect of temperature on growth of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. **Biota Neotropica**, v. 12, n. 4, p. 1–6, 2012.

VOLCAN, M. V. et al. Annual fishes (Rivulidae) from southern Brazil: a broad-scale assessment of their diversity and conservation. In: BEROIS, N.; GARCÍA, G.; SÁ, R.

O. (Eds.). . **Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution**. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 185–204.

VOLCAN, M. V.; LANÉS, L. E. K. Brazilian killifishes risk extinction. **Science**, v. 361, n. 6400, p. 340–341, 2018.

VRTÍLEK, M.; REICHARD, M. Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 24, n. 4, p. 616–628, 2015.

WENDEL, A.; FEUERSTEIN, S. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. **Biochemical Pharmacology**, v. 30, n. 18, p. 2513–2520, 1981.

WOURMS, J. P. The Developmental Biology of Annual Fishes. **J. Exp. Zool.**, v. 182, p. 389–414, 1972.

ZEBRAL, Y. D. et al. A glyphosate-based herbicide reduces fertility, embryonic upper thermal tolerance and alters embryonic diapause of the threatened annual fish *Austrolebias nigrofasciatus*. **Chemosphere**, v. 196, p. 260–269, 2018.

ZUUR, A. F.; IENO, E. N.; ELPHICK, C. S. A protocol for data exploration to avoid common statistical problems. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 3–14, 2010.

NORMAS PARA A PUBLICAÇÃO



SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT

An International Journal for Scientific Research into the Environment and its Relationship with Humankind

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

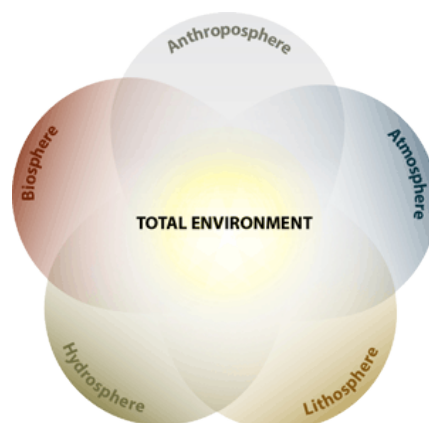
●	Description	p.1
●	Audience	p.1
●	Impact Factor	p.1
●	Abstracting and Indexing	p.1
●	Editorial Board	p.2
●	Guide for Authors	p.11



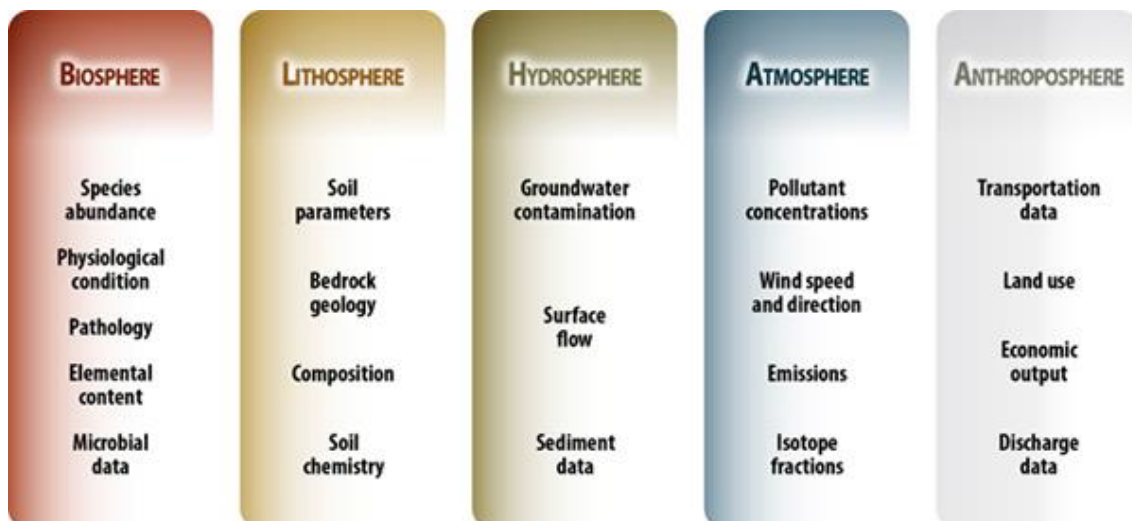
ISSN: 0048-9697

INTRODUCTION

Aims and Scope Science of the Total Environment is an international journal for publication of original research on the total environment, which includes the atmosphere, hydrosphere, biosphere, lithosphere, and anthroposphere.



The total environment is characterized where these five spheres overlap. Studies that focus on at least two or three of these will be given primary consideration. Papers reporting results from only one sphere will not be considered. Field studies are given priority over laboratory studies. The total environment is studied when data are collected and described from these five spheres. By definition total environment studies must be multidisciplinary.



Subject areas may include, but are not limited to:

- Agriculture, forestry, land use and management
- Air pollution quality and human health
- Contaminant (bio)monitoring and assessment
- Ecosystem services and life cycle assessments
- Ecotoxicology and risk assessment
- Emerging fields including global change and contaminants
- Environmental management and policy
- Environmental remediation
- Environmental sources, processes and global cycling
- Groundwater hydrogeochemistry and modeling
- Human health risk assessment and management
- Nanomaterials in the environment
- Noise in the environment
- Persistent organic pollutants
- Plant science and toxicology
- Remote sensing
- Stress ecology in marine, freshwater and terrestrial ecosystems
- Trace metals and organics in biogeochemical cycles
- Waste and water treatment

The abstract, highlights and conclusions of papers in this journal must contain clear and concise statements as to why the study was done and how readers will benefit from the results. Articles submitted for publication in Science of the Total Environment should establish connections among research findings with implications for environmental quality, ecological health, and/or human health.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print
- Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)
- Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'
- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
- A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
- Journal policies detailed in this guide have been reviewed
- Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements

Language

Write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these).

Article structure

Manuscript Page Limit

There is no restriction on the number of pages but brevity of papers is greatly encouraged. The length of a paper should be commensurate with the scientific information being reported. In particular, the introductory material should be limited to a few paragraphs and results presented in figures should not be repeated in tables.

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to

'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

• *Title.*

Be concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Acronyms and brand names of products should not appear in the title of a paper. Instead they may be listed in the key words, and spelled out the first time they appear in the body of the paper.

• *Author names and affiliations.*

Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses

(where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- *Corresponding author.*

Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. The inclusion of multiple corresponding authors is strongly discouraged. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

A graphical abstract is mandatory for this journal. It should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership online. Authors must provide images that clearly represent the work described in the article. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point).

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
 - Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files.
 - A detailed guide on electronic artwork is available.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Number tables consecutively with Arabic numerals in accordance with their appearance in the text. Type each table double-spaced on a separate page with a short descriptive title typed directly above and place footnotes to tables below the table body and indicate them with superscript lowercase letters. Avoid vertical rules. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in tables do not duplicate results described elsewhere in the article. Tables should never be included within the text, because file(s) containing tables are attached separately in the electronic submission system.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable,

author(s) name(s), journal title/ book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the article number or pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br