

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
NÍVEL MESTRADO**

ROBSON SOUZA GODOY

**VARIAÇÃO SAZONAL E PREDITORES AMBIENTAIS DO BALANÇO
OXIDATIVO EM UM PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

**São Leopoldo
2019**

ROBSON SOUZA GODOY

**VARIAÇÃO SAZONAL E PREDITORES AMBIENTAIS DO BALANÇO
OXIDATIVO EM UM PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Biologia,
pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia
da Universidade do Vale do Rio dos Sinos -
UNISINOS

Área de Concentração: Diversidade e Manejo
de Vida Silvestre

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Maltchik Garcia

São Leopoldo
2019

G589v Godoy, Robson Souza.

Variação sazonal e preditores ambientais do balanço oxidativo em um peixe anual neotropical / Robson Souza Godoy. – 2019.

69 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Biologia, 2019.

“Orientador: Prof. Dr. Leonardo Maltchik Garcia.”

1. Espécies reativas de oxigênio. 2. Enzimas antioxidantes. 3. Estresse oxidativo. 4. Ciclo de vida. 5. Áreas úmidas temporárias.
I. Título.

CDU 573

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecária: Amanda Schuster – CRB 10/2517)

ROBSON SOUZA GODOY

**VARIAÇÃO SAZONAL E PREDITORES AMBIENTAIS DO BALANÇO
OXIDATIVO EM UM PEIXE ANUAL NEOTROPICAL**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em Biologia,
pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia
da Universidade do Vale do Rio dos Sinos -
UNISINOS

Aprovado em

BANCA EXAMINADORA

Orientador Prof. Dr. Leonardo Maltchik Garcia – Universidade do Vale do Rio dos Sinos –
UNISINOS

Prof (a) Dr. Anapaula Sommer Vinagre – Universidade Federal do Rio Grande do Sul –
UFRGS

Prof. Dr. Uwe Horst Schulz – Universidade do Vale do Rio dos Sinos - UNISINOS

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família pelos ensinamentos, amor, dedicação por sempre me apoiarem a seguir aquilo que sempre quis ser desde pequeno e por estarem junto durante essa longa caminhada. Acredito que ninguém sabe tanto quando vocês o quanto eu desejava isso e que a realização do meu sonho é a realização do sonho de vocês também. Também a minha namorada pelo companheirismo, carinho, amor, conversas e pelo entendimento nos momentos de ausência ou silêncio durante o desenvolvimento da dissertação.

Agradeço especialmente também ao meu orientador Dr. Leonardo Maltchik e a Dr. Cristina Stenert pela confiança e oportunidade de trabalhar no seu laboratório e por todas conversas e ensinamentos que contribuíram muito para meu desenvolvimento durante todos esses anos. Também a minha coorientadora Dra. Guendalina Turcato de Oliveira pelos ensinamentos na sobre fisiologia e pela confiança, sem dúvida o desenvolvimento desse trabalho não seria possível sem a sua ajuda.

Ao grande amigo e “anualeiro” Luis Esteban Krause Lanés, que me apresentou o mundo dos peixes anuais e contribuiu muito com seu conhecimento ao longo dessa etapa. Hoje no seu fascínio e paixão que mostra falando e trabalhando com esses peixes me inspiro para seguir trabalhando com esse grupo tão fantástico.

A toda família “LECEA/LEMIA pelo bom convívio, conversas, ajudas, ensinamentos. Em especial ao colega Mateus Marques Pires pelos ensinamentos estatísticos e ao Vinicius Weber pelas ajudas nas intermináveis bancadas. Também aos colegas e professores da Unisinos e da PUCRS que contribuíram com o seu conhecimento e para o desenvolvimento desse trabalho.

A todos amigos e demais que não tem o nome citado aqui mas que ficam felizes lendo esses agradecimentos e sabendo que contribuíram de alguma forma, aqueles que acompanharam essa etapa e estiveram junto apoiando e entendendo os sumiços e ausências.

Por fim, gostaria de agradecer ao CNPq, Cappes, PUCRS e UNISINOS pelo apoio financeiro e suporte técnico para desenvolvimento do projeto.

Robson Godoy

Resumo

O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço entre pró-oxidantes e antioxidantes em favor dos pró-oxidantes, levando a uma ruptura da sinalização e balanço oxidativo e/ou dano molecular. O estresse oxidativo tem sido relacionado a *trade-offs* entre as características da história de vida dos organismos e auto-manutenção. *Trade-offs* são caracterizados por conflitos entre a alocação de energia em uma determinada característica em detrimento de uma outra. Organismos que apresentam crescimento rápido e grandes investimentos em reprodução exibem maior produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) e aumento do estresse oxidativo, normalmente relacionados a declínios na atividade das enzimas antioxidantes. O estresse oxidativo pode ser influenciado pelas condições ambientais. Peixes anuais apresentam características de história de vida relacionadas a maior produção de EROS, como crescimento rápido, intenso processo reprodutivo e acelerado envelhecimento, além de habitarem áreas úmidas temporárias com grandes variações ambientais. Desta forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar marcadores do balanço oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutathione S-transferase, lipoperoxidação e proteínas totais) ao longo do ciclo de vida da espécie de peixe anual neotropical *Austrolebias minuano*, coletada em ambiente natural. Nossos resultados mostraram que a espécie apresenta um sistema antioxidante eficiente na maior parte do seu ciclo de vida, principalmente na fase reprodutiva nas fêmeas e no período senil de vida nos machos. Aumento da lipoperoxidação foi evidenciado somente em fêmeas no período correspondente a fase de crescimento. Machos mostraram redução em todos marcadores analisados, exceto nas proteínas, ao longo da vida. Os *trade-offs* esperados entre as características de vida e automanutenção foram exclusivos entre crescimento e automanutenção em fêmeas. Além disso, demonstramos que as variáveis ambientais tem influência na variação dos biomarcadores analisados ao longo do ciclo de vida da espécie. Esses resultados sugerem que os peixes anuais apresentam um sistema de balanço oxidativo bem desenvolvido e adaptado para enfrentar a imprevisibilidade das áreas úmidas temporárias.

Palavras-chaves: Espécies reativas de oxigênio; enzimas antioxidantes; estresse oxidativo; ciclo de vida, áreas úmidas temporárias.

Abstract

Oxidative stress occurs when there is an imbalance between pro-oxidants and antioxidants in favor of the pro-oxidants, leading to a rupture of signaling and oxidative balance and/or molecular damage. Oxidative stress has been related to *trade-offs* between the characteristics of the life history and self-maintenance. *Trade-offs* are characterized by conflicts between the allocation of energy in one characteristic over another. Organisms that present rapid growth and large investments in reproduction exhibit higher production of oxygen-reactive species (ROS) and oxidative stress related to declines in the activity of antioxidant enzymes. Oxidative stress can be influenced by environmental conditions. Annual fish exhibit life history characteristics related to increased ROS production, such as rapid growth, intense reproductive process and accelerated aging, and inhabit temporary pools with large environmental variations. Thus, the objective of this work was to evaluate oxidative balance markers (superoxide dismutase, catalase, glutathione S-transferase, lipoperoxidation and total proteins) throughout the life cycle of the neotropical annual fish species *Austrolebias minuano*, collected in a natural environment. Our results showed that the species presents an efficient antioxidant system during most of its life cycle, mainly in the reproductive phase in the females and in the senile period of life in males. Increased lipoperoxidation was evidenced only in females in the period corresponding to the growth phase. Males showed reduction in all analyzed markers, except in proteins, throughout life. The expected *trade-offs* between life and self-maintenance characteristics were exclusive between growth and automanutation in females. In addition, we showed that the environmental variables influence the variation of the biomarkers analyzed during the life cycle of the species. These results suggest that the annual fishes present a well developed oxidative balance system adapted to face the unpredictability of temporary pools.

Keywords: Reactive oxygen species; antioxidant enzymes; oxidative stress; life cycle; temporary pools.

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO.....	10
2 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO	Erro! Indicador não definido. 1
2.1 Peixes anuais	11
2.2 Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes.....	15
3 Referências	Erro! Indicador não definido. 2
4 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO	34
5 INTRODUÇÃO.....	34
6 MATERIAL E MÉTODOS.....	Erro! Indicador não definido. 7
6.1 Espécie de estudo.....	Erro! Indicador não definido. 7
6.2 Área de estudo	38
6.3 Delineamento amostral e coleta de dados.....	39
6.4 Estimativas populacionais.....	40
6.5 Processamento das amostras.....	41
6.6 Ensaio de Proteína Total.....	42
6.7 Ensaio de Peroxidação lipídica.....	42
6.8 Ensaio de Enzimas Antioxidantes e de Biotransformação.....	43
6.8.1 Superóxido Dismutase (SOD).....	43
6.8.2 Catalase (CAT).....	43
6.8.3 Glutathione S-Transferase (GST).....	43
7 Análises estatísticas.....	43
8 RESULTADOS.....	44
8.1 Biomarcadores.....	44
8.2 Influência das variáveis ambientais nos biomarcadores.....	50
9 DISCUSSÃO.....	53
10 REFERÊNCIAS.....	61

1 APRESENTAÇÃO

Esta dissertação intitulada “Variação sazonal e preditores ambientais do balanço oxidativo em um peixe anual neotropical” foi elaborada como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia, Diversidade e Manejo da Vida Silvestre da Universidade do Vale do Rio dos Sinos.

A dissertação está estruturada em dois capítulos, constituídos por um referencial teórico que abrange uma revisão sobre os peixes anuais, espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes e por um segundo capítulo na forma de artigo científico em que são apresentados os resultados obtidos no presente estudo.

No marco teórico, foram levados em consideração principalmente aspectos importantes sobre a biologia e ecologia de peixes anuais, destacando a sua relação com a dinâmica temporal de seu hábitat. Fornecemos um pequeno panorama sobre a representatividade do grupo no Rio Grande do Sul e sobre a sua conservação. Também são apresentadas informações gerais sobre espécies reativas de oxigênio, enzimas antioxidantes e estresse oxidativo, com destaque para fatores de influência.

Considerando o escasso conhecimento sobre o balanço oxidativo em peixes anuais e em ambientes naturais, bem como o grande potencial do grupo para constituir modelos biológicos em estudos de ecologia, envelhecimento e ecotoxicologia este estudo teve como objetivo avaliar o balanço oxidativo de uma espécie do gênero *Austrolebias*, visando investigar a sua variação ao longo do ciclo de vida e o papel das características ambientais.

2 CAPÍTULO I - REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Peixes anuais

Peixes anuais formam um diversificado grupo de pequenos peixes da ordem Cyprinodontiformes que se encontram atualmente divididos em duas famílias taxonômicas: Nothobranchiidae e Rivulidae, distribuídas respectivamente na África e nas Américas (COSTA, 2008). Esses táxons são consideradas evolutivamente irmãos e compartilham várias características (COSTA, 1998). Nothobranchiidae e Rivulidae compreendem na sua maioria espécies de peixes com o ciclo de vida anual, mas algumas espécies possuem também ciclo de vida não anual (COSTA, 2008).

Estudos apontam que a divergência entre Nothobranchiidae e Rivulidae ocorreu no início do Eoceno (55 milhões de anos atrás) (COSTA, AMORIM, MATTOS, 2017). Duas hipóteses filogenéticas para o anualismo são consideradas: múltiplas origens independentes em espécies africanas e sul-americanas ou uma origem ancestral comum (provavelmente em peixes residentes de Gondwana antes da divergência da África e das Américas). Atualmente, a maioria dos pesquisadores adere às origens independentes e múltiplas do anualismo (HRBEK & LARSON, 1999; COSTA, 2009; FURNESS, LEE, REZNICK, 2015).

Os peixes anuais habitam exclusivamente áreas úmidas temporárias, ambientes que secam completamente em determinada época do ano (COSTA, 2002; REICHARD, POLACIK, SEDLACEK, 2009; POLAČIK & PODRABSKY, 2015; LOUREIRO & DE SÁ, 2015). Áreas úmidas temporárias são considerados ambientes imprevisíveis, apresentando grande variação nas características ambientais (POLAČIK & PODRABSKY, 2015), e os peixes anuais desenvolveram complexas adaptações para sobreviver nesses sistemas. O mecanismo especial de diapausa é uma delas, possibilitando que os embriões dos peixes anuais resistam a estação seca (BEROIS, AREZO, DE SÁ, 2014; LANÉS et al. 2016; CELLERINO, VALENZANO, REICHARD, 2016; REICHARD et al. 2017). Os peixes anuais reproduzem diariamente desde a maturidade sexual até a sua morte, resultando na deposição dos ovos no substrato (VAZ FERREIRA, SIERRA, SCAGLIA, 1964; ARENZON, PERET, BOHRER, 1999, 2001; ERREA & DANULAT 2001; GONÇALVES, SOUZA, VOLCAN, 2011). Com a inundação no ano seguinte, os ovos eclodem sincronicamente e os peixes crescem rapidamente até atingir a maturidade sexual, iniciando o processo reprodutivo que resulta

na deposição de novos ovos no substrato (BEROIS, AREZO, DE SÁ, 2014; LANÉS et al. 2016; VOLCAN, GONÇALVES, GUADAGNIN, 2018).

A diapausa é caracterizada por uma parada no desenvolvimento associada a uma redução acentuada na taxa metabólica, sendo dividida em três fases (diapausa I, II e III) (WOURMS, 1972; PODRABSKY & HAND, 1999). As diferentes fases da diapausa são fortemente influenciadas pelas condições ambientais (WOURMS, 1972; PODRABSKY et al. 2010; FURNESS, 2016). A entrada em qualquer uma das três fases da diapausa é modulada por variáveis ambientais, como temperatura, fotoperíodo, sinais químicos de peixes adultos e disponibilidade de oxigênio (WOURMS, 1972; FURNESS, 2016; POLAČIK et al. 2014; PODRABSKY, et al. 2017). A Diapausa I ocorre no estágio dispersão dos blastômeros após a epibolia. Na Diapausa II os embriões já têm coração e os elementos básicos do sistema nervoso central se formam (WOURMS, 1972). A Diapausa III ocorre quando os embriões estão completamente formados e prontos para eclodir (PODRABSKY et al. 2017). Os embriões podem permanecer nas diapausas II e III até que um sinal ambiental que possibilite a eclosão sem riscos de insucesso seja percebido (PODRABSKY & HAND, 1999; PRI-TAL et al. 2011).

As espécies de peixes anuais apresentam características peculiares relacionadas ao seu tempo de vida curto, que está intimamente relacionado com a duração das áreas úmidas temporárias. O estresse de tempo, impõe que o seu ciclo de vida seja completado antes do ambiente secar, desta forma os peixes anuais apresentam o crescimento rápido, a maturação sexual precoce e o envelhecimento acelerado, como já citado (BLAŽEK, POLAČIK, REICHARD, 2013; VRTÍLEK et al. 2018a). Peixes anuais podem crescer cerca de 50 mm ao longo de um período de duas semanas (VRTÍLEK et al. 2018b). Além disso, as espécies de peixes anuais estão entre os vertebrados com tempo de vida mais curto e *Nothobranchius furzeri* Jubb, 1971, espécie de peixe anual africana, é considerada o vertebrado com menor tempo de vida registrado, podendo completar o seu ciclo de vida em um mês e atingir a maturidade sexual em 14 dias na natureza (VRTÍLEK et al. 2018a,b). As espécies neotropicais em condições naturais vivem <8 meses e atingem a maturidade sexual entre 2 e 3 meses de vida (LANÉS, KEPPELER, MALTCHIK. 2014; LANÉS et al. 2016; VOLCAN, GONÇALVES, GUADAGNIN, 2018).

As características dos peixes anuais são altamente plásticas e envolvidas em *trade-offs* (BLAŽEK, POLAČIK, REICHARD, 2013; POLAČIK et al. 2014). *Trade-offs* são caracterizados por conflitos entre a alocação de energia em uma determinada

característica em detrimento de uma outra. *Trade-offs* são relacionados a custos para o indivíduos, visto que os organismos não podem simultaneamente maximizar todas as características da história de vida, por exemplo crescimento, reprodução e automanutenção (STEARNS 1992). Respostas plásticas no crescimento e em características ligadas a reprodução são desencadeadas pela disponibilidade de alimento (VRTÍLEK & REICHARD 2015), duração da inundação das áreas úmidas (POLAČIK et al. 2014), dessecação do ambiente e predação (GRÉGOIR et al. 2017; GRÉGOIR et al. 2018; REICHARD et al. 2018). Peixes anuais também demonstram ajustes nas características da história de vida em resposta a fatores manipulados em laboratório como por exemplo, produtos químicos (VALENZANO et al. 2006a), temperatura (VALENZANO et al. 2006b; HSU & CHIU, 2009) e dieta (TERZIBASI et al. 2009). Essas respostas plásticas estão relacionadas na maioria das vezes ao custo de uma vida útil mais curta, mostrando claro *trade-off* envolvido nesse processo.

O dimorfismo sexual é outra característica marcante dos peixes anuais, em que os machos são geralmente um pouco maiores que as fêmeas e exibem padrões de coloração mais brilhantes (LAUFER et al. 2009). Populações silvestres de peixes anuais apresentam razões sexuais femininas, com os machos desaparecendo geralmente mais rápido que as fêmeas ao longo do ciclo sazonal (LANÉS et al. 2016). A alta mortalidade (mortalidade extrínseca) de machos foi relacionada à predação por aves (REICHARD et al. 2018) devido as suas cores mais chamativas e maior tamanho corporal, e também a deterioração ambiental (LÁNES et al. 2016), que poderia indicar um envelhecimento específico do sexo, com uma senescência funcional mais rápida no sexo masculino (mortalidade intrínseca).

Os peixes anuais africanos habitam as áreas úmidas temporárias durante o período quente do ano (REICHARD, 2015), enquanto a vida dos peixes anuais neotropicais está confinada a períodos frios, com aumentos na temperatura da água somente no final do ciclo sazonal causando a mortalidade dos peixes mesmo antes da dessecação do habitat (LANÉS et al. 2016). Os indivíduos de ambos grupos de peixes anuais costumam serem os mais abundantes e conspícuos predadores de topo nas áreas úmidas, apresentando uma dieta oportunista e generalista composta principalmente por organismos autóctones (LAUFER et al., 2009; POLAČIK & REICHARD, 2010; GONÇALVES, SOUZA, VOLCAN, 2011; KEPPELER et al. 2015).

Em função das características de seu ciclo de vida, os peixes anuais são reconhecidos como excelentes modelos biológicos em estudos de laboratório (POLAČIK & REICHARD, 2010). As principais vantagens no seu uso como modelo biológico são: 1. facilidade da sua manutenção e reprodução em condições de laboratório; 2. curto ciclo de vida que permite respostas rápidas; 3. possibilidade de seus ovos serem estocados por vários meses, garantindo mesmo fora do período reprodutivo, estoques de exemplares de mesma origem (ARENZON, LEMOS, BOHRER, 2002; VOLCAN, GONÇALVES, 2009).

Além disso, trata-se de um modelo que apresentam uma distância filogenética muito menor em relação à nós seres humanos quando comparado com alguns invertebrados, organismos tradicionalmente utilizados. Neste sentido, essas espécies tem sido utilizadas em ensaios toxicológicos, que demonstraram que podem ser altamente sensíveis à toxinas (ARENZON et al., 2003) e em pesquisas sobre envelhecimento (VALDESALICI & CELLERINO, 2003; HERRERA & JAGADEESWARAN, 2004; GENADE et al., 2005; VALENZANO & CELLERINO, 2006; VALENZANO et al., 2006b; HSU et al., 2008; TERZIBAZI, VALENZANO,CELLERINO, 2007; GRAF, CELLERINO, ENGLERT, 2010). Trabalhos de envelhecimento tem demonstrado a presença de alterações histológicas em muitos tecidos relacionadas à idade, sendo estas observadas em outros vertebrados, inclusive humanos (LIU & WALFORD, 1966, 1969, 1970, 1972, 1975; MARKOFSKY & PERLMUTTER, 1972; MARKOFSKY, 1976; MARKOFSKY & MILSTOC, 1979a, 1979b; COOPER et al, 1983; GENADE et al. 2005; VALENZANO et al, 2006a; HSU et al. 2008; DI CICCIO et al. 2011; LIU et al. 2012; TOZZINI et al. 2013; LUCAS-SÁNCHEZ et al 2014; BAUMGART et al. 2015; CELLERINO, VALENZANO, REICHARD, 2016; HU & BRUNET, 2018).

No Rio Grande do Sul, os peixes anuais estão representados pelos gêneros *Austrolebias* Costa e *Cynopoecilus* Regan. O gênero *Austrolebias* é mais diverso (COSTA, 2008; FERRER, MALABARBA, COSTA, 2008; LOUREIRO & GARCÍA, 2008; LOUREIRO, DUARTE, ZARUCKI, 2011; NIELSEN & PILLET, 2015), com espécies distribuídas desde o sul da Bolívia, sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte e nordeste da Argentina (COSTA, 2010). A maior diversidade desse gênero se concentra no sul do Brasil e no Uruguai, onde várias espécies podem co-ocorrer numa mesma área úmida (COSTA, 2006; 2008; 2009). O gênero *Cynopoecilus* possui sete espécies, todas restritas ao sul do Brasil e Uruguai (FERRER, WINGERT, MALABARBA, 2014;

COSTA, AMORIM, MATTOS, 2017). Os embriões das espécies desses dois gêneros eclodem sincronicamente no outono austral e início do inverno (maio a julho) e durante o ciclo de vida sazonal, que termina no final da primavera (setembro/novembro), as populações apresentam declínios nas abundâncias e densidades e aumento gradual no tamanho corporal (LANÉS et al. 2016). A maioria dessas espécies estão ameaçadas de extinção, sendo que o principal fator de ameaça para essas espécies é a perda e alteração de habitat relacionada com a pressão humana, na qual a agricultura é a principal atividade causadora desse impacto (VOLCAN, LANÉS, CHEFFE, 2010). Só no bioma Pampa, uma das áreas com maior presença de espécies de peixes anuais (LANÉS et al. 2018), a agricultura, através das lavouras de arroz e soja, é a principal atividade responsável pelo desaparecimento de cerca de 90% das áreas úmidas da região (ROLON & MALTCHIK, 2006), refletindo em uma grande ameaça para os peixes anuais.

2.2 Espécies reativas de oxigênio e enzimas antioxidantes

Em 1956 Denham Harman propôs a teoria dos radicais livres afirmando que as espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas nas células conduziam a uma situação de estresse oxidativo, resultando em danos que levariam a declínio relacionados à idade nas funções biológicas e conseqüentemente no envelhecimento progressivo dos organismos (HARMAN, 1956; KIRKWOOD & AUSTAD, 2000). No entanto, estudos mais recentes mostram que as EROs funcionam como moléculas de sinalização essenciais para o organismo, estando envolvidas em diversos processos fisiológicos tanto aqueles pertinentes ao ciclo de vida como aqueles decorrentes de alterações ambientais, constituindo um fator importante na modulação do sistema imunológico, por exemplo, defesa contra agentes patogênicos, na modulação do sistema endócrino, na oxidação de agentes químicos exógenos e na regulação do equilíbrio oxidativo, atuando na redução do estresse oxidativo (APEL & HIRT, 2004; BARREIROS, DAVID, DAVID, 2006; DOWLING & SIMMONS; 2009; COSTANTINI, METCALFE, MONAGHAN, 2010; COSTANTINI, MONAGHAN, METCALFE, 2012).

O estresse oxidativo pode ser determinado como um desbalanço entre a produção/eliminação das EROs, em favor da sua produção que leva a uma ruptura da sinalização e balanço oxidativo e/ou dano molecular, podendo conduzir ao dano em macromoléculas e organelas celulares, como as mitocôndrias prejudicando assim, a

integridade e a funcionalidade celular. A exposição a baixos níveis de radicais livres, entretanto, pode reduzir o estresse oxidativo e regular positivamente as defesas antioxidantes através de respostas adaptativas que culmina na redução e no aumento da resistência ao estresse oxidativo, podendo até promover um maior tempo de vida (COSTANTINI, DELL'ARICCIA, LIPP, 2008; RADAK et al. 2008; COSTANTINI, METCALFE, MONAGHAN, 2010; COSTANTINI, MONAGHAN, METCALFE, 2012). Essa resposta a baixas doses de estresse oxidativo que induzem respostas adaptativas pode ocorrer através do fenômeno conhecido como hormese (COSTANTINI, METCALFE & MONAGHAN 2010; COSTANTINI, MONAGHAN, METCALFE, 2012; COSTANTINI, 2014; GLADYSHEV, 2014). Neste sentido, o estresse oxidativo pode ser dividido em (1) fisiológico ou eustresse (níveis baixos) sendo este, importante na sinalização e na regulação redox, enquanto a sobrecarga ou distresse (níveis elevados ou suprafisiológicos), conduziria a interrupção da sinalização e balanço oxidativo e/ou dano oxidativo a biomoléculas (SIES, 2018).

As EROs são derivadas de moléculas de oxigênio (O_2), sua produção ocorre principalmente na mitocôndria de forma contínua e equilibrada apresentando grande importância no sistema biológico do animal (DOWLING & SIMMONS, 2009; VASCONCELOS et al. 2007). Contudo, quando ocorre uma elevada produção de EROs e/ou uma diminuição das defesas antioxidantes, o organismo pode apresentar efeitos deletérios em diferentes moléculas como: lipídios, proteínas, DNA e RNA; este desequilíbrio pode conduzir a dano oxidativo (APEL & HIRT, 2004; BECKMAN & AMES, 1998; COSTANTINI, 2014). Dentre estes efeitos alguns podem ser quantificados e usados como marcadores do dano oxidativo, como a oxidação de proteínas, com a consequente formação de proteínas carboniladas e a peroxidação lipídica ou lipoperoxidação (LPO). Todos os componentes celulares são sensíveis à ação das EROs, contudo, a membrana plasmática é um dos mais afetados em função de sua composição lipídica.

Dentre os agentes oxidantes estão: Ânion Radical Superóxido (O_2^\bullet), Peróxido de Hidrogênio (H_2O_2) e Radical Hidroxila (OH^\bullet). 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 O_2^\bullet , reação catalisada por enzimas que se encontram principalmente nos peroxissomos. O Radical Hidroxila é conhecido como a mais reativa, lesiva e deletéria EROs ao organismo (BARREIROS,

DAVID, DAVID 2006; VASCONCELOS et al. 2007). Para combater as EROs, os organismos apresentam mecanismos de defesa antioxidantes que são classificados em enzimáticos e não enzimáticos (DOWLING & SIMMONS, 2009; HUGGET, 2018; VASCONCELOS et al. 2007). Segundo BARBOSA et al. (2010), esse sistema de defesa 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 Glutaciona Peroxidase (GPx). A SOD catalisa a dismutação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) convertendo em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2) (Figura 1) (APEL & HIRT, 2004; BARBOSA et al. 2010; DOWLING & SIMMONS, 2009; 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 (Figura 1) (APEL & HIRT, 2004; BARBOSA et al. 2010; VASCONCELOS et al. 2007). Já a GPX catalisa a redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e dos peróxidos orgânicos em moléculas menos reativas, utilizando a forma reduzida de glutaciona (GSH) para manter sua atividade (Figura 1) (COSTANTINI, 2014; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

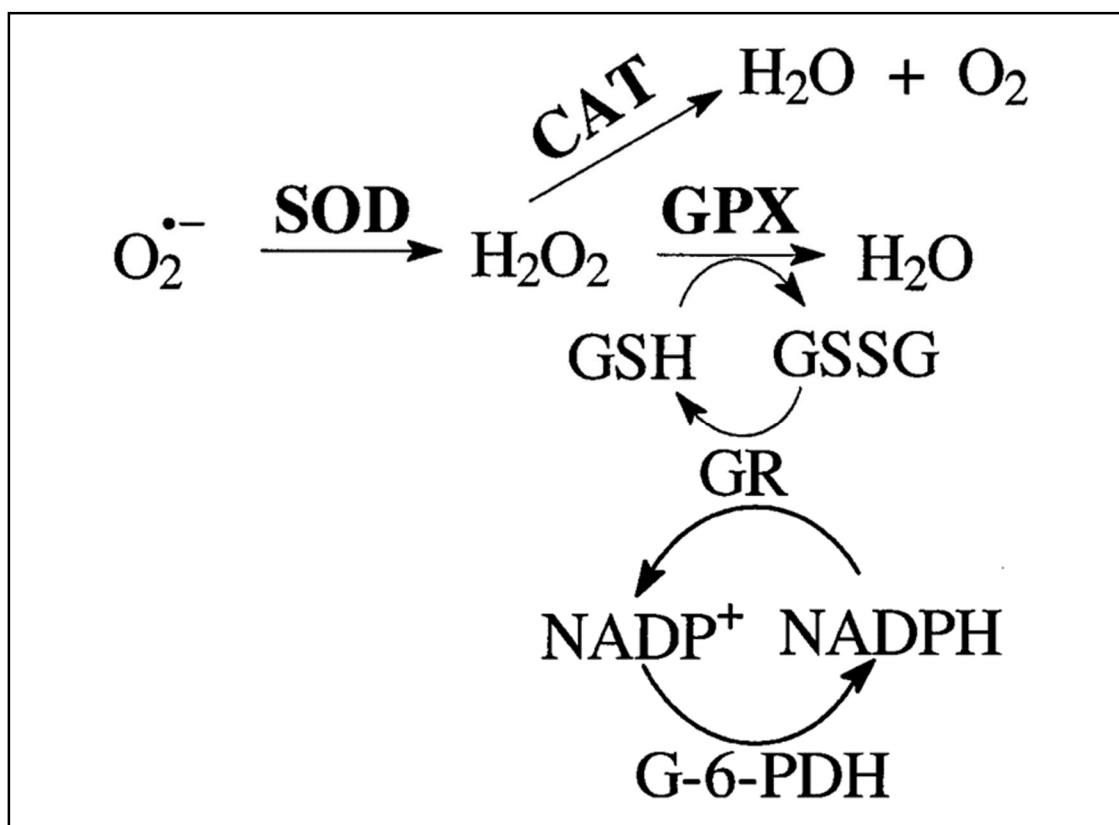


Figura 1 – Reação de transformação dos radicais livres pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase. Fonte: LI, S. 2000.

A biotransformação de metabólitos endógenos e exógenos também pode resultar na produção de espécies reativas de oxigênio e com isto, induzir as enzimas antioxidantes, alterar as concentrações dos antioxidantes não-enzimáticos e produzir lesões que são associadas ao estresse oxidativo. O processo de biotransformação conduz a aumento de polaridade e do tamanho de moléculas endo e xenobióticas, por meio de reações de oxidação (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 endo e xenobióticos, possuindo assim, um papel fundamental em mecanismos de biotransformação intracelular de compostos endo e xenobióticos. GSTs desempenham vários papéis fisiológicos, tais como sequestro e transporte de compostos hidrofóbicos endógenos, os quais incluem hormônios esteroides, heme, bilirrubinas, ácidos da bile e seus metabólitos (PINHEIRO & OLIVEIRA, 2016).

O processo de envelhecimento dos organismos tem sido relacionado com o estresse oxidativo (HARMAN, 1956; KIRKWOOD & AUSTAD 2000). Com o aumento da idade ocorrem declínios funcionais que levam a diminuição gradual da atividade de enzimas antioxidantes causando desequilíbrio entre a produção e a eliminação das EROs, podendo estar aliado a uma diminuição nos mecanismos de reparo dos danos, resultando na senescência dos organismos (SOHAL & WEINDRUCH, 1996; FINKEL & HOLBROOK, 2000). Estudos laboratoriais demonstraram que as EROs causam peroxidação lipídica e/ou oxidação protéica em diferentes modelos animais e que aumentos na peroxidação lipídica e/ou oxidação de proteínas aliado a uma diminuição da atividade das enzimas antioxidantes estão relacionadas com o aumento da idade (SOHAL & WEINDRUCH, 1996; HSU et al. 2008; LIU et al. 2012, 2015; DONG et al. 2017).

O estresse oxidativo também tem sido relacionado aos *trade-offs*, entre a alocação de energia para o estabelecimento das características da história de vida e da manutenção da vida (KIRKWOOD & HOLLIDAY, 1979; METCALFE & MONAGHAN 2003; WIERSMA et al. 2004; METCALFE & ALONSO-ALVAREZ 2010; SPEAKMAN & GARRATT 2014; SMITH, NAGER, COSTANTINI, 2016). Os investimento em

crescimento rápido e na reprodução diminuem a capacidade dos indivíduo de investir em mecanismos de automanutenção (WANG, SALMON, HARSHMAN, 2001; ALONSO-ALVAREZ et al . 2004; WIERSMA et al. 2004; ALONSO-ALVAREZ et al. 2007; DE BLOCK & STOKS, 2008; COSTANTINI 2008; SPEAKMAN, 2008; MONAGHAN et al. 2009; NUSSEY et al. 2009; METCALFE & ALONSO-ALVAREZ 2010; HŐRAK e COHEN 2010), como produção de enzimas antioxidantes, causando ruptura do balanço oxidativo e consequentemente estresse oxidativo nos organismos. Investimentos nessas características são relacionados a declínios mais rápidos com o aumento da idade nas funções biológicas, resultando no envelhecimento precoce dos organismos (WANG, SALMON, HARSHMAN, 2001; ALONSO-ALVAREZ et al . 2004, 2007; WIERSMA et al.. 2004; DE BLOCK & STOKS, 2008; COSTANTINI, 2008; MONAGHAN, METCALFE, TORRES, 2009; METCALFE & ALONSO-ALVAREZ 2010). Pesquisadores têm argumentado que o aumento do investimento em alguma dessas características, resulta em taxas metabólicas elevadas e, aumento da produção de EROS, que, se não for acompanhada por uma a regulação das defesas antioxidantes, irá resultar em elevado estresse oxidativo (ALONSO-ALVAREZ et al. 2004; COSTANTINI, 2008; MONAGHAN, METCALFE, TORRES, 2009) e envelhecimento (SELMAN et al. 2012).

O crescimento constitui o ganho de massa corporal com o aumento da idade devido principalmente a síntese proteica (VAN DER HAVE & DE JONG, 1996), sendo considerado período crítico da vida na maioria dos organismos. Estudos sugerem que a alocação de energia para o desenvolvimento do corpo no início da vida é relacionado a um rápido envelhecimento (LEE, MONAGHAN, METCALFE, 2013) e que altas taxas de crescimento são relacionadas ao estresse oxidativo (ROLLO, CARLSON, SAWADA, 1996; FARRELL, BENNETT, DEVLIN, 1997; MORGAN, MCCARTHY, METCALFE, 2000; BROWN-BROG & RAKOCZY, 2003, FORSÉN et al. 2004; ALONSO-ALVAREZ et al. 2007; NUSSEY et al. 2009; STIER et al. 2014a; STIER et al. 2014b; STIER, et al. 2014c). Crescimento rápido resulta em benefícios para os indivíduos, que atingem tamanhos maiores, tem maior qualidade intrínseca, maior resistência reprodutiva, alcançam maior sucesso reprodutivo e reduzem o risco de predação (ANDERSSON, 1994; METCALFE & MONAGHAN, 2003; GUIMARÃES et al. 2017). No entanto, tem sido relatado que um dos ônus do aumento da taxa crescimento é o incremento do estresse oxidativo (ALONSO-ALVAREZ et al. 2007; DE BLOCK & STOKS 2008).

Variações no estresse oxidativo, durante o ciclo de vida adulto do animal, relacionadas ao período reprodutivo ocorrem devido ao fato que o animal necessita de um maior investimento energético nesse período, alocando assim muitas vezes, suas reservas tanto em fêmeas como em machos para serem utilizados na sustentação do processo reprodutivo em detrimento de automanutenção (BRAGHIROLI, OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2016; PINHEIRO & OLIVEIRA, 2016). Devido a essa mobilização e uso das reservas energéticas na reprodução ocorre o aumento do metabolismo aeróbio, maior produção de EROs nem sempre acompanhada de um incremento das enzimas antioxidantes, aumentando assim o estresse oxidativo (ANGILLETTA & SEARS, 2000). Durante o pico reprodutivo, por exemplo, é comum à observação de um aumento nos níveis de peroxidação lipídica em diferentes órgãos dos animais (OLIVEIRA, 2015; PINHEIRO & OLIVEIRA, 2016; BRAGHIROLI, OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2016).

Além disso, estressores ambientais também podem resultar em modulação do balanço oxidativo, incremento da lipoperoxidação sendo acompanhadas por outras estratégias bioquímicas e fisiológicas do animal que conduzem a uma resposta adaptativa às variações do meio (LUSHCHAK, 2011; BRAGHIROLI, OLIVEIRA, OLIVEIRA, 2016; HURYN, BENSTEAD, PARKER, 2014; PINHEIRO & OLIVEIRA, 2016). A dissecação dos ambientes aquáticos temporários, por exemplo, causa estresse de tempo, impondo que os organismos completem seu ciclo de vida antes que as condições se deteriorem (NYLIN & GOTTHARD, 1998; GRÉGOIR et al. 2017). Essa situação pode causar desenvolvimento mais rápido e alterar características ambientais aumentando o estresse oxidativo nos organismos (STIER et al. 2014a; STIER et al. 2014b; STIER, et al. 2014c). As variações da temperatura e do oxigênio, são características ambientais que causam estresse oxidativo em animais (LUSHCHAK, 2011; BIRNIE-GAUVIN et al. 2017; MILINKOVITCH et al. 2018). O risco de predação também é considerado como causador de estresse oxidativo (JANSSENS & STOKS, 2013). Além disso, a densidade populacional pode ter um papel importante no estresse oxidativo, visto que influencia a disponibilidade de recursos, crescimento e mortalidade (HIXON & JONES, 2005; LOBÓN-CERVIÁ, 2012). No entanto, efeito dessas e de outras características ambientais na modulação do balanço oxidativo ainda carece de informações.

Levando em consideração que os peixes anuais apresentam altos investimentos nas características de vida, como crescimento e reprodução, e habitam áreas úmidas temporárias que apresentam grandes variações ambientais é de grande interesse investigar

a variação do balanço oxidativo ao longo do seu ciclo de vida. Além disso, se faz necessário um estudo relacionado ao balanço oxidativo utilizando peixes anuais neotropicais, visto que estes são inexistentes, sendo os estudos sobre esse tema realizados exclusivamente com peixes anuais africanos.

3 Referências

- ALONSO-ALVAREZ, C., BERTRAND, S., DEVEVEY, G., PROST, J., FAIVRE, B., & SORCI, G. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. **Ecology Letters**, 7(5), 363-368, 2004.
- ALONSO-ALVAREZ, C., BERTRAND, S., FAIVRE, B., & SORCI, G. Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. **Functional Ecology**, 21(5), 873-879, 2007.
- ANDERSSON MB. **Sexual Selection**. Princeton: Princeton University Press, 1994.
- ANGILLETTA, M. J.; SEARS, M. W. The metabolic cost of reproduction in an oviparous lizard. *Functional Ecology*, v. 14, n. 1, p. 39-45, 2000.
- 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**, 62(4B), 743-747, 2002.
- 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 Rio Grande do Sul State, Brazil (Cyprinodontiformes, Rivulidae). *Revista Brasileira de Biologia*, 61(1), 117-123, 2001.
- ARENZON, A., PERET, A. C. & BOHRER, M. B. C. Reproduction of the annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body population in Rio Grande do Sul State, Brazil. **Hydrobiologia**, 411: 65-70, 1999.
- ARENZON, A., PINTO, R., COLOMBO, P., & RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Assessment of the freshwater annual fish *Cynopoecilus melanotaenia* as a toxicity test organism using three reference substances. **Environmental toxicology and chemistry**, 22(9), 2188-2190, 2003.
- BARBOSA, K. B. F., COSTA, N. M. B., ALFENAS, R. D. C. G., DE PAULA, S. O., MINIM, V. P. R., & BRESSAN, J. 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**, 29(1):113–23, 2006.
- BAUMGART, M.; DI CICCIO, E.; ROSSI, G.; CELLERINO, A.; TOZZINI, E.T. Comparison of captive lifespan, age-associated liver neoplasias and agedependent gene expression between two annual fish species: *nothobranchius furzeri* and *Nothobranchius korthause*. **Biogerontology**, v.16, p.63-69, 2015.
- BECKMAN, K. B., AMES, B. N. The free radical theory of aging matures. *Physiological reviews*, 78(2), 547-581, 1998.

- BEROIS, N., AREZO, M. J., & DE SÁ, R. O. The Neotropical genus *Austrolebias*: an emerging model of annual killifishes. **Cell & Developmental Biology**, 3(2), 1000136, 2014.
- BIRNIE-GAUVIN, K., COSTANTINI, D., COOKE, S. J., & WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. **Fish and Fisheries**, 18(5), 928-942, 2017.
- BLAŽEK R., POLAČIK M., REICHARD M. Rapid growth, early maturation and short generation time in African annual fishes. **EvoDevo**, 4, 24, 2013.
- 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**, 130, 177-184, 2016.
- BROWN-BORG, H.M. & RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. *Mechanisms of Ageing and Development* 124, 1013–1024, 2003.
- CELLERINO, A., VALENZANO, D. R., & REICHARD, M. From the bush to the bench: the annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. **Biological Reviews**, 91(2), 511-533, 2016.
- COOPER, E. L., ZAPATA, A., BARRUTIA, M. G., & RAMIREZ, J. A. (1983). Aging changes in lymphopoietic and myelopoietic organs of the annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. *Experimental gerontology*, 18(1), 29-38.
- COSTA, W. J. Trophic radiation in the South American annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, 20(2), 179, 2009.
- COSTA, W. J. E. M. Phylogeny and classification of Rivulidae revisited: origin and evolution of annualism and miniaturization in rivulid fishes (Cyprinodontiformes: Aplocheiloidei). **Journal of Comparative Biology**, 3(1), 33-92, 1998.
- COSTA, W. J. E. M. **Peixes Anuais Brasileiros: Diversidade e Conservação**. Curitiba, ed. UFPR, 2002.
- COSTA, W. J., AMORIM, P. F., & MATTOS, J. L. O.. Molecular phylogeny and timing of diversification in South American Cynolebiini seasonal killifishes. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 116, 61-68, 2017.
- COSTA, W.J.E.M. The South American annual killifish genus *Austrolebias* (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships, descriptive morphology and taxonomic revision. **Zootaxa** 1213: 1–162, 2006.
- COSTA, W.J.E.M. **Catalog of aplocheiloid killifishes of the world**. Rio de Janeiro, Reproarte, 120 p. 2008.
- COSTA, W.J.E.M.. Historical biogeography of Cynolebiasine annual killifishes inferred from dispersal-vicariance analysis. **Journal of Biogeography** 37 (10): 1995-2004, 2010.
- COSTANTINI, D. Does hormesis foster organism resistance to extreme events?. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 12(4), 209-210, 2014.

- COSTANTINI, D. Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology letters*, v. 11, n. 11, p. 1238-1251, 2008.
- COSTANTINI, D., DELL'ARICCIA, G. & LIPP, H.-P. Long flights and age affect oxidative status of homing pigeons (*Columba livia*). *J. Exp. Biol.*, 211, 377–381, 2008.
- COSTANTINI, D., METCALFE, N.B., MONAGHAN, P. Ecological processes in a hormetic framework. *Ecology Letters*, v. 13, n. 11, p. 1435-1447, 2010.
- COSTANTINI, D., MONAGHAN, P., METCALFE, N.B. Early life experience primes resistance to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology*, v. 215, n. 16, p. 2820-2826, 2012.
- DE BLOCK, M., STOKS, R. Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 275, n. 1636, p. 781-785, 2008.
- DI CICCIO, E., TOZZINI, E.T., ROSSI, G., CELLERINO, A. 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, p.249-256, 2011.
- DONG, Y., CUI, P., LI, Z., & ZHANG, S. Aging asymmetry: systematic survey of changes in age-related biomarkers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Fish physiology and biochemistry*, 43(2), 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
- ERREA, A., & DANULAT, E. (2001). Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius* (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions. *Environmental Biology of Fishes*, 61(3), 261-268. doi: 10.1007/BF00001480, 2001.
- FARRELL, A.P., BENNETT, W. & DEVLIN, R.H. Growth-enhanced transgenic salmon can be inferior swimmers. **Canadian Journal of Zoology** 75, 335–337, 1997.
- 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.
- FERRER, J., MALABARBA, L. R., COSTA, W. J. *Austrolebias paucisquama* (Cyprinodontiformes: Rivulidae), a new species of annual killifish from southern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, 6(2), 175-180, 2008.
- FERRER, J., WINGERT, J. M., & MALABARBA, L. R. Description of a new species and phylogenetic analysis of the subtribe Cynopoecilina, including continuous characters without discretization (Cyprinodontiformes: Rivulidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, 172(4), 846-866, 2014.
- FINKEL, T., HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239, 2000.

- FORSÉN, T., OSMOND, C., ERIKSSON, J.G. & BARKER, D.J.P. Growth of girls who latter develop coronary heart disease. **Heart** 90, 20–24, 2004.
- FURNESS, A. I., LEE, K., & REZNICK, D. N. Adaptation in a variable environment: Phenotypic plasticity and bet-hedging during egg diapause and hatching in an annual killifish. **Evolution**, 69(6), 1461-1475, 2015.
- FURNESS, A I. The evolution of an annual life cycle in killifish: adaptation to ephemeral aquatic environments through embryonic diapause. *Biological Reviews*, v. 91, n. 3, p. 796-812, 2016.
- GENADE, T., BENEDETTI, M., TERZIBASI, E., RONCAGLIA, P., VALENZANO, D. R., CATTANEO, A., & CELLERINO, A. Annual fishes of the genus *Nothobranchius* as a model system for aging research. **Aging cell**, 4(5), 223-233, 2005.
- GLADYSHEV, V. N. The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the Damage Theory. *Antioxid Redox Signal*. 20(4): 727–731, 2014.
- GONÇALVES, C.S; SOUZA, U. P. & VOLCAN, M. V. The opportunistic feeding and reproduction strategies of the annual fish *Cynopoeilus melanotaenia* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern Brazil. **Neotropical Ichthyology** 9 (1) 191-200, 2011.
- GRAF, M., CELLERINO, A., & ENGLERT, C. Gender separation increases somatic growth in females but does not affect lifespan in *Nothobranchius furzeri*. **PLoS One**, 5(8), e11958, 2010.
- GRÉGOIR, A. F., PHILIPPE, C., PINCEEL, T., RENIERS, J., THORÉ, E. S. J., VANSCHOENWINKEL, B., & BRENDONCK, L. Life stage dependent responses to desiccation risk in the annual killifish *Nothobranchius wattersi*. **Journal of fish biology**, 91(3), 880-895, 2017.
- GRÉGOIR, A. F., THORÉ, E. S. J., PHILIPPE, C., PINCEEL, T., BRENDONCK, L., & VANSCHOENWINKEL, B. Squeezing out the last egg—annual fish increase reproductive efforts in response to a predation threat. **Ecology and evolution**, 8(13), 6390-6398, 2018.
- GUIMARÃES M, MUNGUÍA-STEYER R, DOHERTY PF, JR, SAWAYA RJ. No survival costs for sexually selected traits in a polygynous non-territorial lizard. **Biological Journal of the Linnean Society** 122: 614–626, 2017.
- HARMAN D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. **Journal of Gerontology**.11(3):298–300, 1956.
- HERRERA M, JAGADEESWARAN P. Annual fish as a genetic model for aging. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**. 59, 101–107, 2004.
- HIXON, M. A., & JONES, G. P. Competition, predation, and density-dependent mortality in demersal marine fishes. **Ecology**, 86(11), 2847-2859, 2005.
- HÕRAK, PEETER; COHEN, Alan. How to measure oxidative stress in an ecological context: methodological and statistical issues. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 960-970, 2010.

- HRBEK, T., & LARSON, A. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): a molecular phylogenetic and biogeographic perspective. **Evolution**, 53(4), 1200-1216, 1999.
- HSU, C. Y., & CHIU, Y. C. Ambient temperature influences aging in an annual fish (Nothobranchius rachovii). **Aging cell**, 8(6), 726-737, 2009.
- HSU, C. Y., CHIU, Y. C., HSU, W. L., & CHAN, Y. P. Age-related markers assayed at different developmental stages of the annual fish Nothobranchius rachovii. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, 63(12), 1267-1276, 2008.
- HU, C-K.; BRUNET, A. The African turquoise killifish: A research organism to study vertebrate aging and diapause. **Aging cell**, v. 17, n. 3, p. e12757, 2018.
- HUGGETT, Robert J. Biomarkers: biochemical, physiological, and histological markers of anthropogenic stress. CRC Press, 2018.
- HURYN, A. D.; BENSTEAD, J. P.; PARKER, S. M. Seasonal changes in light availability modify the temperature dependence of ecosystem metabolism in an arctic stream. **Ecology**, v. 95, n. 10, p. 2826-2839, 2014.
- JANSSENS, L., STOKS, R. Predation risk causes oxidative damage in prey. **Biology Letters**, v. 9, n. 4, p. 20130350, 2013.
- KEPPELER, F. W., LANÉS, L. E. K., ROLON, A. S., STENERT, C., LEHMANN, P., REICHARD, M., & MALTCHIK, L. The morphology–diet relationship and its role in the coexistence of two species of annual fishes. *Ecology of Freshwater Fish*, 24(1), 77-90, 2015.
- KIRKWOOD, T. B.L; AUSTAD, S. N. Why do we age?. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 233, 2000.
- KIRKWOOD, T.B.L; HOLLIDAY, R. The evolution of ageing and longevity **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, v. 205, n. 1161, p. 531-546, 1979.
- LANÉS, L. E. K., GODOY, R. S., MALTCHIK, L., POLAČIK, M., BLAŽEK, R., VRTÍLEK, M., & REICHARD, M. Seasonal dynamics in community structure, abundance, body size and sex ratio in two species of Neotropical annual fishes. **Journal of fish biology**, 89(5), 2345-2364, 2016.
- LANÉS, L. E. K., REICHARD, M., DE MOURA, R. G., GODOY, R. S., & MALTCHIK, L. Environmental predictors for annual fish assemblages in subtropical grasslands of South America: the role of landscape and habitat characteristics. **Environmental Biology of Fishes**, 101(6), 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, p. 1971-1988, 2014.
- LAUFER, G., ARIM, M., LOUREIRO, M., PIÑERO-GUERRA, J. M., CLAVIJO-BAQUET, S. & FAGÚNDEZ, C. Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific comparison. **Neotropical Ichthyology** 7: 77–86, 2009.

- LEE W.S, MONAGHAN P, METCALFE NB. Experimental demonstration of the growth rate-lifespan trade-off. **Proceedings of the Royal Society of London B**. 280: 20122370, 2013.
- LI, S., YAN, T., YANG, J. Q., OBERLEY, T. D., & OBERLEY, L. W. The role of cellular glutathione peroxidase redox regulation in the suppression of tumor cell growth by manganese superoxide dismutase. *Cancer research*, 60(14), 3927-3939, 2000.
- LIU, C.; WANG, X.; FENG, W.; LI, G.; SU, F.; ZHANG, S. Differential expression of aging biomarkers at different life stages of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Biogerontology**, v.13, p.501–510, 2012.
- LIU, R. K.; WALFORD, R. L. Increased growth and life-span with lowered ambient temperature in the annual fish, *Cynolebias adloffii*. **Nature**, v. 212, p. 1277-1278, 1966.
- LIU, R.K.; WALFORD, R.L. Laboratory studies on life-span, growth, aging, and pathology of the annual fish, *Cynolebias bellottii*. **Zoological New Yourl Society**, v. 54, p.1-19, 1969.
- LIU, R.K.; WALFORD, R.L. Mid-life temperature-transfer effects on life-span of annual fish. **Journal of Gerontology**, v.30, p.129–131, 1975.
- LIU, R.K.; WALFORD, R.L. Observations on the lifespans of several species of annual fishes and of the world's smallest fishes. *Experimental Gerontology*, v.5, p.241–246, 1970.
- LIU, R.K.; WALFORD, R.L. The effect of lowered body temperature on lifespan and immune and non-immune processes. **Gerontologia**, v.18, p.363–388, 1972.
- LIU, T., QI, H., MA, L., LIU, Z., FU, H., ZHU, W., SONG, T., YANG, B., & LI, G. Resveratrol attenuates oxidative stress and extends life span in the annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Rejuvenation research**, 18(3), 225-233, 2015
- LOBÓN-CERVIÁ, JAVIER. Density-dependent mortality in adults, but not juveniles, of stream-resident brown trout (*Salmo trutta*). **Freshwater Biology**, v. 57, n. 10, p. 2181-2189, 2012.
- LOUREIRO M, DE SÁ RO. **Diversity of Aplocheiloidei**. In: Berois N, García G, de Sá RO (ed) *Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution*, 1st edn. Press Taylor & Francis group, Boca Raton, pp 3–31, 2015.
- LOUREIRO, M. & GARCÍA, G. *Austrolebias reicherti* Loureiro & García, a valid species of annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from Uruguay. **Zootaxa** 1940: 1-15, 2008.
- LOUREIRO, M., DUARTE, A. & ZARUCKI, M. A new species of *Austrolebias* Costa (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from northeastern Uruguay, with comments on distribution patterns. **Neotropical Ichthyology** 9 (2): 335-342, 2011.
- LUCAS-SANCHÉZ, A.; ALMAIADA-PAGÁN, P.F.; MENDIOLA, P.; COSTA, J. *Nothobranchius* as a model for aging studies. A review. **Aging and Disease**, v.5, p.281 291, 2014.

- LUSHCHAK, V. I. Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. **Aquatic toxicology**, v. 101, n. 1, p. 13-30, 2011.
- MARKOFSKY, J. Longitudinal and cross-sectional observations of growth and body composition with age in laboratory populations of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. **Experimental Gerontology**, v.11, p.171–177, 1976
- MARKOFSKY, J.; MILSTOC, M. Aging changes in the liver of the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. **Experimental Gerontology**, v.14, p.11-20, 1979a.
- MARKOFSKY, J.; MILSTOC, M. Histopathological observations of the kidney during aging of the male annual fish *Nothobranchius guentheri*. **Experimental Gerontology**, v.14, p.149-155, 1979b.
- MARKOFSKY, J.; PERLMUTTER, A. Age at sexual maturity and its relationship to longevity in the male annual cyprinodont fish, *Nothobranchius guentheri*. **Experimental Gerontology**, v.7 p.131-135, 1972.
- METCALFE, N.B.; ALONSO-ALVAREZ, C. Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. **Functional Ecology**, v. 24, n. 5, p. 984-996, 2010
- METCALFE, N.B.; MONAGHAN, P. Growth versus lifespan: perspectives from evolutionary ecology. **Experimental gerontology**, v. 38, n. 9, p. 935-940, 2003.
- MILINKOVITCH, T., LEFRANÇOIS, C., DUROLLET, M., & THOMAS-GUYON, H. Influence of temperature on age-related lipid peroxidation in a short-lived vertebrate (*Nothobranchius furzeri*). *Fish physiology and biochemistry*, 44(1), 343-347, 2018.
- MONAGHAN, P; METCALFE, N,B.; TORRES, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. **Ecology letters**, v. 12, n. 1, p. 75-92, 2009
- MORGAN, I.J., MCCARTHY, I.D. & METCALFE, N.B. Life-history strategies and protein metabolism in overwintering juvenile Atlantic salmon: growth is enhanced in early migrants through lower protein turnover. **Journal of Fish Biology** 56, 637–647, 2000.
- NIELSEN, D.T.B.; PILLET, D. *Austrolebias accorsii*, a new annual fish (Cyprinodontiformes: Rivulidae: Cynolebiatinae) from the upper río Grande basin, Amazon basin, Bolivia. *Aqua*, **International Journal of Ichthyology**. v. 21, p.172-179, 2015.
- NUSSEY, D. H., PEMBERTON, J. M., PILKINGTON, J. G., & BLOUNT, J. D. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. **Functional Ecology**, 23(4), 809-817, 2009.
- NYLIN, S.; GOTTHARD, K. Plasticity in life-history traits. **Annual review of entomology**, v. 43, n. 1, p. 63-83, 1998.
- OLIVEIRA, M. R. **Efeitos da variação sazonal sobre o metabolismo intermediário e o status oxidativo de *Tropidurus catalanensis* (Squamata, Tropiduridae).**

97p. Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, 2015.

- 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. & HAND, S. The bioenergetics of embryonic diapause in annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. **Journal of Experimental Biology** 202, 2567–2580, 1999.
- PODRABSKY, J. E., GARRETT, I. D. & KOHL, Z. F. Alternative developmental pathways associated with diapause regulated by temperature and maternal influences in embryos of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. **Journal of Experimental Biology** 213, 3280–3288, 2010.
- PODRABSKY, J. E.; RIGGS, C. L.; ROMNEY, A. L.; WOLL, S. C.; WAGNER, J. T.; CULPEPPER, K. M.; & CLEAVER, T. G. Embryonic development of the annual killifish *Austrofundulus limnaeus*: An emerging model for ecological and evolutionary developmental biology research and instruction. *Developmental Dynamics*, v. 246, n. 11, p. 779-801, 2017.
- POLAČIK M., BLAŽEK R., ŘEŽUCHA R., VRTÍLEK M., TERZIBASI TOZZINI E., REICHARD M. Alternative intrapopulation life-history strategies and their trade-offs in an African annual fish. **Journal of Evolutionary Biology**, 27, 854-865, 2014.
- POLAČIK M., REICHARD M. Diet overlap among three sympatric African annual killifish species (*Nothobranchius* spp.) from Mozambique. **Journal of Fish Biology**, 77, 754-768, 2010.
- POLAČIK, M; PODRABSKY, J. **Temporary environments**. In: *Extremophile fishes*. Springer, Cham., p. 217-245, 2015.
- PRI-TAL, B. M., BLUE, S., PAUB, F. K.-Y. & PODRABSKY, J. E. Hormonal components of altered developmental pathways in the annual killifish, *Austrofundulus limnaeus*. **General and Comparative Endocrinology** 174, 166–174, 2011.
- RADAK, Z., CHUNG, H.Y., KOLTAI, E., TAYLOR, A.W. & GOTO, S. Exercise, oxidative stress and hormesis. *Ageing Res. Rev.*, 7, 34–42, 2008.
- REICHARD M. **The evolutionary ecology of African annual fishes**. In: Berois N., García G., de Sá R. (eds) . *Annual Fishes: Life History Strategy, Diversity, and Evolution*, CRC Press, pp. 133-158, 2015.
- REICHARD M., BLAŽEK R., POLAČIK M., VRTÍLEK M. Hatching date variability in wild populations of four coexisting species of African annual fishes. **Developmental Dynamics**, 246, 827-837, 2017.
- REICHARD, M., LANÉS, L. E., POLAČIK, M., BLAŽEK, R., VRTÍLEK, M., GODOY, R. S., & MALTCHIK, L. Avian predation mediates size-specific survival in a Neotropical annual fish: a field experiment. **Biological Journal of the Linnean Society**, 124(1), 56-66, 2018.

- REICHARD, M.; POLACIK, M.; SEDLACEK, O. Distribution, colour polymorphism and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with the shortest life span. **Journal Fish Biology**, v.74, p.198-212, 2009.
- ROLLO, C.D., CARLSON, J. & SAWADA, M. Accelerated aging of giant mice is associated with elevated free radical processes. **Canadian Journal of Zoology** 74, 606–620, 1996.
- ROLON, A. S., & MALTCHIK, L. Environmental factors as predictors of aquatic macrophyte richness and composition in wetlands of southern Brazil. **Hydrobiologia**, 556(1), 221-231, 2006.
- SELMAN, C., MCLAREN, J.S., COLLINS, A.R., DUTHIE, G.G. & SPEAKMAN, J.R. The impact of experimentally elevated energy expenditure on oxidative stress and lifespan in the short-tailed field vole *Microtus agrestis*. **Proceedings of the Royal Society B – Biological Sciences**, 275, 1907–1916, 2008.
- SIES, H. On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current development. *Current Opinion in Toxicology* 2018, 7:122–126, 2018.
- SMITH, S. M., NAGER, R. G., & COSTANTINI, D. Meta-analysis indicates that oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecology and evolution*, 6(9), 2833-2842, 2016.
- SOHAL, S.; WEINDRUCH, R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. **Science**, v. 273, n. 5271, p. 59-63, 1996.
- SPEAKMAN, J. R., & GARRATT, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond the simplistic trade-off model. *Bioessays*, 36(1), 93-106.
- SPEAKMAN, J. R. The physiological costs of reproduction in small mammals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, v. 363, n. 1490, p. 375-398, 2008
- STEARNS, S.C. The evolution of life histories. Oxford: Oxford University Press. 249 pp, 1992.
- STIER, A., BIZE, P., ROUSSEL, D., SCHULL, Q., MASSEMIN, S., & CRISCUOLO, F. Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: An experimental study in the zebra finch. **Journal of Experimental Biology**, 217, 3579–3589. <https://doi.org/10.1242/jeb.103945>, 2014a.
- STIER, A., DELESTRADE, A., ZAHN, S., ARRIVÉ, M., CRISCUOLO, F., & MASSEMIN-CHALET, S. Elevation impacts the balance between growth and oxidative stress in coal tits. **Oecologia**, 175, 791–800. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-2>, 2014.b
- STIER, A., VIBLANC, V.A., MASSEMIN-CHALLET, S., HANDRICH, Y., ZAHN, S., ROJAS, E.R., CRISCUOLO, F. Starting with a handicap: Phenotypic differences between early- and late-born king penguin chicks and their survival correlates. **Functional Ecology**, 28, 601–611. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12204>, 2014c.
- TERZIBASI, E., LEFRANÇOIS, C., DOMENICI, P., HARTMANN, N., GRAF, M., & CELLERINO, A. Effects of dietary restriction on mortality and age-related

- phenotypes in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. **Aging cell**, 8(2), 88-99, 2009.
- TERZIBASI, E., VALENZANO, D. R., & CELLERINO, A. The short-lived fish *Nothobranchius furzeri* as a new model system for aging studies. **Experimental gerontology**, 42(1-2), 81-89, 2007.
- TOZZINI, T.E.; DORN, .A.; NG'OMA, E.; POLACIK, M.; BLAZEC, R.; REICHWALD, K.; PETZOLD, A.; WATTERS, B.; REICHARD, M. CELLERINO, A. Parallel evolution of senescence in annual fishes in response to extrinsic mortality. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, p.77, 2013.
- VALDESALICI, S., & CELLERINO, A. Extremely short lifespan in the annual fish *Nothobranchius furzeri*. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**. 270(Suppl 2), S189-S191, 2003.
- VALENZANO, D. R., & CELLERINO, A. Resveratrol and the pharmacology of aging: a new vertebrate model to validate an old molecule. *Cell Cycle*, 5(10), 1027-1032, 2006.
- VALENZANO, D. R., TERZIBASI, E., CATTANEO, A., DOMENICI, L., & CELLERINO, A. Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. **Aging cell**, 5(3), 275-278, 2006b
- VALENZANO, D. R., TERZIBASI, E., GENADE, T., CATTANEO, A., DOMENICI, L., & CELLERINO, A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. **Current Biology**, 16(3), 296-300, 2006a.
- VAN DER HAVE, T. M., & DE JONG, G. Adult size in ectotherms: temperature effects on growth and differentiation. **Journal of theoretical biology**, 183(3), 329-340, 1996.
- VASCONCELOS, S. M. L., GOULART, M. O. F., MOURA, J. B. D. F., MANFREDINI, V., BENFATO, M. D. S., & KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, 2007.
- VAZ-FERREIRA, R. A. U. L., SIERRA, B., & SCAGLIA, S. Eco-etología de la reproducción en los peces del género *Cynolebias* Steindachner, 1876. Apartados de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo, 26, 44-49, 1964.
- VRTÍLEK M., REICHARD M. Highly plastic resource allocation to growth and reproduction in females of an African annual fish. **Ecology of Freshwater Fish**, 24, 616-628, 2015.
- VRTÍLEK M., ŽÁK J., POLAČIK M., BLAŽEK R., REICHARD M. Longitudinal demographic study of wild populations of African annual killifish. **Scientific Reports**, 8, 4774, 2018a.
- VRTÍLEK M., ŽÁK J., PŠENIČKA M., REICHARD M. Extremely rapid maturation of a wild African annual fish. **Current Biology**, 28, R822-R824, 2018b.
- VOLCAN, M. V., FONSECA, A. P. D., FIGUEIREDO, M. R. C., SAMPAIO, L. A., & ROBALDO, R. B. Effect of temperature on growth of the threatened annual fish

- Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. *Biota Neotropica*, 12(4), 68-73, 2012.
- VOLCAN, M. V., GONÇALVES, Â. C., & GUADAGNIN, D. L. Body size and population dynamics of annual fishes from temporary wetlands in Southern Brazil. *Hydrobiologia*, 827(1), 367-378, 2018.
- VOLCAN, M. V., LANÉS, L. E. K., & CHEFFE, M. M. Distribuição e conservação de peixes anuais (Cyprinodontiformes: Rivulidae) no município do Chuí, sul do Brasil. *Biotemas*, 23(4), 51-58, 2010.
- VOLCAN, M. V., LANÉS, L. E. K., & GONÇALVES, Â. C. Threatened fishes of the world: *Austrolebias nigrofasciatus* Costa and Cheffe 2001 (Cyprinodontiformes: Rivulidae). *Environmental Biology of Fishes*, 86(3), 443-444, 2009.
- WANG, Y., SALMON, A. B., & HARSHMAN, L. G. A cost of reproduction: oxidative stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila melanogaster*. **Experimental gerontology**, 36(8), 1349-1359, 2001.
- WIERSMA, P., SELMAN, C., SPEAKMAN, J. R., & VERHULST, S. Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. **Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences**, 271(Suppl 5), S360-S363, 2004.
- WOURMS, J. P. The developmental biology of annual fishes III. Pre-embryonic and embryonic diapause of variable duration in the eggs of annual fishes. **Journal of Experimental Zoology**. 182, 389-414, 1972.

4 CAPÍTULO II – ARTIGO CIENTÍFICO

1 VARIÇÃO SAZONAL E PREDITORES AMBIENTAIS DO BALANÇO
2 OXIDATIVO EM UM PEIXE ANUAL NEOTROPICAL

3

4 ROBSON S. GODOY¹, LUÍS ESTEBAN K. LANÉS², BRUNA D. CASTRO², VINICIUS
5 WEBER¹, NÁTALIA WINGER², CRISTINA STENERT¹, GUENDALINA TURCATO
6 OLIVEIRA² & LEONARDO MALTCHIK¹.

7

8 ¹ Laboratório de Ecologia e Conservação de Ecossistemas Aquáticos, Programa de Pós-
9 Graduação em Biologia: Diversidade e Manejo de Vida Silvestre, Universidade do Vale
10 do Rio dos Sinos (UNISINOS), Bairro Cristo Rei, São Leopoldo, Rio Grande do Sul,
11 Brasil.

12 ² Laboratório de Fisiologia da Conservação, Programa de Pós Graduação em Ecologia e
13 Evolução da Biodiversidade, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
14 (PUCRS), Avenida Ipiranga, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

15

16

17

18

19

20 Palavras-chave: Espécies reativas de oxigênio; enzimas antioxidantes; estresse oxidativo;
21 ciclo de vida, áreas úmidas temporárias.

22 5 INTRODUÇÃO

23 Por várias décadas o envelhecimento foi explicado pelo paradigma proposto por
24 Denham Harman (1956), segundo o qual os radicais livres apresentam apenas um papel
25 deletério no processo de envelhecimento, conduzindo a uma situação de estresse
26 oxidativo que determina a velocidade deste processo. Este papel deletério seria causado
27 por espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre estas os radicais livres, que nada mais
28 são do que metabólitos parcialmente reduzidos do oxigênio molecular gerados em
29 diferentes vias metabólicas ou como subprodutos de vários processos celulares. Porém,
30 estudos das últimas décadas têm evidenciado que as espécies reativas de oxigênio
31 representam um importante sinalizador celular e que os organismos vivos apresentam
32 mecanismos celulares e moleculares adaptativos a doses subletais de espécies reativas de
33 oxigênio que induziriam vias de sinalização que aumentam a longevidade por exemplo,
34 através do fenômeno definido como hormese (Gladyshev, 2014; Costantini, 2014).

35 O estresse oxidativo ocorre quando há um desbalanço entre a produção e a
36 eliminação de pró-oxidantes e antioxidantes, conduzindo a danos nos lipídios, nas
37 proteínas, no DNA, e em organelas como a mitocôndria (Sohal & Weindruch, 1996;
38 Finkel & Holbrook, 2000). Contudo, é necessário destacar que este estresse oxidativo
39 pode ser dividido em (1) fisiológico ou eustresse (níveis baixos) sendo este, importante
40 na sinalização e na regulação redox, enquanto a sobrecarga ou distresse (níveis elevados
41 ou supra-fisiológicos), conduziria a interrupção da sinalização redox e/ou dano oxidativo
42 a biomoléculas (Sies, 2018).

43 O aumento das EROs e consequentemente o estresse oxidativo tem sido
44 relacionado a *trade-offs* entre as características da história de vida dos organismos e sua
45 automanutenção (Kirkwood & Holliday, 1979; Metcalfe & Monaghan, 2003; Wiersma et
46 al., 2004; Metcalfe & Alonso-Alvarez, 2010; Speakman & Garratt, 2014; Smith et al.,
47 2016) visto que essas características não podem ser simultaneamente maximizadas
48 (Stearns, 1992). Organismos que apresentam crescimento rápido e grande investimento
49 em reprodução exibem maior produção de EROs e declínios na atividade das enzimas
50 antioxidantes, refletindo em estresse oxidativo (Wang et al., 2001; Alonso Alvarez et al.,
51 2004; Wiersma et al., 2004; Alonso-Alvarez et al., 2007; De Block & Stoks, 2008;
52 Costantini, 2008; Speakman, 2008; Monaghan et al., 2009; Nussey et al., 2009; Metcalfe
53 & Alonso-Alvarez, 2010). Estudos recentes também demonstraram que o estresse

54 oxidativo varia entre as fases de vida, e é influenciado pelas condições ambientais
55 (Metcalf & Alonso-Alvarez, 2010).

56 Peixes anuais (família Rivulidae na região Neotropical e família
57 Nothobranchiidae na África) habitam exclusivamente áreas úmidas temporárias,
58 ambientes que secam durante um período do ano (Costa, 2002a; Reichard et al., 2009;
59 Polačik & Podrabsky, 2015; Loureiro & De Sá, 2015). Esses peixes apresentam
60 características de história de vida relacionadas a maior produção de EROs, como
61 crescimento rápido, intenso processo reprodutivo e acelerado envelhecimento (Blažek et
62 al., 2013; Vrtílek et al., 2018b) e habitam esses ambientes extremamente imprevisíveis
63 (Polačik et al., 2014; Polačik & Podrabsky, 2015).

64 Nas áreas úmidas temporárias, o estresse de tempo (uma vez que o período de
65 inundação é limitado) impõe que os peixes anuais apresentem naturalmente crescimento
66 rápido para atingir a maturidade sexual e iniciar o processo reprodutivo antes do ambiente
67 secar (Polačik et al., 2014). O crescimento dos peixes anuais variam entre os sexos, onde
68 os machos apresentam crescimento iniciais mais elevados do que as fêmeas devido ao seu
69 maior tamanho corporal (Laufer et al., 2009). Estudos recentes relatam que investimento
70 em crescimento rápido aliado a crescimento sob estresse do tempo estão associados a um
71 possível aumento do estresse oxidativo (Alonso-Alvarez et al., 2007; Nussey et al., 2009;
72 Stier et al., 2014a; Stier et al., 2014b; Stier et al., 2014c, Costantini, 2014; Smith et al.,
73 2016; Janssens & Stoks, 2018).

74 A reprodução é um dos períodos fisiologicamente mais exigentes da vida de um
75 animal (Speakman, 2008) conduzindo a um alto custo energético estando assim,
76 normalmente, associado ao aumento do estresse oxidativo (Behrman et al., 2001; Wang
77 et al., 2001; Alonso-Alvarez et al., 2004; Murdoch & Martinchick, 2004; Wiersma et al.,
78 2004; Murdoch et al., 2005). Peixes anuais mantêm um intenso processo reprodutivo,
79 reproduzindo diariamente desde a maturidade sexual até a sua morte (Vaz Ferreira et al.,
80 1964; Arenzon et al., 1999, 2001; Errea & Danulat 2001; Gonçalves et al., 2011). Durante
81 a reprodução, os machos necessitam manter constantes comportamentos agonísticos
82 como interações competitivas com outros machos e de corte com as fêmeas (Passos et
83 al., 2014), enquanto as fêmeas produzem ovos que são energeticamente custosos, além
84 de sofrerem constante assédio e serem perseguidas pelos machos para reprodução
85 (Wootton & Smith, 2015). A produção cíclica de oócitos e comportamentos agressivos
86 foram relacionados a um aumento no risco de estresse oxidativo (Behrman et al., 2001;
87 Castro et al., 2006; Mowles et al., 2009).

88 Os peixes anuais também apresentam acelerado envelhecimento (Reichard, 2016).
89 É conhecido que o envelhecimento é modulado tanto por condições abióticas (Kawasaki
90 et al., 2008; Caruso et al., 2017) como bióticas (Reznick et al., 2004). O aumento da
91 idade em peixes anuais neotropicais foi relacionado a aumento da oxidação de proteínas
92 e de lipídios (lipoperoxidação), e diminuição da atividade das enzimas antioxidantes
93 (HSU et a., 2008; LIU et al., 2012).

94 As grandes variações das características ambientais as quais estão expostos os
95 peixes anuais nas áreas úmidas temporárias (Polačik & Podrabsky 2015; Lánés et al.,
96 2016; Lanés et al., 2018) podem relacionar-se com o grau de estresse oxidativo, mas
97 relativamente pouco se sabe sobre essa relação. A temperatura, disponibilidade de
98 oxigênio e risco de predação são alguns destes apontados como causadores de estresse
99 oxidativo em animais aquáticos, inclusive em peixes (Lushchak, 2011; Janssens & Stoks,
100 2013; Birnie-Gauvin et al., 2017). Além disso, a densidade populacional pode ter um
101 papel importante no balanço oxidativo, visto que influencia a disponibilidade de recursos,
102 crescimento e mortalidade (Hixon & Jones, 2005; Lobón-Cerviá, 2012).

103 Nos ambientes temporários os peixes anuais podem ser expostos a uma variação
104 de temperaturas próximas do congelamento até temperaturas acima dos 25°C durante seu
105 ciclo de vida nas áreas subtropicais da Argentina, Uruguai e Sul do Brasil (Errea &
106 Danulat; 2001; Volcan et al., 2011, Berois et al., 2014; Polačik & Podrabsky, 2015, Lanés
107 et al., 2016). Em peixes anuais africanos senescentes uma variação em poucos graus da
108 temperatura causou aumento da peroxidação lipídica (LPO) (Milinkovitch et al., 2018).
109 Peixes anuais são geralmente abundantes e facilmente alcançam mais de 1000 exemplares
110 por área úmida . Ao longo do ciclo anual conexões com ambientes permanentes permitem
111 o acesso de peixes não anuais (Lánés et al., 2016), contribuindo para a entrada de peixes
112 predadores. Deve-se considerar que estas situações (processos denso-dependentes e
113 predação) possam influenciar o estresse oxidativo devido a predação e a competição.

114 Apesar da grande contribuição desses estudo para o entendimento sobre o balanço
115 oxidativo, a grande maioria foi realizado em ambiente laboratorial controlado. O papel
116 das características de vida dos organismos no balanço oxidativo em ambiente natural
117 ainda não é totalmente compreendido (Nussey et al., 2009; Hōrak & Cohen, 2010). Os
118 estudos em ambiente natural são escassos e considerados de grande interesse pelos
119 pesquisadores para que os resultados laboratoriais sejam contrastados e colocados dentro

120 de um contexto ecológico e evolutivo mais significativo (Costantini, 2008; Selman et al.,
121 2008, Reichard, 2016). Neste sentido, estudos já tem demonstrado que a pressão imposta
122 pelo ambiente natural faz com que características como o crescimento e maturidade
123 sexual dos peixes anuais sejam muito mais rápidos em ambiente natural (Vrtílek et al.,
124 2018a,c)

125 Estudos considerando a variação no balanço oxidativo ao longo das diferentes
126 fases de vida dos organismos também são raros e necessitam ser realizados (Malek et al.,
127 2004; Valenzano et al., 2006; Hsu & Chiu 2009; Hemmer-Brepson et al., 2014; Wang et
128 al., 2014). Além disso, nenhum estudo sobre o balanço oxidativo foi realizado utilizando
129 peixes anuais neotropicais. Os poucos estudos realizados foram feitos com peixes anuais
130 africanos em laboratório (Hsu et al., 2008, Liu et al., 2012, 2015; Dong et al., 2017;
131 Milinkovitch, 2018; Wang et al., 2018).

132 Neste sentido, o objetivo desse trabalho foi avaliar marcadores do balanço
133 oxidativo em ambiente natural ao longo do ciclo de vida em uma espécie de peixe anual
134 neotropical (*Austrolebias minuano*), que apresenta características de vida relacionadas ao
135 estresse oxidativo. Esperamos encontrar valores elevados de lipoperoxidação aliados a
136 uma diminuição das enzimas antioxidantes nas diferentes fases de vida dos peixes anuais,
137 sendo isto influenciado pelo seu rápido crescimento, grande investimento em reprodução
138 e temporalidade do habitat o que conduziria a uma maior produção de EROs, diminuição
139 das defesas antioxidantes e assim maior estresse oxidativo. Nossa hipótese é que o
140 estresse oxidativo aumenta ao longo da vida dos peixes anuais e é maior fase final de vida
141 destes animais devido aos declínios funcionais evidenciados com o aumento da idade e
142 as piores condições do ambiente nesse período, refletida, por exemplo, pelo aumento da
143 temperatura da água e dos peixes predadores e competidores.

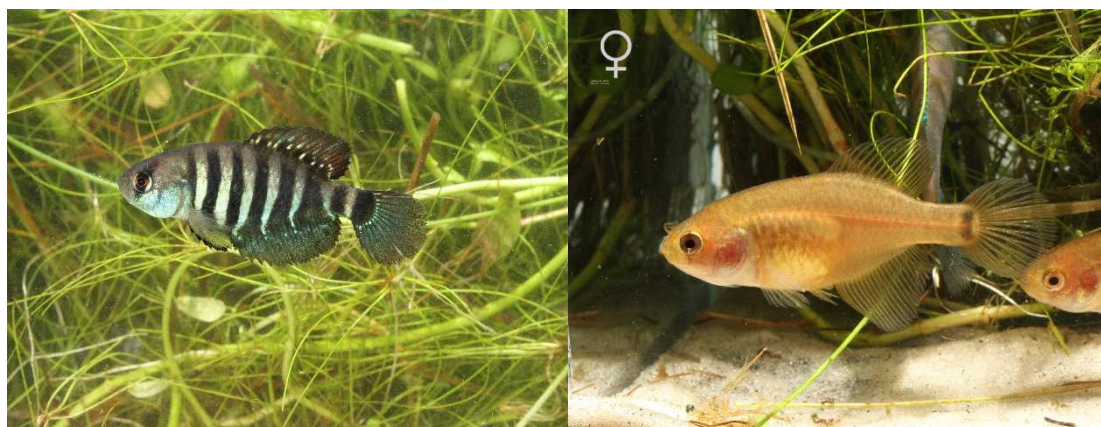
144 **6 MATERIAL E MÉTODOS**

145 **6.1 Espécie de estudo**

146 *Austrolebias minuano* (Figura 2) é uma espécie típica de peixe anual neotropical
147 e ocorre na Planície Costeira do Sul do Brasil. Em condições naturais, a espécie apresenta
148 uma única faixa etária, sem sobreposição de gerações e expectativa de vida <8 meses
149 (Lanés et al., 2014, 2016; Volcan et al., 2018). Os juvenis eclodem relativamente
150 sincrônicos no outono austral e início do inverno (maio a julho) e durante o ciclo de vida
151 sazonal, o qual termina no final da primavera (novembro), as populações mostram um

152 aumento gradual do tamanho corporal aliado a um declínio contínuo na abundância e
 153 densidade populacional (Lanés et al., 2016; Volcan et al., 2018). Em contraste com peixes
 154 anuais africanos, o período de vida de *A. minuano* está confinado a períodos frios, com
 155 temperaturas da água mais elevadas no final do ciclo sazonal, com aumento da
 156 mortalidade mesmo antes da dessecação do habitat (Lanés et al., 2016). Além disso, em
 157 muitas áreas úmidas, *Austrolebias minuano* pode co-ocorrer com *Cynopoecilus fulgens*,
 158 outra espécie de peixe anual (Lánés et al., 2014, 2016).

159 Populações silvestres de *A. minuano* apresentam viés sexuais femininos, com os
 160 machos desaparecendo proporcionalmente mais rápido que as fêmeas ao longo do ciclo
 161 sazonal (Lanés et al., 2016). Os machos são mais coloridos e supostamente mais
 162 vulneráveis à predação. No entanto, Reichard et al. (2018) mostraram que ambos os sexos
 163 sofrem significativa mortalidade por predação por aves (mortalidade extrínseca), sem
 164 padrão de sobrevivência específico de algum dos sexo. Lanés et al. (2016) apontaram que
 165 o declínio mais pronunciado no sexo masculino estava relacionado com a deterioração
 166 ambiental (mortalidade intrínseca)



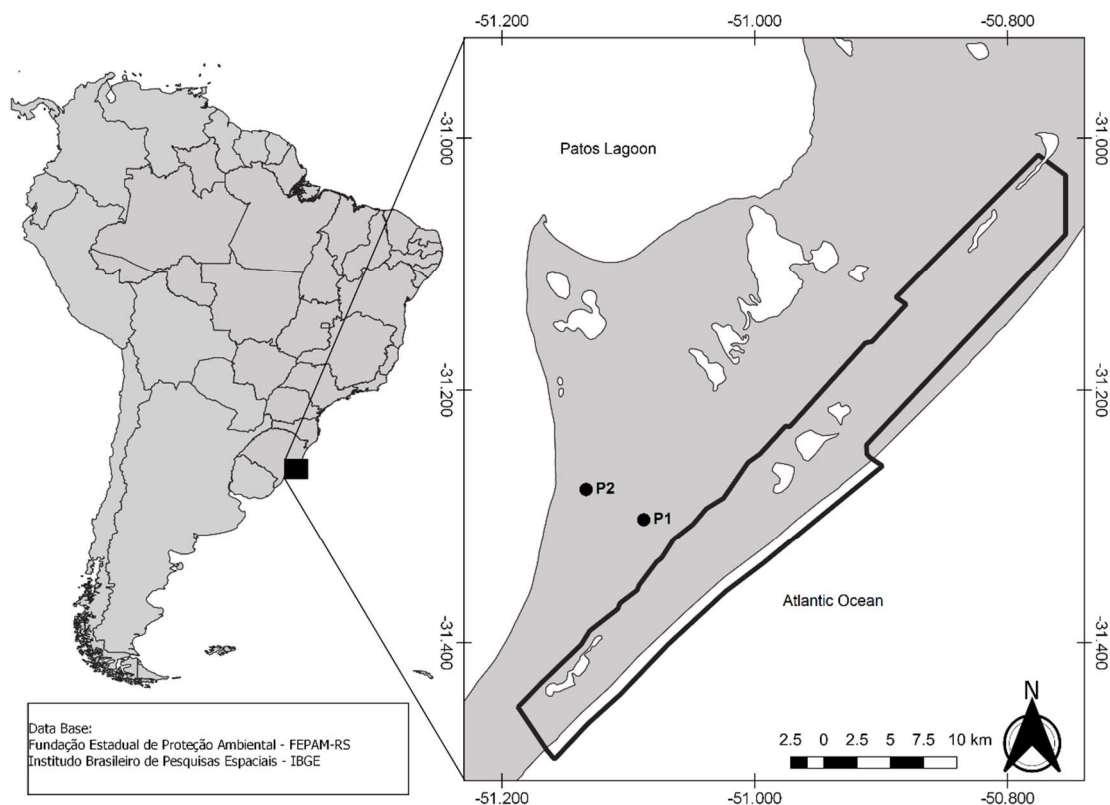
167

168 Figura 2 – Macho e fêmea de *Austrolebias minuano*. Foto: Radim Blažek

169 6.2 Área de estudo

170 Os peixes foram coletados em duas poças temporárias, na zona de amortecimento
 171 do Parque Nacional da Lagoa do Peixe (PARNA Lagoa do Peixe)(Figura 3). O PARNA
 172 Lagoa do Peixe é um dos sítios Ramsar da região sul do Brasil, localizado na seção média
 173 da planície costeira externa do Rio Grande do Sul (50°77'-51°15'W,'S 31°02'-31°48). A
 174 região possui um clima subtropical úmido cuja temperatura média varia de 13°C no
 175 inverno e até 24°C no verão. A precipitação média anual varia entre 1.200 e 1.500
 176 milímetros (Tagliani, 1995). Segundo o IBGE (2004), a vegetação é classificada como

177 representante do Bioma Pampa, que se caracteriza por campos subtropicais, mas no local
 178 encontram-se também componentes da Mata Atlântica, composta por espécies pioneiras
 179 e fragmentos de florestas de restinga. Na região ocorrem três espécies de peixes anuais e
 180 há uma grande quantidade de áreas úmidas temporárias (Lanés & Maltchik, 2010; Lanés
 181 et al., 2016). Recentemente Lanés et al. (2016) avaliaram a dinâmica populacional de *A.*
 182 *minuano* nessa região, estimando através de técnicas de marcação e recaptura que as
 183 populações da espécie podem alcançar mais de 1000 exemplares por área úmida.



184

185 Figura 3– Mapa da área de estudo no Sul do Brasil. • Pontos amostrados, □ Limites do Parque
 186 Nacional da Lagoa do Peixe (PARNA Lagoa do Peixe), Tavares, Rio Grande do Sul, Brasil.

187 6.3 Delineamento amostral e coleta de dados

188 Nós realizamos quatro coletas em intervalos de 37 a 44 dias, em duas áreas úmidas
 189 ao longo de um ciclo de vida de *A. minuano*, entre junho e novembro de 2016. As
 190 amostragens abrangeram diferentes fases do desenvolvimento da espécie. A primeira e a
 191 segunda amostragem foram realizadas em junho e julho, período que abrange indivíduos
 192 juvenis em fase de crescimento (Lánés et al., 2016; Volcan et al., 2018). As coletas de
 193 setembro e outubro, abrangeram indivíduos adultos e senis, respectivamente. Em
 194 novembro, ainda que houvesse presença de água superficial nas áreas úmidas temporárias

195 *A. minuano* não estava mais presente nas unidades amostrais. Conforme estudo realizado
196 nas mesmas áreas no mês de novembro os indivíduos de *A. minuano* já não estão mais
197 presentes nas áreas úmidas (Lanés et al., 2016).

198 Os peixes utilizados na determinação do estresse oxidativo foram coletados pelo
199 método de varredura utilizando puçá de mão (forma de D, 60 cm x 40 cm, 2 mm de
200 malha). A varredura com puçá foi paralela ao fundo da área úmida e procurou cobrir todos
201 os habitats. Em cada área úmida (ponto um e dois) foram coletados até 20 indivíduos de
202 cada sexo nos diferentes períodos de amostragem (junho, julho, setembro e outubro).

203 As áreas úmidas eram isoladas e distantes entre si pelo menos cinco quilômetros.
204 Em cada área úmida, os dados de área (m²), profundidade máxima (cm), temperatura da
205 água, oxigênio dissolvido (OD), Turbidez (NTU), pH e condutividade foram obtidos. Os
206 dados das características físico-químicas da água foram obtidos utilizando uma sonda
207 Multi-Parâmetros HORIBA U-222. A temperatura e a luminosidade também foram
208 acompanhadas por meio de data-logger (Hobo UA-002-08; Onset Ltd) a cada três horas
209 durante todo o ciclo de vida da espécie até a dissecação total das áreas úmidas temporárias.
210 A área total foi medida a cada amostragem *in situ* usando um GPS portátil (precisão três
211 metros) percorrendo a pé os limites da área úmida. A profundidade máxima da área úmida
212 foi obtida usando uma régua graduada (cm).

213 Os peixes coletados foram submetidos a crioeutanasia e em seguida
214 transportados em caixas térmicas para o Laboratório de Fisiologia da Conservação, da
215 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). As coletas de peixes
216 foram realizadas mediante autorização do IBAMA / ICMBio (número do processo
217 SISBIO No. 43.251-1) e da Comissão de Ética para Uso de Animais, da UNISINOS
218 (PPECEUA 12-2015). Todos os procedimentos bioquímicos-funcionais foram autorizados
219 pela Comissão de Ética para o Uso de Animais da PUCRS (número 8271), além do
220 registro junto ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento
221 Tradicional Associado (SisGen: A732684).

222 **6.4 Estimativas populacionais**

223 Nós estimamos a abundância das duas espécies de peixes anuais (*Austroebias*
224 *minuano* e *Cynopoecylus fulgens*), e a riqueza e abundância de peixes não-anuais e
225 potenciais predadores (cágados, peixes piscívoros e invertebrados como baratas-d'água e
226 larvas de odonata) nas duas áreas úmidas estudadas através de marcação e recaptura. Esse

227 levantamento foi realizado visando utilizar esses dados como uma variável ambiental de
228 interesse, já que a densidade populacional influencia a disponibilidade de recursos,
229 crescimento e mortalidade (Hixon & Jones, 2005; Lobón-Cerviá, 2012). O esforço de
230 amostragem em cada local foi padronizado por unidade de tempo. Dois puçás (forma de
231 D, 60 cm x 40 cm, 2 mm de malha) foram utilizados para realizar varreduras
232 paralelamente ao fundo da área úmida durante seis séries de 15 minutos, totalizando 1
233 hora e 30 minutos de amostragem em cada ponto. Todos os habitats disponíveis das áreas
234 úmidas foram amostrados. Os períodos de coletas ao longo do ano foram junho, julho,
235 setembro e outubro. Para cada período de amostragem, os indivíduos coletados foram
236 mantidos separados em baldes de 20 litros. Os indivíduos não foram liberados entre os
237 períodos de amostragem. Após a amostragem, peixes não-anuais foram identificados a
238 nível específico de acordo com Malabarba et al. (2013) e peixes anuais de acordo com
239 Costa (2002b, 2006). A classificação sistemática segue Betancur-R et al. (2013). Os
240 predadores (cágados, peixes e invertebrados) foram identificados na menor classificação
241 taxonômica possível. O sexo dos peixes anuais foi determinado com base em caracteres
242 externos (tamanho das nadadeiras, forma e coloração). O comprimento padrão dos peixes
243 e dos predadores foi mensurado através de régua plástica e os peixes foram marcados pela
244 remoção de um pequeno pedaço da nadadeira caudal antes da liberação. No dia seguinte,
245 repetiu-se o mesmo esforço de amostragem nestas áreas úmidas. O número de peixes
246 anuais marcados e não marcados capturados foi registrado e todos os peixes foram
247 liberados.

248 **6.5 Processamento das amostras**

249 Nós analisamos os biomarcadores de 137 indivíduos de *Austrolebias minuano* (69
250 machos e 68 fêmeas) em diferentes períodos de vida (Junho n=61, Julho n=38, Setembro
251 n=24, Outubro n=14). Os peixes foram mantidos congelados a -80°C para preservar a sua
252 integridade para análise enzimática no Laboratório de Fisiologia da Conservação da
253 Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS). No laboratório, os
254 animais foram separados conforme o sexo, mês de coleta e o ponto amostral em que foram
255 coletados. Todos peixes foram identificados, pesados na balança analítica
256 individualmente e medidos em seu comprimento padrão (mm) – desde a ponta do focinho
257 até o final do pedúnculo caudal com paquímetro digital.

258 Os indivíduos inteiros foram separados em *pools* de dois exemplares para a
259 realização do homogeneizados em solução de tampão Fosfato (20 mM, pH 7,0 acrescida

260 de PSMF 1 mM e cloreto de potássio 140 mM), em uma proporção de 1g de peso úmido
261 para 6 ml de tampão, com o auxílio de um Ultra-Turrax® (IKA-WERK), em banho de
262 gelo (0-4°C). Antes do ensaio enzimático, o homogeneizado foi centrifugado (SORVALL
263 RC-5B Refrigerated Superseed Centrifuge), sob refrigeração (4°C) a 3.000 rpm por 5
264 minutos, conforme adaptação do método de homogeneização descrito por Llesuy et al.
265 (1985). A partir do homogeneizado foram determinadas proteínas totais (PT),
266 peroxidação lipídica (TBARS), e atividade das enzimas antioxidantes Superóxido
267 Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione S-Transferase (GST) de cada pool de
268 indivíduos por ponto amostral, sexo e mês de coleta. Todas as amostras foram
269 determinadas em quadruplicata.

270

271 **6.6 Ensaio de Proteína Total**

272 Os sobrenadantes dos homogenizados foram centrifugados a 3000 rpm durante 3
273 minutos a 4°C e as proteínas totais foram quantificadas conforme kit da Biodiagnóstica,
274 tendo como princípio a reação de íons cobre com as ligações peptídicas das proteínas
275 séricas, em um meio de reação alcalino, formando um líquido de coloração púrpura que
276 tem absorbância máxima em 525nm. O resultado é expresso em mg de proteínas/G de
277 peso úmido⁻¹

278 **6.7 Ensaio de Peroxidação lipídica**

279 A peroxidação lipídica dá-se pela reação das EROs com os lipídeos insaturados
280 das membranas, resultando na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente
281 reativos e podem dar início a uma cascata oxidativa, com severos danos a integridade das
282 membranas. Nessa reação, ocorre à liberação de produtos da degradação de ácidos graxos,
283 como o malondialdeído, e a quantificação deste composto têm sido utilizado para avaliar
284 a extensão do dano oxidativo (Ohkawa et al., 1979). Uma importante característica do
285 MDA é sua capacidade de reagir com o ácido tiobarbitúrico sob altas temperaturas e baixo
286 pH, gerando um produto com cor que pode ser detectado espectrofotometricamente em
287 532 nm, base para método de detecção de produtos finais de lipoperoxidação. Os níveis
288 de peroxidação lipídica foram assim, determinados através da detecção de substâncias
289 que reagem ao Ácido Tiobarbitúrico (TBA-RS) conforme modificações de Persch et al.
290 (2017); os resultados foram expressos em nmol TBA/mg de proteínas.

291

292 **6.8 Ensaio de Enzimas Antioxidantes e de Biotransformação**

293

294 **6.8.1 Superóxido Dismutase (SOD)**

295 O método empregado foi o através da enzima que inibe a reação do radical
296 superóxido com a epinefrina, levando a oxidação da epinefrina e a formação de um
297 produto colorido (adrenocromo), que é detectado através de cinética enzimática por
298 espectrofotometria a 480nm. O meio de reação consiste de glicina-NaOH (50mM, pH 11)
299 e epinefrina (1mM) (Boveris et al., 1982). Resultados são expressos em unidades de
300 SOD/mg de PT.min, sendo uma unidade de SOD correspondente a quantidade de enzima
301 que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector utilizado, neste caso o
302 adenocromo.

303 **6.8.2 Catalase (CAT)**

304 A atividade desta enzima foi quantificada por cinética enzimática, por
305 espectrofotometria a 240 nm, através do decaimento do peróxido de hidrogênio (H₂O₂)
306 (Boveris et al., 1973). A atividade da CAT foi expressa em nmoles H₂O₂ min⁻¹. mg de
307 proteínas⁻¹

308 **6.8.3 Glutathione S-Transferase (GST)**

309 A atividade foi quantificada também por cinética enzimática através da
310 conjugação do 1-cloro 2,4 dinitrobenzeno (CDNB), com a glutathione reduzida, em
311 espectrofotometria a 340 nm. A atividade da GST é expressa em nmoles de conjugado
312 CNDB. min⁻¹ .mg de proteínas⁻¹ (Boylard et al., 1969).

313 **7 Análises estatísticas**

314 Nós utilizamos ANOVA Two-Way para testar diferenças nas médias do tamanhos
315 dos indivíduos em relação ao período e ao sexo. Modelos lineares mistos (LMMs) foram
316 usados para testar a influência do período de amostragem (diferentes meses) e sexo nos
317 níveis de proteínas totais, atividade enzimática (CAT, GST, SOD), e peroxidação lipídica
318 (TBARS). Para atender a distribuição gaussiana as variáveis dependentes foram
319 transformadas em Log ou raiz quadrada. A área úmida (unidade amostral) foi utilizada
320 como fator aleatório, enquanto o período, sexo e a sua interação foram utilizados como
321 os fatores fixos de interesse. A seleção do melhor modelo foi realizada via *single term*

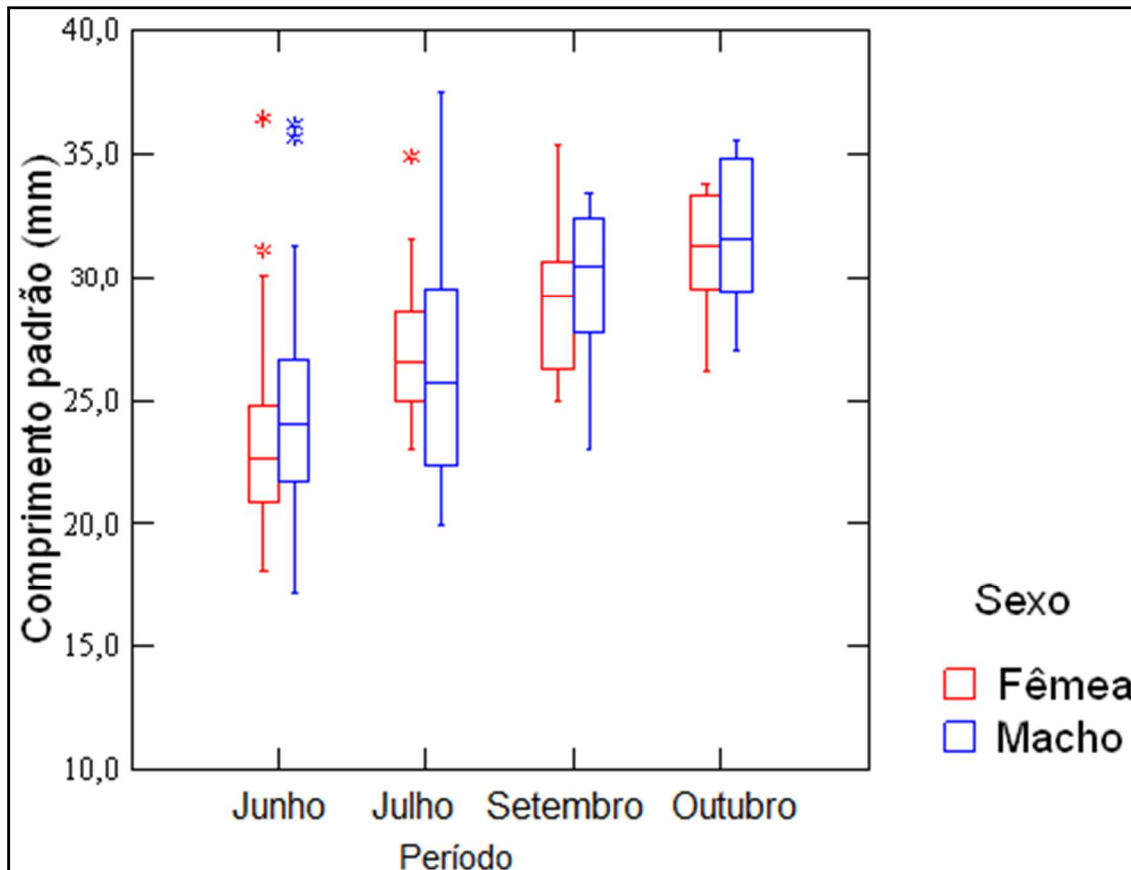
322 *deletions* e Teste de Wald pela comparação dos modelos gerados (sexo, período e
323 sexo*período) com o modelo nulo (composto por intercepto + efeito aleatório). As
324 premissas do modelo foram checadas quanto a normalidade e homoscedasticidade. A
325 análise dos dados foi realizada no ambiente estatístico R (R 3.5.1). Os dados foram
326 visualizados graficamente usando a biblioteca *ggplot* (Wickham, 2009) e os modelos
327 lineares mistos foram concluídos utilizando a biblioteca *lme4* (Bates et al., 2014).

328 Foi utilizada análise de redundância (RDA) para avaliar a influência das matrizes
329 explicativas sobre a variação do conjunto de biomarcadores. Posteriormente uma análise
330 de Partição de Variância (Varpart) (Peres-Neto et al. 2006) foi realizada para avaliar a
331 importância relativa de cada matriz explicativa sobre o conjunto de biomarcadores. A
332 matriz de resposta foi composta pelos biomarcadores analisados (Proteínas totais,
333 TBARS, CAT, GST, SOD) e as matrizes explicativas (X1 - habitat; X2 – variáveis
334 bióticas; X3 – variáveis físico-químicas da água). As variáveis incluídas em habitat foram
335 área e profundidade. As variáveis bióticas foram riqueza de predadores, abundância de
336 predadores, abundância de *Austrolebias minano*, abundância de *Cynopoecilus fulgens*,
337 riqueza de peixes não anuais e abundância de peixes não anuais. As variáveis físico-
338 químicas da água foram temperatura, pH, condutividade, NTU (turbidez) e oxigênio
339 dissolvido (OD). Para eliminar colinearidades entre as variáveis explicativas realizamos
340 uma pré seleção em cada matriz de variáveis explicativas através de seleção *Forward*.
341 Desta forma, a matriz ambiental foi constituída das variáveis que não foram excluídas
342 através do fator de inflação de variância (VIF). O VIF é utilizado como indicador de
343 multicolinearidade entre variáveis explicativas, sendo que $VIF = 1$ indica que a variável
344 não está relacionada a nenhuma outra variável preditora do modelo. Por outro lado, $VIF >$
345 10 sugere forte colinearidade (Quinn & Keough, 2002). Utilizamos uma Análise Parcial
346 de Redundância (pRDA) para controlar o efeito do período sobre o conjunto de
347 biomarcadores. Nós aplicamos a transformação de Hellinger nas matrizes de resposta.
348 Para avaliar a significância do modelo geral foi utilizado o teste de Monte Carlo (999
349 permutações). Por fim, nós realizamos regressões múltiplas para para testar a influência
350 das matrizes explicativas sobre cada um dos biomarcador separadamente.

351 **8 RESULTADOS**

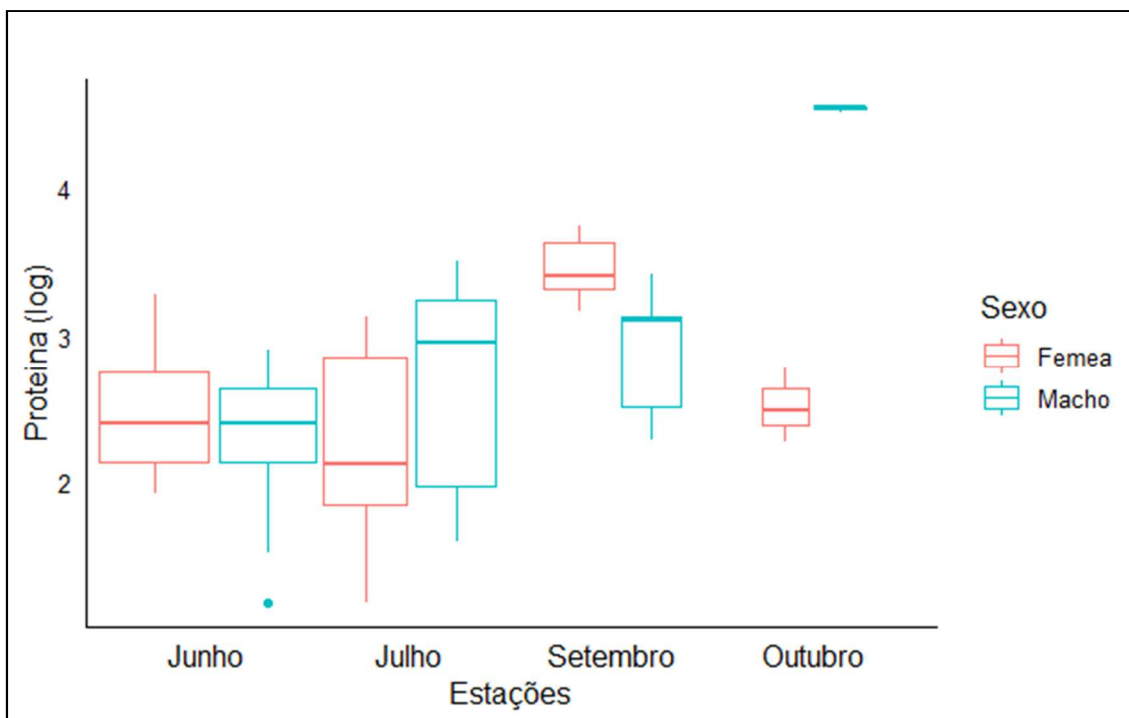
352 **8.1 Biomarcadores**

353 O tamanho médio dos peixes anuais diferiu significativamente entre os períodos
 354 ($F=16.547$, $p<0.001$) (Figura 4), apresentando aumento ao longo do ciclo de vida. O
 355 tamanho dos indivíduos não variou entre os sexos ($F= 0.382$, $p=0.583$). O comprimento
 356 médio entre os períodos foi de 24.08 ± 4.4 mm em junho, 26.77 ± 4.0 mm em julho, $29.23 \pm$
 357 2.9 mm em setembro e 31.3871 ± 2.9 mm em outubro.
 358



359
 360 Figura 4 – Variação no comprimento padrão em machos e fêmeas entre os meses de amostragem
 361 de *A. minuano* nas duas área úmidas.

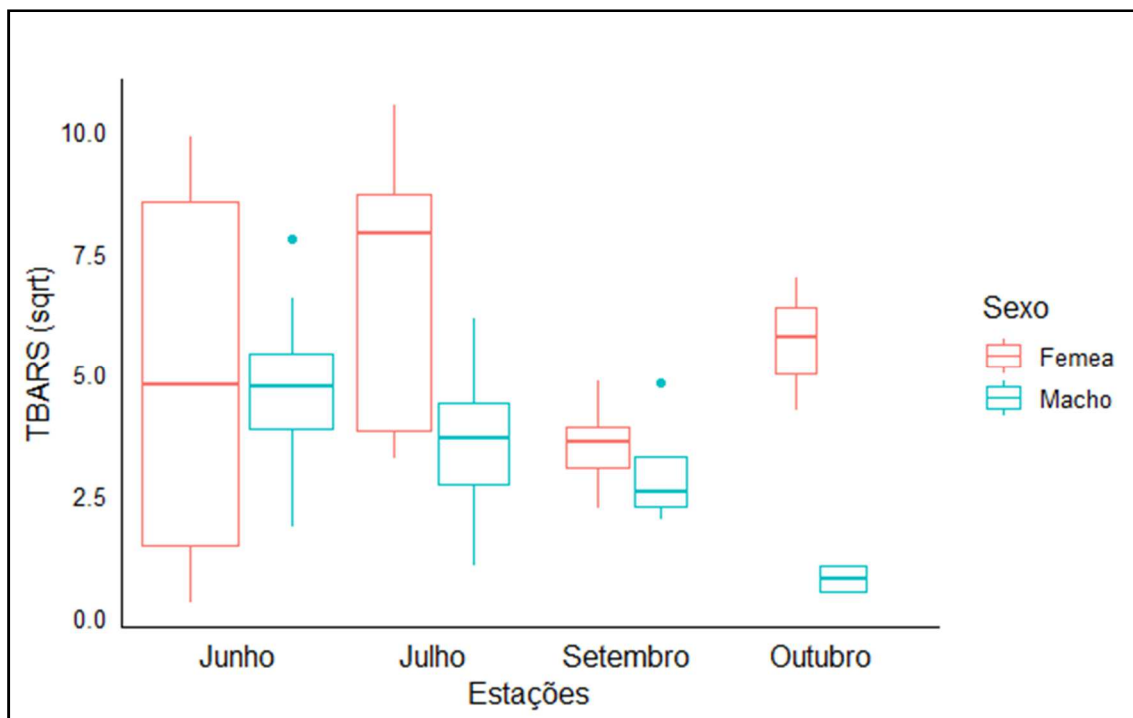
362 Os níveis de proteínas totais foram influenciados pela interação entre sexo e
 363 período ($p=0.0001$). Machos mostraram aumento gradual das proteínas ao longo do ciclo
 364 de vida com os maiores valores em outubro (Figura 5). Fêmeas apresentaram diminuição
 365 nos níveis de proteínas entre junho/julho (fase de maior crescimento) seguido de aumento
 366 entre julho e setembro (fase reprodutiva). Fêmeas apresentaram maiores níveis de
 367 proteínas no período correspondente a reprodução. Em outubro (indivíduos senis) as
 368 fêmeas voltaram a ter redução nas proteínas (Figura 5).



369

370 Figura 5 – Variação sazonal dos níveis de proteínas totais em machos e fêmeas de *A. minuano*.

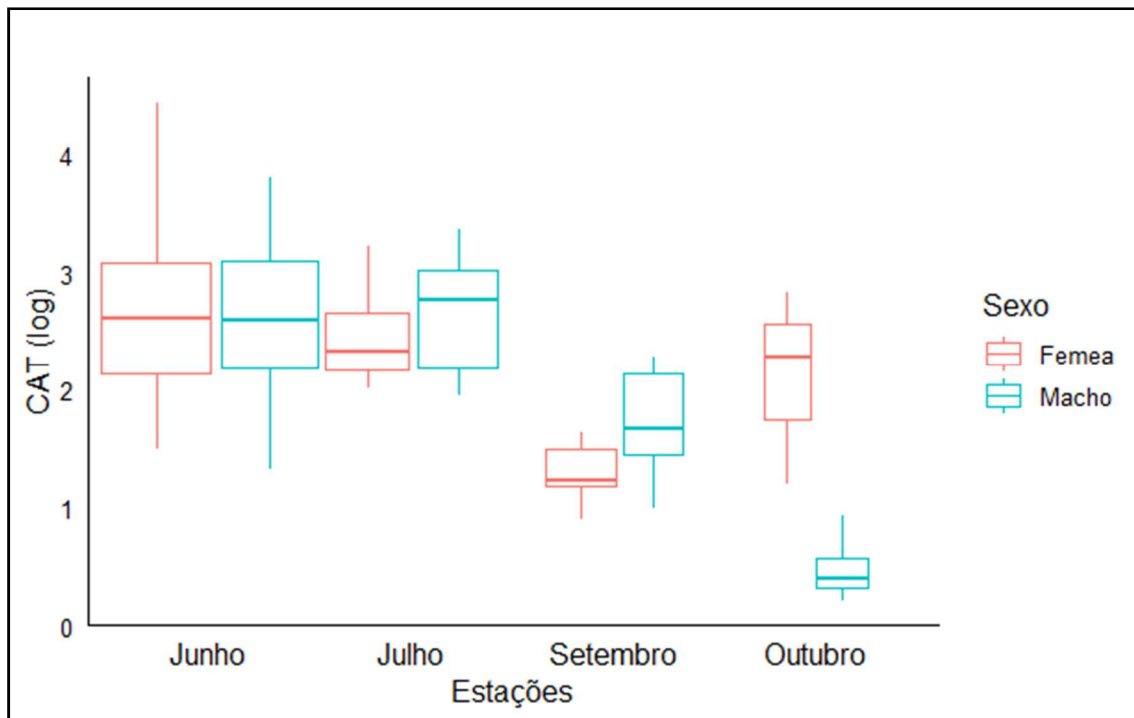
371 A peroxidação lipídica (TBARS) apresentou variação distinta entre sexo e período
 372 ($p=0.01$). Machos mostraram diminuição de TBARS ao longo do ciclo de vida. Fêmeas
 373 apresentaram maiores valores de TBARS nos meses de julho e outubro (Figura 6). O
 374 período de crescimento (junho/julho) foi marcado por um aumento da peroxidação
 375 lipídica nas fêmeas e redução nos machos. Durante a fase reprodutiva (julho/setembro)
 376 houve redução da peroxidação lipídica em ambos sexos, sendo essa redução maior nas
 377 fêmeas. Os machos senis (outubro) apresentaram redução da peroxidação lipídica
 378 enquanto as fêmeas apresentaram aumento (Figura 6).



379

380 Figura 6 – Variação sazonal dos níveis de peroxidação lipídica em machos e fêmeas de *A.*
 381 *minuano*.

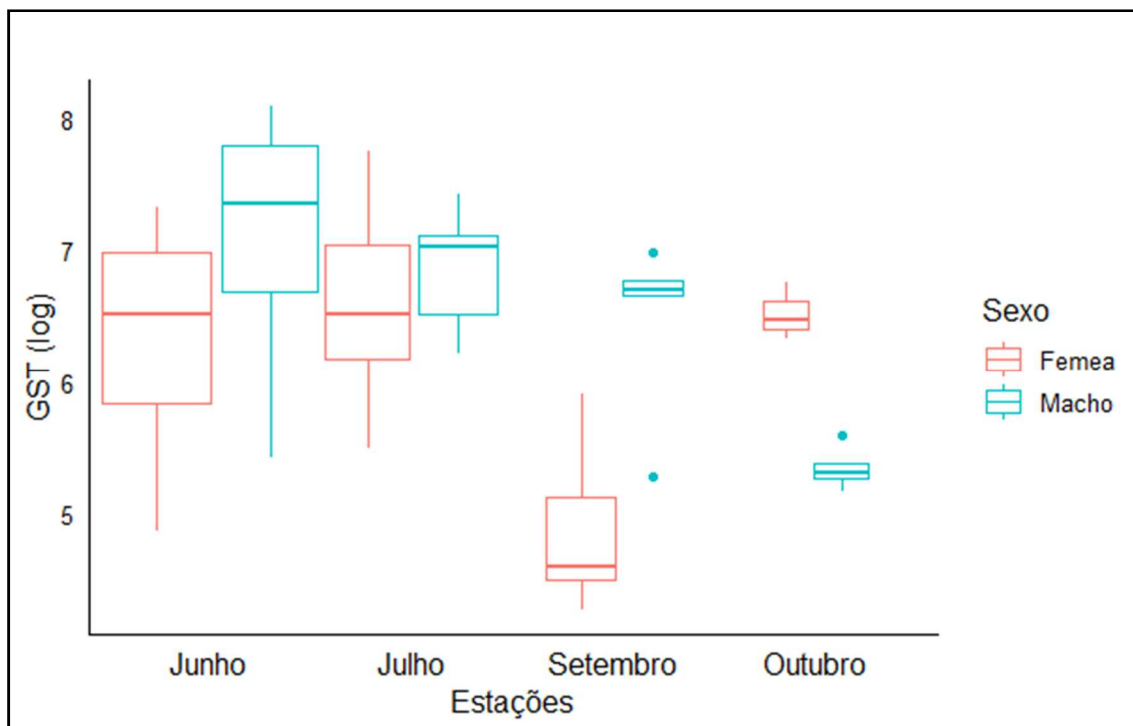
382 A atividade da CAT foi influenciada pelo sexo e período ($p=0.002$), mas não pela
 383 sua interação. Em machos, a atividade da CAT mostrou os maiores valores nos meses de
 384 junho e julho, seguido por diminuição nos meses seguintes. Nas fêmeas, a atividade da
 385 CAT apresentou redução até setembro e um aumento em outubro (Figura 7). No período
 386 de crescimento (junho/julho), a atividade da CAT se manteve constante em ambos os
 387 sexos. Durante a fase reprodutiva (julho/setembro) houve redução da sua atividade em
 388 ambos sexos, sendo a redução novamente maior nas fêmeas. Os machos senis
 389 apresentaram redução da atividade da CAT, exibindo os menores valores nesse período,
 390 enquanto as fêmeas apresentaram aumento (Figura 7).



391

392 Figura 7– Variação sazonal da atividade da enzima Catalase (CAT) em machos e fêmeas de *A.*
 393 *minuano*.

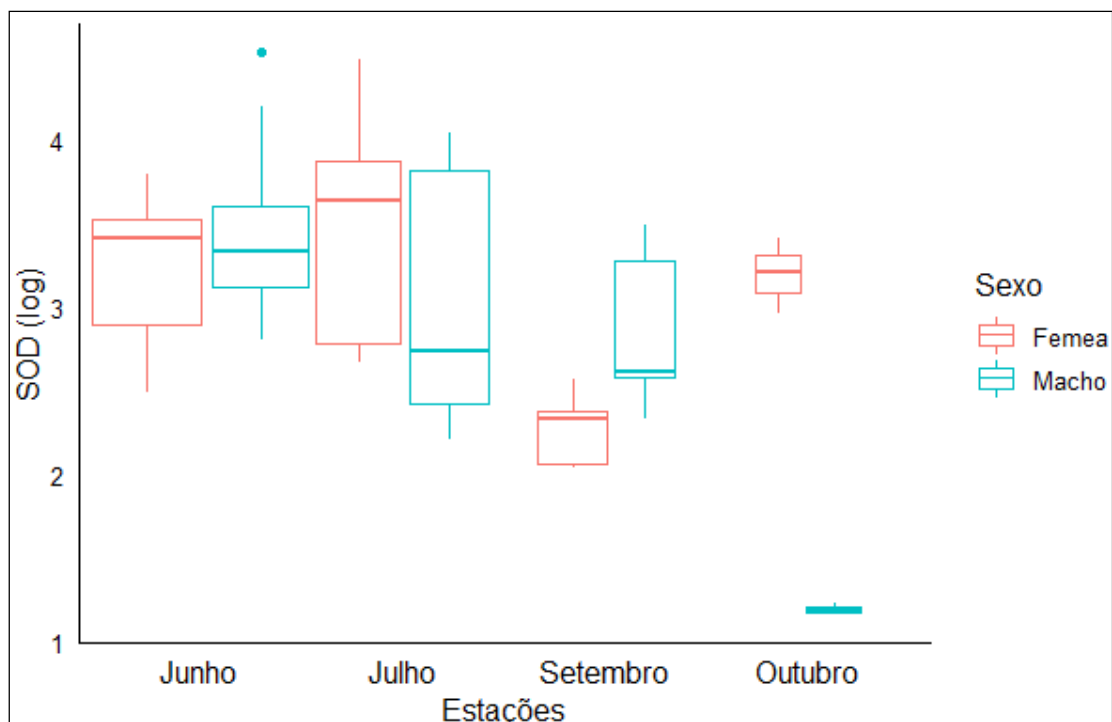
394 A atividade da GST foi influenciada pela interação entre sexo e período
 395 ($p=0.0002$). A GST apresentou maior atividade em machos entre julho e setembro. Os
 396 machos apresentaram redução da atividade da GST ao longo da vida, com os menores
 397 valores no final da vida. Nas fêmeas, houve redução da atividade da GST em setembro
 398 seguido de um aumento em outubro (Figura 8). O período de crescimento (junho/julho)
 399 foi marcado pelos maiores valores de atividade da GST em machos, apesar da redução
 400 entre esses meses. Nas fêmeas houve um pequeno aumento nesse período. Durante a fase
 401 reprodutiva (julho/setembro), a atividade da GST reduziu em ambos sexos, sendo essa
 402 redução muito maior nas fêmeas quando comparado aos machos.. As fêmeas senis
 403 (outubro) apresentaram aumento da atividade da GST enquanto os machos apresentaram
 404 redução (Figura 8).



405

406 Figura 8 – Variação sazonal da atividade da enzima glutionas S-transferases (GST) em
 407 machos e fêmeas de *A. minuano*.

408 A SOD foi influenciada pela interação entre sexo e período ($p < 0.001$). Machos
 409 mostraram diminuição da atividade da SOD ao longo do ciclo de vida. Fêmeas
 410 apresentaram aumento na atividade da SOD no mes de julho, redução no mês de
 411 setembro e um novo aumento em outubro (Figura 9). O período de crescimento
 412 (junho/julho) foi marcado por um aumento da SOD nas fêmeas e redução nos machos.
 413 Durante a fase reprodutiva (julho/setembro) houve redução da SOD nas fêmeas. Nos
 414 machos a SOD apresentou pequena variação em relação a julho. Os machos senis
 415 (outubro) apresentaram redução da atividade da SOD enquanto as fêmeas apresentaram
 416 aumento (Figura 9).



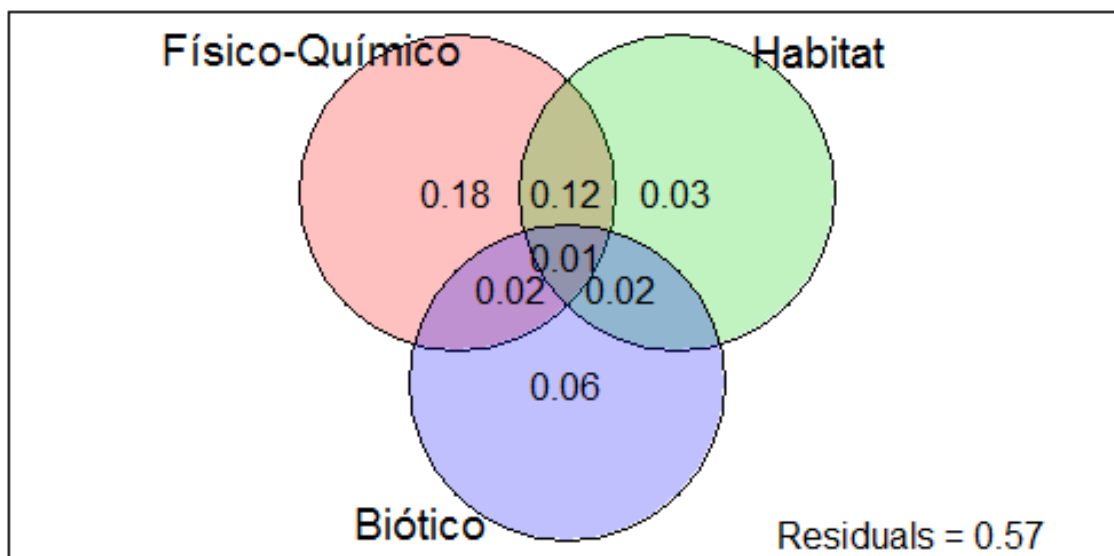
417

418 Figura 9 – Variação sazonal da atividade da enzima Superóxido dismutase (SOD) em machos e
 419 fêmeas de *A. minuano*.

420 8.2 Influência das variáveis ambientais nos biomarcadores

421 A variação no conjunto de biomarcadores foi parcialmente explicada pelas
 422 matrizes ambientais ($F=13.877$, $p=0.001$). A análise de redundância mostrou que as
 423 variáveis explicativas ambientais explicaram 43% da variação do conjunto de
 424 biomarcadores (R^2 ajustado = 0.4346344, $p=0.001$). Considerando o modelo geral, a
 425 variação do conjunto de biomarcadores foi influenciada tanto por variáveis físico-
 426 químicas da água quanto do habitat e bióticas.

427 As variáveis físico-químicas explicaram 18% da variação dos biomarcadores,
 428 representadas por pH e temperatura. A área (tamanho da área úmida) foi a única variável
 429 de habitat significativa e explicou 3% da variação dos biomarcadores. A abundância de
 430 peixes não-anuais foi a única variável biótica que explicou significativamente a variação
 431 nos biomarcadores, explicando 6% da variação total. As variáveis físico-químicas e de
 432 habitat em conjunto explicaram 12% da variação do conjunto de biomarcadores. As
 433 variáveis físico-químicas e bióticas em conjunto explicaram 2%, assim como as variáveis
 434 de habitat e bióticas juntas também explicaram 2% da variação do conjunto de
 435 biomarcadores. A interação entre todas matrizes explicativas explicou 1% dessa variação
 436 (Figura 10).

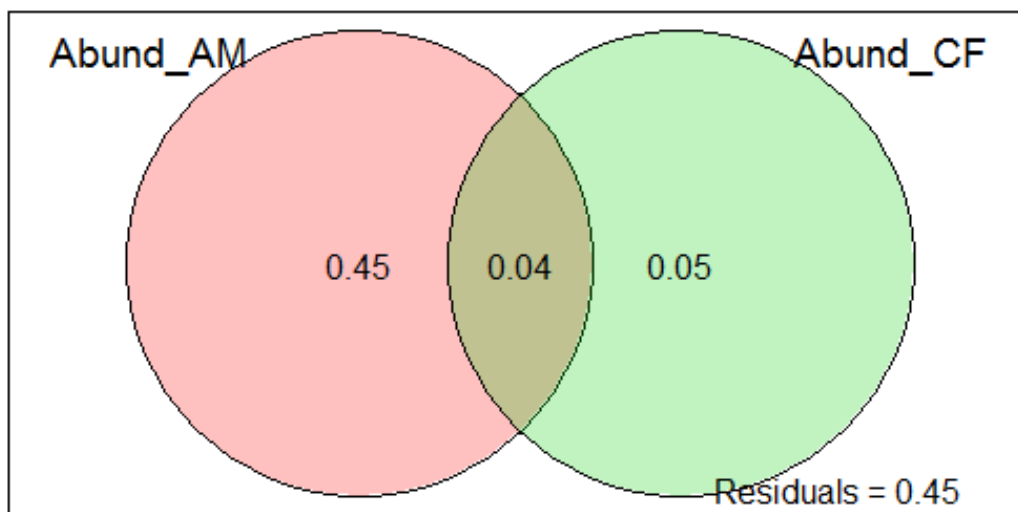


437

438 Figura 10 – Contribuição das matrizes explicativas ambientais na variação do conjunto de
439 biomarcadores analisados em *A. minuano*.

440 Conforme as análises de regressão múltipla, em relação aos biomarcadores
441 analisados separadamente, foram observados padrões distintos. Nestes casos, diferentes
442 variáveis ambientais estavam relacionadas a variação dos diferentes biomarcadores. As
443 proteínas foram influenciadas somente pelas variáveis bióticas, as quais explicaram quase
444 55% da sua variação (R^2 ajustado = 0.548, $F = 41.707$, $p = 0.001$) (Figura 11). A abundância
445 de *Austrolebias minuano* (Abund_AM) e abundância *Cynopoecilus fulgens* (Abund_CF)
446 foram as variáveis bióticas selecionadas e explicaram 45% e 5% das variação das
447 proteínas, respectivamente. Ambas variáveis agrupadas explicaram 4% da variação dos
448 níveis de proteína (Figura 11).

449

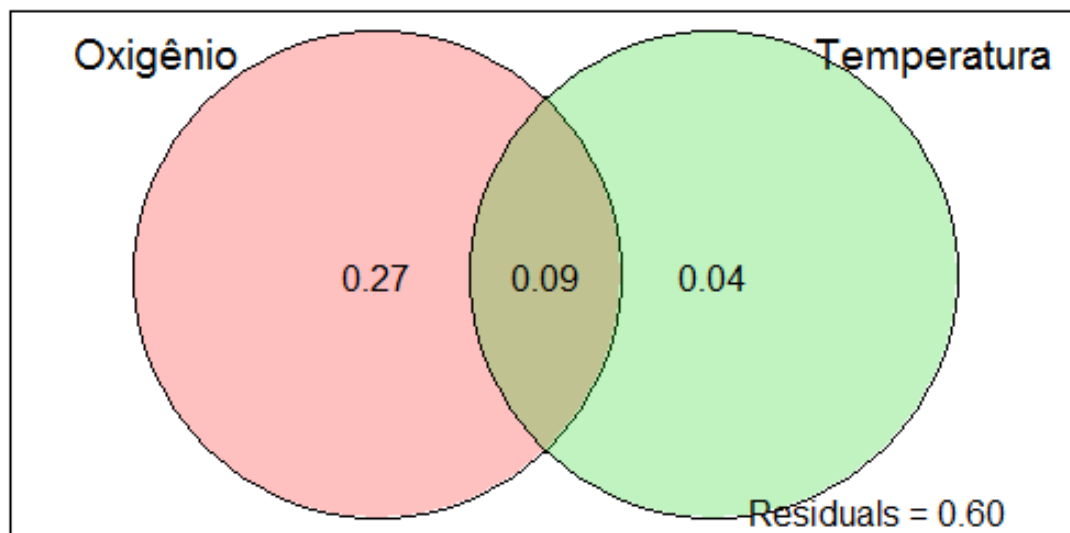


450

451 Fígura 11 – Contribuição das matrizes explicativas ambientais na variação dos níveis
452 de proteínas em *A. minuano*.

453 A peroxidação lipídica (TBARS) foi explicada somente pela abundância de
454 predadores, a qual representou 46% da sua variação (R^2 ajustado= 0.4617953, $F=58.488$,
455 $p=0.001$). A atividade da SOD também foi influenciada por uma única variável, neste
456 caso pelo pH, que explicou quase 54% da sua variação (R^2 ajustado = 0.539 $F= 79.392$,
457 $p=0,001$).

458 A atividade da CAT foi influenciada somente por variáveis físico-químicas da
459 água contribuindo com 40% da variação desse biomarcador. A concentração de oxigênio
460 (mg/L) explicou 27% da variação da CAT enquanto temperatura influenciou em 4% (R^2
461 ajustado 0.403, $F= 23.669$, $p=0,001$) (Fígura 12). O efeito compartilhado dessas variáveis
462 explicou 9% da variação da CAT.



463

464 Figura 12 – Contribuição das matrizes explicativas ambientais na variação da atividade da
465 enzima Catalase em *A. minuano*.

466 A atividade da GST foi influenciada somente pela condutividade, que explicou
467 cerca de 10% da sua variação (R^2 ajustado = 0.09545075, $F= 8.07$, $p=0,006$).

468 DISCUSSÃO

469 *Austrolebias minuano* é uma espécie de peixe anual que apresenta tempo de vida
470 curto, com crescimento e maturação sexual rápidos para maximizar a reprodução em
471 função do ambiente temporário que habitam (Lanés et al., 2014, 2016). Essas
472 características são associadas a estresse oxidativo, demandando destes animais um
473 conjunto de respostas fisiológicas adaptativas. Nossos resultados revelaram que em *A.*
474 *minuano* na maior parte do período de tempo estudado o estresse oxidativo, aqui
475 representado pelos níveis de lipoperoxidação, é minimizado em função de um balanço
476 oxidativo eficiente. Além disso, nós mostramos que os *trade-offs* esperados entre os
477 investimentos nas características da história de vida (aqui representadas por crescimento
478 rápido e alto esforço reprodutivo) e auto-manutenção foram exclusivos de fêmeas entre
479 crescimento e automanutenção.

480 Ambos os sexos mostraram um aumento gradual do comprimento corporal ao
481 longo de todo o ciclo de vida pós-eclosão, atingindo valores máximos em outubro.
482 Embora não exista diferença significativa no comprimento entre os sexos, estudos
483 apontam que os machos atingem tamanho corporal maior que os das fêmeas (Laufer et al.
484 (2009), podendo isso estar relacionado ao aumento gradual das proteínas totais até o final
485 do ciclo de vida pós-eclosão evidenciado apenas nos machos, com os maiores valores

486 sendo observados nos indivíduos senis (outubro) (Figura 5). Laufer et al. (2009) ressaltam
487 que o maior tamanho corporal dos machos está relacionado a manutenção de
488 comportamentos reprodutivos, como a coorte, as interações agonísticas e o
489 estabelecimento de territórios reprodutivos, assim podemos sugerir que estes animais
490 estejam aptos a reproduzirem até próximo de sua morte. Já nas fêmeas, as proteínas totais
491 mostraram um aumento até setembro, seguido de uma redução em outubro (animais
492 senis). Este padrão de resposta pode estar associado não só ao menor tamanho atingido
493 em relação aos machos, como também a maturação gonadal e a constante formação de
494 ovos que exigiria das fêmeas uma maior alocação energética para manter a reprodução.
495 Sabe-se que o crescimento é impulsionado principalmente pela síntese proteica (Van der
496 Have & De Jong, 1996) e em fêmeas os ovos são ricos em vitelogenina, uma
497 glicolipofosfoproteína alocada aos ovos como substrato energético para o
498 desenvolvimento embrionário (Patiño & Sullivan, 2002).

499 Quanto ao balanço oxidativo, de maneira genérica, os machos de *A. minuano*
500 apresentam uma diminuição da lipoperoxidação e da atividade das enzimas antioxidantes
501 estudadas (SOD, CAT e GST) (Figuras 6-7-8-9) ao longo do ciclo de vida, sendo essa
502 redução mais acentuada nos meses de setembro e outubro e atingindo os valores mais
503 baixos em indivíduos senis (outubro). A diminuição das enzimas antioxidantes em
504 indivíduos senis também foi observada para as espécies de peixes anuais africanas
505 estudadas por Hsu et al. (2008) e em outros organismos modelos (Sohal et al., 1993, 1994;
506 Rao et al., 2003; Lombard et al., 2005; Alonso-Alvarez et al., 2006). No entanto, a
507 diminuição da peroxidação lipídica (LPO) com o aumento da idade contrasta com os
508 estudos desenvolvidos em peixes anuais africanos onde os autores evidenciaram um
509 incremento deste processo (Hsu et al., 2008). O aumento dos níveis de lipoperoxidação no
510 início do ciclo de vida aliado a um incremento das enzimas antioxidantes estudadas pode
511 conduzir nas fases subsequentes do desenvolvimento a um fenômeno denominado de
512 hormese o que explicaria a diminuição tanto da lipoperoxidação como das enzimas
513 antioxidantes. O termo hormese é definido como uma resposta adaptativa das células e
514 dos organismos a um estresse moderado (normalmente intermitente) (Gladyshev, 2014;
515 Costantini, 2014). Não podemos deixar de descartar também, que vários fatores
516 contribuem para o término do processo cíclico de lipoperoxidação, como por exemplo a
517 neutralização pelo sistema antioxidante das inúmeras espécies reativas de
518 oxigênio/nitrogênio formadas ao longo do ciclo de vida, sugerindo assim, um papel

519 importante para as moléculas antioxidantes e/ou para a glutathiona peroxidase em machos
520 de *A. minuano*, componentes do sistema antioxidante que não foram analisados neste
521 estudo.

522 Diferentemente dos machos, as fêmeas mostram um aumento dos níveis de
523 peroxidação lipídica em julho e em outubro, respectivamente no início e no final do ciclo
524 de vida pós-eclosão, com os valores mais baixos sendo verificados em setembro. A
525 atividade enzimática é mais elevada no início do ciclo de vida, coincidindo com os maiores
526 níveis de lipoperoxidação. Ao final do ciclo de vida (outubro) observamos um aumento
527 da atividade das enzimas antioxidantes coincidindo com o aumento da peroxidação
528 lipídica, sugerindo que este incremento da atividade enzimática em indivíduos senis não
529 foi suficiente para conter a lipoperoxidação e possivelmente o estresse oxidativo. Esses
530 resultados contrastam com aqueles encontrados para os machos desta espécie, e
531 corroboram parcialmente com aqueles estabelecidos para peixes anuais africanos, onde
532 foi observado um aumento da peroxidação lipídica aliado a uma diminuição da atividade
533 enzimática com o aumento da idade, sugerindo assim, falhas nos mecanismos de reparo
534 e metabolização das EROs (Hsu et al., 2008; Liu et al., 2012).

535 Analisando os efeitos das diferentes fases de desenvolvimento da espécie nos
536 biomarcadores, nossos resultados mostraram que durante a maior parte da vida *A.*
537 *minuano* apresenta um sistema antioxidante oxidativo eficiente. Uma excessão ocorreu
538 durante a fase de crescimento nas fêmeas, em que encontramos aumento na peroxidação
539 lipídica não acompanhado de aumento significativo na atividade enzimática. Neste
540 sentido, o investimento em crescimento pelas fêmeas parece levar a danos oxidativos.
541 Estudos laboratoriais com aves e insetos tem mostrado que a modulação das taxas de
542 crescimento causam aumento do estresse oxidativo aliado a redução da capacidade
543 antioxidante (Blount et al., 2003; Alonso Alvarez et al., 2007; De Block & Stoks, 2008).
544 Em ovinos o investimento em crescimento tem custos em termos de estresse oxidativo
545 (Nussey et al., 2009). Assim, o alto investimento em crescimento pode determinar menos
546 energia para ser investida em automanutenção, ou seja um *trade-off* que pode conduzir a
547 uma situação de estresse oxidativo nesse período nas fêmeas.

548 O estresse oxidativo evidenciado no período de crescimento nas fêmeas pode
549 também estar relacionado a reprodução. Alguns pesquisadores sugerem que o curto tempo
550 de vida dessas espécies possa levar a senescência reprodutiva rápida fazendo com que
551 esses peixes tenham investimento reprodutivo precoce (Vrtílek et al., 2018a). Além disso,

552 as fêmeas necessitam grandes quantidades de energia para a produção dos ovócitos
553 (Wootton & Smith, 2015), resultando em que ainda nesse período o investimento
554 feminino seja em reservas para a reprodução. Neste sentido, a presença de estresse
555 oxidativo na fase de crescimento pode estar ligada a investimentos precoce em
556 reprodução pelas fêmeas. Além disso, *trade-offs* entre crescimento e reprodução reduzem
557 as taxas de crescimento em função da alocação de reservas energéticas para sustentar o
558 período reprodutivo (Vazzoler, 1996; Blažek et al., 2013). Estudos apontam que o
559 crescimento tende a declinar quando os indivíduos começam a alocar recursos para a
560 reprodução ou quando atingem a maturidade sexual (em aproximadamente 2 a 3 meses
561 de vida em peixes anuais neotropicais) (Volcan et al., 2012; Fonseca et al., 2013; Vrtílek
562 et al., 2015; Volcan et al., 2018). A redução dos níveis de proteínas totais evidenciada em
563 nosso estudo sugere uma menor capacidade de crescimento das fêmeas, nesse período. O
564 papel do crescimento na condição feminina não é claro, mas existem relações diretas entre
565 o tamanho corporal e a reprodução (Barneche et al., 2018), risco de predação (Trexler et
566 al., 1994) e custo para atingir tamanhos maiores (Hooper et al., 2017).

567 A pesar da maior taxa de crescimento masculina, nenhuma relação entre estresse
568 oxidativo e crescimento foi encontrada. Nos machos no período de crescimento houve
569 um incremento nos níveis de proteínas totais, e um balanço eficiente entre a
570 lipoperoxidação e a atividade das enzimas antioxidantes, refletindo que o rápido
571 crescimento não gera estresse oxidativo e que a energia utilizada não interfere na sua
572 automanutenção. As proteínas são relacionadas com o crescimento (Van der Have & De
573 Jong, 1996) e seu aumento em machos neste período pode estar relacionado ao rápido
574 crescimento inicial (Lee et al., 2013; Hooper et al., 2017) e aos benefícios de alcançar
575 tamanhos maiores como a qualidade intrínseca superior, maior resistência nas disputas
576 com outros machos e conseqüentemente maior sucesso reprodutivo (Andersson, 1994;
577 Guimarães et al., 2017), visto que machos maiores são preferidos pelas fêmeas de peixes
578 anuais (Passos et al., 2014).

579 No período de maior intensidade reprodutiva (entre julho e setembro) os
580 biomarcadores não relataram a presença de estresse oxidativo. Nesse período houve
581 redução nos níveis de lipoperoxidação e atividade das enzimas antioxidantes em ambos
582 os sexos, refletindo um eficiente balanço oxidativo, principalmente nas fêmeas. Esses
583 resultados mostram que possivelmente não ocorrem *trade-offs* entre a reprodução e
584 automanutenção nesta espécie de peixe anual. Estudos em ovinos e largartos também

585 mostraram a inexistência ou uma fraca associação entre o estresse oxidativo e a
586 reprodução (Nussey et al., 2009; Olsson et al., 2012). Além disso, alguns estudos tem
587 demonstrado que a reprodução pode reduzir o estresse oxidativo (Garratt et al., 2011;
588 Costantini et al., 2014) contudo os mecanismos envolvidos nesse processo ainda são
589 pouco conhecidos (Alonso-Alvarez et al., 2017).

590 Entre setembro e outubro, período que compreende o período senil de vida dos
591 peixes anuais, as fêmeas apresentaram redução dos níveis de proteínas totais, retornando
592 aos níveis do início da vida (junho) e os machos apresentaram aumento. A redução das
593 proteína nas fêmeas nesse período pode ainda estar relacionado a reprodução, visto que
594 os peixes anuais após a maturação sexual mantém a capacidade reprodutiva até a sua
595 morte (Vaz Ferreira et al., 1964; Arenzon et al., 1999, 2001; Errea & Danulat, 2001;
596 Gonçalves et al., 2011) com as fêmeas desovando continuamente e a produção dos
597 ovócitos sendo extremamente custosa (Wootton & Smith, 2015). O aumento de proteínas
598 em machos nesse período pode refletir o seu maior tamanho corporal evidenciado aqui
599 em outubro.

600 Com relação as enzimas antioxidantes e a peroxidação lipídica, machos
601 apresentaram redução e as fêmeas apresentaram aumento na atividade desses
602 biomarcadores na fase senil. Estudos realizados com peixes anuais africanos mostraram
603 que nos períodos senis de vida ocorre aumento da peroxidação lipídica e diminuição da
604 atividade das enzimas antioxidantes (Hsu et al., 2008, Liu et al., 2012, Milinkovitch et
605 al., 2018). O aumento na peroxidação lipídica nas fêmeas nesse período pode ser
606 relacionada a reprodução, visto que a alocação reprodutiva não diminui com o aumento
607 da idade em algumas espécies de peixes anuais (Blažek et al., 2017) e que esses peixes
608 reproduzem diariamente, com as fêmeas produzindo ovos até a sua morte (Vaz Ferreira
609 et al., 1964; Arenzon et al., 1999, 2001; Errea & Danulat, 2001; Gonçalves et al., 2011).
610 Errea & Danulat (2001) sugeriram que a morte dos peixes anuais pode ser devido ao alto
611 custo energético da reprodução. Além disso, enfrentar um risco iminente que ameaça a
612 sobrevivência, como a dissecação do ambiente, pode resultar em um aumento do esforço
613 reprodutivo no final da vida, o chamado "investimento terminal" (Bonneaud et al., 2004).
614 Ainda nesse período as condições do ambiente deterioram drasticamente para a
615 sobrevivência dos peixes anuais, com elevado aumento na temperatura da água e
616 diminuição drástica nos níveis da água (Lanés et al., 2016). Variações na temperatura
617 foram relacionadas a aumento na peroxidação lipídica (Milinkovitch et al., 2018) e a

618 diminuição do nível da água, o que conduz a mudanças nas características físico-químicas
619 e favorece a ação de predadores. Fatores relacionados ao aumento no estresse oxidativo
620 (Janssens & Stoks, 2013), podem também estar relacionados ao aumento da peroxidação
621 lipídica, como aqui evidenciado.

622 No entanto, o aumento da peroxidação lipídica na fase final de vida foi
623 acompanhado por um aumento das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GST), resultado
624 que contrasta com os achados em estudos até aqui já realizados. Esse resultado reflete
625 possivelmente, um balanço oxidativo eficiente da espécie, mostrando também que os
626 declínios relacionados a idade não afetaram a automanutenção. Isso sugere que os peixes
627 anuais também desenvolveram adaptações relacionadas ao balanço oxidativo
628 minimizando os efeitos das características de seu ciclo de vida, principalmente daquelas
629 relacionadas a imprevisibilidade das áreas úmidas temporárias.

630 A diminuição da peroxidação lipídica com o aumento da idade nos machos é um
631 resultado muito interessante e pode estar relacionado a sua mortalidade. Estudos apontam
632 que existe uma maior taxa de mortalidade dos machos de peixes anuais em ambiente
633 natural (Reichard et al., 2009; Passos et al., 2014; Reichard et al., 2014), a qual são
634 atribuídos tanto por causas extrínsecas (predação, por exemplo) quanto por intrínsecas
635 (condição do organismo) (Cellerino; Valenzano & Reichard, 2016; Reichard, 2016;
636 Blažek, 2017, Reichard et al., 2018). Com base nos resultados aqui encontrados,
637 aparentemente a maior mortalidade de machos em ambiente natural não é um efeito da
638 sua condição interna, e de fato está relacionado a fatores extrínsecos, uma vez que machos
639 no final do ciclo apresentam um sistema antioxidante eficiente, refletindo em boa
640 condição do organismo.

641 Nossos resultados demonstraram padrões diferentes de variação dos biomarcadores
642 em relação as variáveis ambientais. A variação no conjunto de biomarcadores foi
643 influenciada por variáveis físico-químicas da água, do habitat e bióticas, representadas
644 por pH, temperatura da água, tamanho da área úmida temporária e abundância de peixes
645 não anuais. Adicionalmente, as análises de regressão múltipla detectaram padrões
646 distintos em relação aos biomarcadores analisados separadamente. Neste caso, os
647 biomarcadores foram influenciados pelo oxigênio dissolvido, temperatura,
648 condutividade, pH, abundância de *A. minuano*, abundância de *C. fulgens* (espécie anual
649 simpátrica e sintótica) e também, pela abundância de predadores.

650 Segundo Lánés et al. (2016) as populações de peixes anuais neotropicais (*A.*
651 *minuano* e *C. fulgens*) podem passar de mais de 1000 indivíduos por unidade amostral.
652 Ao longo do ciclo anual, após períodos de precipitação mais intensa, as áreas úmidas
653 temporárias apresentam aumento na área e conexão com áreas úmidas permanentes
654 permitindo assim, o acesso de peixes não anuais (Lánés et al., 2016). A maior densidade
655 populacional afeta as interações competitivas (intra e interespecíficas), influenciando por
656 exemplo, a disponibilidade de recursos (Fraser & Gilliam, 1992) e a predação (Ronget
657 et al., 2017). A competição e predação por peixes não anuais é reconhecida como um
658 fator importante na mortalidade de peixes anuais em áreas úmidas temporárias (Nico &
659 Thomson, 1989; Winemiller & Jepsen, 1998; Lánés et al., 2016; Reichard et al., 2018).
660 O risco de predação (Janssens & Stoks, 2013) e a temperatura (Milinkovitch et al., 2018)
661 foram apontados como causadores de estresse oxidativo. O oxigênio dissolvido na água
662 explicou parte da variação nos níveis de peroxidação lipídica e da atividade da CAT.
663 Estudos apontam que relações positiva e negativa na concentração de oxigênio induzem
664 o aumento da atividade da catalase e da peroxidação lipídica (Lushchak et al. 2001, 2005),
665 como visto em nosso estudo. Nas áreas úmidas temporárias ao longo do seu ciclo de vida
666 os peixes anuais podem enfrentar grandes variações nas concentrações de oxigênio
667 (Polačik & Podrabsky, 2015), com grande diminuição no final do ciclo, aliado a aumento
668 na temperatura. Nossos resultados mostram que a influência das variáveis ambientais na
669 variação dos biomarcadores analisados pode estar relacionada ao seu papel na
670 mortalidade dos peixes anuais e também, no aumento das interações competitivas, as
671 quais afetam o metabolismo e o uso das reservas energéticas. Conseqüentemente, em
672 nosso estudo a variação da CAT foi influenciada por esses dois fatores, com maiores
673 variações na atividade no final do ciclo de vida da espécie. Além disso, aumento na
674 temperatura tem sido relacionado a diminuição da longevidade e aumento de marcadores
675 de envelhecimento em peixes anuais (Liu & Walford, 1972 ,1975; Valenzano et al., 2006)

676 A influência da área (tamanho da área úmida) na variação do conjunto dos
677 biomarcadores pode estar relacionada a outras variáveis bióticas, uma vez que quando há
678 um aumento do tamanho da área úmida, geralmente ocorre a conectividade com
679 ambientes permanentes permitindo acesso a competidores, como peixes não-anuais e
680 predadores, além de que redução no tamanho da área úmida pode causar alterações nas
681 características físico-químicas da água (Lánés et.al., 2016, 2018). Com relação a
682 condutividade, através dos sólidos totais podem ocorrer reduções nos níveis de oxigênio

683 dissolvido na água, produzindo uma escassez de oxigênio crítico que pode levar a morte
684 (Ryan, 1991) além dos sais associados ao aumento da condutividade produzirem efeitos
685 tóxicos nos peixes e em seus ovos (Weber-Scannell & Duffy, 2007).

686 Em conclusão, mostramos que o período de crescimento causou estresse oxidativo
687 em fêmeas e que as variáveis ambientais influenciam na variação do balanço oxidativo.
688 Ao contrário das nossas previsões, não encontramos evidências de aumento do estresse
689 oxidativo no período reprodutivo e com o aumento da idade, principalmente em machos.
690 A falta de relação entre o estresse oxidativo e a fase reprodutiva e senil deve-se a um
691 balanço oxidativo eficiente e possivelmente, a ocorrência de hormese, isto é um conjunto
692 de adaptações adquiridas para enfretar a imprevisibilidade do seu ambiente.
693 Demostramos também que os *trade-offs* observados em outros grupos animais entre as
694 características da história de vida e automanutenção são exclusivos do sexo feminino e
695 relacionado somente com o crescimento. Além disso, pela primeira vez foi demonstrado a
696 influência de variáveis ambientais na variação de biomarcadores de estresse oxidativo em
697 peixes anuais.

698 Este estudo foi conduzido utilizando indivíduos coletados em ambientes naturais
699 ao longo de todo seu ciclo de vida e em diferentes fases de desenvolvimento, as quais
700 apresentam demandas energéticas distintas, fornecendo assim uma visão sobre a sua
701 influência na variação do balanço oxidativo em um modelo biológico de resposta rápida.
702 Este é o primeiro trabalho sobre balanço oxidativo em peixes anuais neotropicais
703 realizado com populações naturais e abrangendo todo o ciclo de vida de uma espécie. De
704 maneira geral, a maioria dos estudos sobre balanço oxidativo realizados até então
705 utilizaram organismos de vida longa, que apresentam possivelmente um conjunto de
706 adaptações diferentes daquelas presentes em uma espécie de vida extremamente curta.
707 Contudo, experimentos futuros visando quantificar outros marcadores de estresse
708 oxidativo como, oxidação de proteínas, DNA e RNA, por exemplo, permitirão uma
709 análise mais completa deste fenômeno. Estudos futuros deveriam também focar em como
710 as variáveis ambientais modulam *trade-offs* entre as características de vida dos peixes
711 anuais e como isso influencia o balanço oxidativo.

712 **REFERÊNCIAS**

- 713 Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., & Sorci, G. (2004).
714 Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction.
715 *Ecology Letters*, 7(5), 363-368.
- 716 Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Chastel, O., & Sorci,
717 G. (2006). An experimental manipulation of life-history trajectories and resistance
718 to oxidative stress. *Evolution*, 60(9), 1913-1924.
- 719 Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., & Sorci, G. (2007). Increased susceptibility
720 to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches.
721 *Functional Ecology*, 21(5), 873-879.
- 722 Alonso-Alvarez, C., Canelo, T., & Romero-Haro, A. Á. (2017). The oxidative cost of
723 reproduction: Theoretical questions and alternative mechanisms. *BioScience*,
724 67(3), 258-270.
- 725 Andersson, M. B. (1994). *Sexual Selection*. Princeton: Princeton University Press.
- 726 Arenzon, A., Peret, A. C. & Bohrer, M. B. C. (2001). Growth of the annual fish
727 *Cynopocilus melanotaenia* (Regan, 1912) based in a temporary water body
728 population in Rio Grande do Sul State, Brazil (Cyprinodontiformes, Rivulidae).
729 *Revista Brasileira de Biologia*, 61(1), 117-123.
- 730 Arenzon, A., Peret, A. C. & Bohrer, M. B. C. (1999). Reproduction of the annual fish
731 *Cynopocilus maelanotaenia* (Regan 1912) based on a temporary water body
732 population in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Hydrobiologia*, 411: 65-70.
- 733 Barneche, D. R., & Allen, A. P. (2018). The energetics of fish growth and how it
734 constrains food-web trophic structure. *Ecology letters*, 21(6), 836-844.
- 735 Bates, D., Maechler, M., Bolker, B., & Walker, S. (2014). *lme4: linear mixed-effects*
736 *models using Eigen and S4*. R package 3.5.1 Disponível em: [http://CRAN.R-](http://CRAN.R-project.org/package=lme4)
737 [project.org/package=lme4](http://CRAN.R-project.org/package=lme4).
- 738 Behrman, H. R., Kodaman, P. H., Preston, S. L., & Gao, S. (2001). Oxidative stress and
739 the ovary. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*, 8(1), 40-42.
- 740 Berois, N.; Arezo, M.J.; De Sá, R.O. (2014). The Neotropical Genus *Austrolebias*: An
741 Emerging Model of Annual Killifishes. *Cell & Developmental Biology*, 3(2),
742 1000136.
- 743 Betancur-R, R., Broughton, R. E., Wiley, E. O., Carpenter, K., López, J. A., Li, C.,...Ortí,
744 G. (2013). The tree of life and a new classification of bony fishes. *PLOS Currents*
745 5.
- 746 Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., & Willmore, W. G. (2017). A comparative
747 and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*,
748 18(5), 928-942.
- 749 Blažek, R., Polačik, M., Kačer, P., Cellerino, A., Řežucha, R., Methling, C., ... & Vrtílek,
750 M. (2017). Repeated intraspecific divergence in life span and aging of African
751 annual fishes along an aridity gradient. *Evolution*, 71(2), 386-402.

- 752 Blažek, R., Reichard, M., & Polačik, M. (2013). Rapid growth, early maturation and short
753 generation time in African annual fishes. *EvoDevo* 4(1), 24.
- 754 Blount, J.D., Metcalfe, N.B., Arnold, K.E., Surai, P.F., Devevey, G.L. & Monaghan, P.
755 (2003). Neonatal nutrition, adult antioxidant defences and sexual attractiveness in
756 the zebra finch. *Proceedings of the Royal Society of London Series B – Biological*
757 *Sciences*, 270(1525), 1691–1696.
- 758 Bonneaud, C., Mazuc, J., Chastel, O., Westerdahl, H., & Sorci, G. (2004). Terminal
759 investment induced by immune challenge and fitness traits associated with major
760 histocompatibility complex in the house sparrow. *Evolution*, 58(12), 2823-2830.
- 761 Boveris, A., Cadenas, E. (1982). Production of superoxide radicals and hydrogen
762 peroxide in mitochondria. In: L.W Oberley (ed). *Superoxide Dismutase* (pp. 15-
763 30). Flórida: Boca Raton.
- 764 Boveris, A., & Chance, B. (1973). The mitochondrial generation of hydrogen peroxide.
765 General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochemical Journal*, 134(3),
766 707-716.
- 767 Boyland, E., & Chasseaud, L. F. (1969). The role of glutathione and glutathione S-
768 transferases in mercapturic acid biosynthesis. *Advances in Enzymology and*
769 *Related Areas of Molecular Biology*, 32, 173-219.
- 770 Caruso, C. M., Martin, R. A., Sletvold, N., Morrissey, M. B., Wade, M. J., Augustine, K.
771 E., Carlson, S. M., MacColl, A. D. C., Siepielski, A.M., & Kingsolver, J. G.
772 (2017). What are the environmental determinants of phenotypic selection? A
773 meta-analysis of experimental studies. *The American Naturalist*, 190(3), 363-376.
- 774 Castro, N., Ros, A. F., Becker, K., & Oliveira, R. F. (2006). Metabolic costs of aggressive
775 behaviour in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *Aggressive Behavior:*
776 *Official Journal of the International Society for Research on Aggression*, 32(5),
777 474-480.
- 778 Cellerino, A., Valenzano, D. R., & Reichard, M. (2016). From the bush to the bench: the
779 annual *Nothobranchius* fishes as a new model system in biology. *Biological*
780 *Reviews*, 91(2), 511-533.
- 781 Costa, W. J. E. M. (2002a). *Peixes anuais brasileiros: diversidade e conservação* (No. 60).
782 Curitiba: Editora UFPR.
- 783 Costa, W. J. E. M. (2002b). The annual fish genus *Cynopocilus* (Cyprinodontiformes:
784 Rivulidae): taxonomic revision, with descriptions of four new species.
785 *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 13(1), 11-24.
- 786 Costa, W. J. E. M. (2006). The South American annual killifish genus *Austrolebias*
787 (Teleostei: Cyprinodontiformes: Rivulidae): phylogenetic relationships,
788 descriptive morphology and taxonomic revision. *Zootaxa*, 1213, 1–162.
- 789 Costantini, D., Meillère, A., Carravieri, A., Lecomte, V., Sorci, G., Faivre, B., ... &
790 Chastel, O. (2014). Estresse oxidativo em relação à reprodução, contaminantes,
791 gênero e idade em uma ave marinha longeva. *Oecologia*, 175 (4), 1107-1116.
- 792 Costantini, D. (2014). *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and*
793 *physiology: A marriage between mechanistic and evolutionary approaches*.
794 Berlin, Germany: Springer-Verlag. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1>

- 795 Costantini, D. (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian
796 studies. *Ecology letters*, 11(11), 1238-1251.
- 797 De Block, M., & Stoks, R. (2008). Compensatory growth and oxidative stress in a
798 damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*,
799 275(1636), 781-785.
- 800 Dong, Y., Cui, P., Li, Z., & Zhang, S. (2017). Aging asymmetry: systematic survey of
801 changes in age-related biomarkers in the annual fish *Nothobranchius guentheri*.
802 *Fish Physiology and Biochemistry*, 43(2), 309-319.
- 803 Errea, A., & Danulat, E. (2001). Growth of the annual fish, *Cynolebias viarius*
804 (Cyprinodontiformes), in the natural habitat compared to laboratory conditions.
805 *Environmental Biology of Fishes*, 61(3), 261-268. doi: 10.1007/BF00001480,
806 2001.
- 807 Finkel, T., & Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.
808 *Nature*, 408(6809), 239.
- 809 Fonseca, A. P. D., Volcan, M. V., Sampaio, L. A., Romano, L. A., & Robaldo, R. B.
810 (2013). Growth of Critically Endangered annual fish *Austrolebias wolterstorffi*
811 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) at different temperatures. *Neotropical*
812 *Ichthyology*, 11(4), 837-844.
- 813 Fraser, D. F., & Gilliam, J. F. (1992). Nonlethal impacts of predator invasion: facultative
814 suppression of growth and reproduction. *Ecology*, 73(3), 959-970.
- 815 Garratt, M., Vasilaki, A., Stockley, P., Mcardle, F., Jackson, M., & Hurst, J. L. (2011). Is
816 oxidative stress a physiological cost of reproduction? An experimental test in
817 house mice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*,
818 278(1708), 1098-1106.
- 819 Gladyshev, V. N. (2014) The Free Radical Theory of Aging Is Dead. Long Live the
820 Damage Theory. *Antioxidants & Redox Signaling*. 20(4): 727–731. doi:
821 10.1089/ars.2013.5228
- 822 Gonçalves, C.S; Souza, U. P. & Volcan, M. V. (2011). The opportunistic feeding and
823 reproduction strategies of the annual fish *Cynopoeilus melanotaenia*
824 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) inhabiting ephemeral habitats on southern
825 Brazil. *Neotropical Ichthyology* 9 (1) 191-200.
- 826 Guimarães, M., Munguía-Steyer, R., Doherty Jr, P. F., & Sawaya, R. J. (2017). No
827 survival costs for sexually selected traits in a polygynous non-territorial lizard.
828 *Biological Journal of the Linnean Society*, 122(3), 614-626.
- 829 Harman D. Aging: A theory based on free radical and radiation chemistry. *Journal of*
830 *Gerontology*.11(3):298–300, 1956.
- 831 Hemmer-Brepson, C., Replumaz, L., Romestaing, C., Voituron, Y., & Daufresne, M.
832 (2014). Non-stressful temperature effect on oxidative balance and life history
833 traits in adult fish (*Oryzias latipes*). *Journal of Experimental Biology*, 217(2), 274-
834 282.
- 835 Hixon, M. A., & Jones, G. P. (2005). Competition, predation, and density-dependent
836 mortality in demersal marine fishes. *Ecology*, 86(11), 2847-2859.

- 837 Hooper, A. K., Spagopoulou, F., Wylde, Z., Maklakov, A. A., & Bonduriansky, R.
838 (2017). Ontogenetic timing as a condition-dependent life history trait: High-
839 condition males develop quickly, peak early, and age fast. *Evolution*, 71(3), 671-
840 685.
- 841 Hōrak, P., & Cohen, A. (2010) How to measure oxidative stress in an ecological context:
842 methodological and statistical issues. *Functional Ecology*, 24(5)960-970.
- 843 Hsu, C. Y., & Chiu, Y. C. (2009). Ambient temperature influences aging in an annual fish
844 (*Nothobranchius rachovii*). *Aging cell*, 8(6), 726-737.
- 845 Hsu, C. Y., Chiu, Y. C., Hsu, W. L., & Chan, Y. P. (2008). Age-related markers assayed
846 at different developmental stages of the annual fish *Nothobranchius rachovii*. *The*
847 *Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*,
848 63(12), 1267-1276.
- 849 Ibge (2004). *Vegetation Map of Brazil and Map of Brazil Biomes*. Rio de Janeiro:
850 Brazilian Institute of Geography and Statistics. Disponível em:
851 <http://www.ibge.gov.br/> (acesso em Outubro 2018)
- 852 Janssens, L., Stoks, R. (2013). Predation risk causes oxidative damage in prey. *Biology*
853 *Letters*, v. 9, n. 4, p. 20130350.
- 854 Janssens, L., & Stoks, R. (2018). Rapid larval development under time stress reduces
855 adult life span through increasing oxidative damage. *Functional Ecology*, 32(4),
856 1036-1045.
- 857 Kawasaki, N., Brassil, C. E., Brooks, R. C., & Bonduriansky, R. (2008). Environmental
858 effects on the expression of life span and aging: an extreme contrast between wild
859 and captive cohorts of *Telostylinus angusticollis* (Diptera: Neriidae). *The*
860 *American Naturalist*, 172(3), 346-357.
- 861 Kirkwood, T.B., & Holliday, R. (1979). The evolution of ageing and longevity.
862 *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 205(1161), 531-546.
- 863 Lanés, L. E. K., & Maltchik, L. (2010). Discovery of the critically endangered annual
864 killifish, *Austrolebias wolterstorffi* (Ahl, 1924)(Rivulidae: Cyprinodontiformes)
865 in Lagoa do Peixe National Park, Rio Grande do Sul, southern Brazil. *Journal of*
866 *Threatened Taxa*, 2(11), 1282-1285.
- 867 Lanés, L. E. K., Godoy, R. S., Maltchik, L., Polačik, M., Blažek, R., Vrtúlek, M., &
868 Reichard, M. (2016). Seasonal dynamics in community structure, abundance,
869 body size and sex ratio in two species of Neotropical annual fishes. *Journal of Fish*
870 *Biology*, 89(5), 2345-2364.
- 871 Lanés, L. E. K., Keppeler, F. W., & Maltchik, L. (2014). Abundance variations and life
872 history traits of two sympatric species of Neotropical annual fish
873 (Cyprinodontiformes: Rivulidae) in temporary ponds of southern Brazil. *Journal*
874 *of Natural History*, 48(31-32), 1971-1988.
- 875 Laufer, G., Arim, M., Loureiro, M., Piñeiro-Guerra, J. M., Clavijo-Baquet, S., &
876 Fagúndez, C. (2009). Diet of four annual killifishes: an intra and interspecific
877 comparison. *Neotropical Ichthyology*, 7(1), 77-86.

- 878 Lee, W. S., Monaghan, P., & Metcalfe, N. B. (2013). Experimental demonstration of the
879 growth rate–lifespan trade-off. *Proceedings of the Royal Society B: Biological*
880 *Sciences*, 280(1752), 20122370.
- 881 Liu, T., Qi, H., Ma, L., Liu, Z., Fu, H., Zhu, W.,... & Li, G. (2015). Resveratrol attenuates
882 oxidative stress and extends life span in the annual fish *Nothobranchius guentheri*.
883 *Rejuvenation Research*, 18(3), 225-233.
- 884 Liu, C., Wang, X., Feng, W., Li, G., Su, F., & Zhang, S. (2012). Differential expression
885 of aging biomarkers at different life stages of the annual fish *Nothobranchius*
886 *guentheri*. *Biogerontology*, 13(5), 501-510.
- 887 Llesuy, S. F., Milei, J., Molina, H., Boveris, A., & Milei, S. (1985). Comparison of lipid
888 peroxidation and myocardial damage induced by adriamycin and 4'-epiadriamycin
889 in mice. *Tumori Journal*, 71(3), 241-249.
- 890 Lobón-Cerviá, J. (2012). Density-dependent mortality in adults, but not juveniles, of
891 stream-resident brown trout (*Salmo trutta*). *Freshwater Biology*, 57(10), 2181-
892 2189.
- 893 Lombard, D. B., Chua, K. F., Mostoslavsky, R., Franco, S., Gostissa, M., & Alt, F. W.
894 (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell*, 120(4), 497-512.
- 895 Loureiro M., & de Sá R.O. (2015). Diversity of Aplocheiloidei. In: Berois N, García G,
896 de Sá RO (Eds.). *Annual fishes: life history strategy, diversity, and evolution*
897 (pp.3–31). Boca Raton: Press Taylor & Francis group.
- 898 Lushchak, V. I., Bagnyukova, T. V., Husak, V. V., Luzhna, L. I., Lushchak, V., & Storey,
899 K. B. (2005). Hyperoxia results in transient oxidative stress and an adaptive
900 response by antioxidant enzymes in goldfish tissues. *The International Journal of*
901 *Biochemistry & Cell Biology*, 37(8), 1670-1680.
- 902 Lushchak, V. I., Lushchak, L. P., Mota, A. A., & Hermes-Lima, M. (2001). Oxidative
903 stress and antioxidant defenses in goldfish *Carassius auratus* during anoxia and
904 reoxygenation. *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and*
905 *Comparative Physiology*, 280(1), 100-107.
- 906 Lushchak, V. I. (2011). Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals.
907 *Aquatic Toxicology*, 101(1), 13-30.
- 908 Malabarba, L., Neto, P. C., Bertaco, V., Carvalho, T. P., Ferrer, J. S. & Artioli, L. G. S.
909 (2013). *Guia de identificação dos Peixes da Bacia do Rio Tramandaí*, (1st ed.).
910 Porto Alegre: Via Sapiens.
- 911 Malek, R. L., Sajadi, H., Abraham, J., Grundy, M. A., & Gerhard, G. S. (2004). The
912 effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in
913 skeletal muscle from adult zebrafish. *Comparative Biochemistry and Physiology*
914 *Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(3), 363-373.
- 915 Metcalfe, N.B., Alonso-Alvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint:
916 the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to
917 death. *Functional Ecology*, 24(5), 984-996.
- 918 Metcalfe, N.B., Monaghan, P. (2003). Growth versus lifespan: perspectives from
919 evolutionary ecology. *Experimental Gerontology*, 38(9), 935-940.

- 920 Milinkovitch, T., Lefrançois, C., Durollet, M., & Thomas-Guyon, H. (2018). Influence of
921 temperature on age-related lipid peroxidation in a short-lived vertebrate
922 (*Nothobranchius furzeri*). *Fish Physiology and Biochemistry*, 44(1), 343-347.
- 923 Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life
924 history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters*,
925 12(1), 75-92.
- 926 Mowles, S. L., Cotton, P. A., & Briffa, M. (2009). Aerobic capacity influences giving-up
927 decisions in fighting hermit crabs: does stamina constrain contests?. *Animal*
928 *Behaviour*, 78(3), 735-740.
- 929 Murdoch, W. J., Van Kirk, E. A., & Alexander, B. M. (2005). A BRIEF
930 COMMUNICATION: DNA Damages in Ovarian Surface Epithelial Cells of
931 Ovulatory Hens. *Experimental Biology and Medicine*, 230(6), 429-433.
- 932 Murdoch, W.J., Martinchick, J.F. (2004). Oxidative damage to DNA of ovarian surface
933 epithelial cells affected by ovulation: carcinogenic implication and
934 chemoprevention. *Experimental Biology and Medicine*, v. 229, n. 6, p. 546-552.
- 935 Nico, L.G., & Thomerson J.E. (1989). Ecology, food habits and spatial interactions of
936 Orinoco Basin annual killifish. *Acta Biologica Venezuelica* 12: 106–120.
- 937 Nussey, D. H., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G., & Blount, J. D. (2009). Life history
938 correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional*
939 *Ecology*, 23(4), 809-817.
- 940 Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues
941 by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*, 95(2), 351-358.
- 942 Olsson, M., Healey, M., Perrin, C., Wilson, M., & Tobler, M. (2012). Sex-specific SOD
943 levels and DNA damage in painted dragon lizards (*Ctenophorus pictus*).
944 *Oecologia*, 170(4), 917-924.
- 945 Passos, C., Tassinio, B., Reyes, F., Rosenthal.G.G. (2014). Seasonal variation in female
946 mate choice and operational sex ratio in wild populations of an annual fish,
947 *Austrolebias reicherti*. *PloS One* 9, e101649.
- 948 Patiño, R., & Sullivan, C. V. (2002). Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation
949 in teleost fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26(1), 57-70.
- 950 Peres-Neto, P. R., Legendre, P., Dray, S., & Borcard, D. (2006). Variation partitioning of
951 species data matrices: estimation and comparison of fractions. *Ecology*, 87(10),
952 2614-2625.
- 953 Persch, T. S. P., Weimer, R. N., Freitas, B. S., & Oliveira, G. T. (2017). Metabolic
954 parameters and oxidative balance in juvenile *Rhamdia quelen* exposed to rice
955 paddy herbicides: Roundup®, Primoleo®, and Facet®. *Chemosphere*, 174, 98-
956 109.
- 957 Polačik, M., Blažek, R., Řežucha, R., Vrtílek, M., Terzibasi Tozzini, E., & Reichard, M.
958 (2014). Alternative intrapopulation life-history strategies and their trade-offs in an
959 African annual fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 27(5), 854-865.

- 960 Polačik, Matej., & Podrabsky, J.E. (2015). Temporary environments. In: Extremophile
961 fishes. Springer, Cham, 2015. p. 217-245.CAP.
- 962 Quinn, G. P., & Keough, M. J. (2002). Experimental design and data analysis for
963 biologists. Cambridge University Press.
- 964 Rao, D. V., Boyle, G. M., Parsons, P. G., Watson, K., & Jones, G. L. (2003). Influence
965 of ageing, heat shock treatment and in vivo total antioxidant status on gene-
966 expression profile and protein synthesis in human peripheral lymphocytes.
967 *Mechanisms of Ageing and Development*, 124(1), 55-69.
- 968 Reichard, M. (2016). Evolutionary ecology of aging: time to reconcile field and
969 laboratory research. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2988-3000.
- 970 Reichard, M., Lanés, L. E., Polačik, M., Blažek, R., Vrtílek, M., Godoy, R. S., &
971 Maltchik, L. (2018). Avian predation mediates size-specific survival in a
972 Neotropical annual fish: a field experiment. *Biological Journal of the Linnean
973 Society*, 124(1), 56-66.
- 974 Reichard, M., Polačik, M., Blažek, R., & Vrtílek, M. (2014). Female bias in the adult sex
975 ratio of African annual fishes: interspecific differences, seasonal trends and
976 environmental predictors. *Evolutionary ecology*, 28(6), 1105-1120.
- 977 Reichard, M., Polačik, M., & Sedláček, O. (2009). Distribution, colour polymorphism
978 and habitat use of the African killifish *Nothobranchius furzeri*, the vertebrate with
979 the shortest life span. *Journal of Fish Biology*, 74(1), 198-212.
- 980 Reznick, D. N., Bryant, M. J., Roff, D., Ghalambor, C. K., & Ghalambor, D. E. (2004).
981 Effect of extrinsic mortality on the evolution of senescence in guppies. *Nature*,
982 431(7012), 1095.
- 983 Ronget, V., Garratt, M., Lemaître, J. F., & Gaillard, J. M. (2017). The ‘Evo-
984 Demo’ implications of condition-dependent mortality. *Trends in Ecology &
985 Evolution*, 32(12), 909-921.
- 986 Ryan, P. A. (1991). Environmental effects of sediment on New Zealand streams: a review.
987 *New Zealand journal of marine and freshwater research*, v. 25, n. 2, p. 207-221.
- 988 Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., & Speakman, J. R. (2008). The
989 impact of experimentally elevated energy expenditure on oxidative stress and
990 lifespan in the short-tailed field vole *Microtus agrestis*. *Proceedings of the Royal
991 Society of London B: Biological Sciences*, 275(1645), 1907-1916.
- 992 Sies, H. (2018) On the history of oxidative stress: Concept and some aspects of current
993 development. *Current Opinion in Toxicology* 2018, 7:122–126.
994 <https://doi.org/10.1016/j.cototox.2018.01.002>
- 995 Smith, S. M., Nager, R. G., & Costantini, D. (2016). Meta-analysis indicates that
996 oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecology and
997 Evolution*, 6(9), 2833-2842.
- 998 Sohal, R. S., Agarwal, S., Dubey, A., & Orr, W. C. (1993). Protein oxidative damage is
999 associated with life expectancy of houseflies. *Proceedings of the National
1000 Academy of Sciences*, 90(15), 7255-7259.

- 1001 Sohal, R. S., Ku, H. H., Agarwal, S., Forster, M. J., & Lal, H. (1994). Oxidative damage,
1002 mitochondrial oxidant generation and antioxidant defenses during aging and in
1003 response to food restriction in the mouse. *Mechanisms of Ageing and*
1004 *Development*, 74(1-2), 121-133.
- 1005 Sohal, R. S., & Weindruch, R. (1996). Oxidative stress, caloric restriction, and aging.
1006 *Science*, 273(5271), 59-63.
- 1007 Speakman, J. R. (2008). The physiological costs of reproduction in small mammals.
1008 *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological*
1009 *Sciences*, 363(1490), 375-398.
- 1010 Speakman, J. R., & Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: Beyond
1011 the simplistic trade-off model. *Bioessays*, 36(1), 93-106.
- 1012 Stearns, S.C. 1992. *The evolution of life histories*. Oxford: Oxford University Press. 249
1013 pp.
- 1014 Stier, A., Bize, P., Roussel, D., Schull, Q., Massemin, S., & Criscuolo, F. (2014a).
1015 Mitochondrial uncoupling as a regulator of life-history trajectories in birds: An
1016 experimental study in the zebra finch. *Journal of Experimental Biology*, 217,
1017 3579–3589. <https://doi.org/10.1242/jeb.103945>
- 1018 Stier, A., Delestrade, A., Zahn, S., Arrivé, M., Criscuolo, F., & Massemin-Challet, S.
1019 (2014b). Elevation impacts the balance between growth and oxidative stress in
1020 coal tits. *Oecologia*, 175(3), 791-800. [https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-](https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-2)
1021 [2](https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-2)
- 1022 Stier, A., Viblanc, V. A., Massemin-Challet, S., Handrich, Y., Zahn, S., Rojas, E. R.,
1023 Saraux, C., Vaillant, M.L., Prud'homme, O., Grosbellet, E., Robin, J-P., Bize, P.,
1024 & Criscuolo, F. (2014). Starting with a handicap: phenotypic differences between
1025 early-and late-born king penguin chicks and their survival correlates. *Functional*
1026 *ecology*, 28(3), 601-611. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12204>
- 1027 Tagliani, P. R. A. (1995). *Estratégia de planificação ambiental para o sistema ecológico*
1028 *da Restinga da Lagoa dos Patos-Planície Costeira do Rio Grande do Sul*.
1029 Universidade Federal de São Carlos.
- 1030 Trexler, J. C., Tempe, R. C., & Travis, J. (1994). Size-selective predation of sailfin
1031 mollies by two species of heron. *Oikos*, 60, 250-258.
- 1032 Valenzano, D. R., Terzibasi, E., Cattaneo, A., Domenici, L., & Cellerino, A. (2006).
1033 Temperature affects longevity and age-related locomotor and cognitive decay in
1034 the short-lived fish *Nothobranchius furzeri*. *Aging Cell*, 5(3), 275-278.
- 1035 Van der Have, T. M., & De Jong, G. (1996). Adult size in ectotherms: temperature effects
1036 on growth and differentiation. *Journal of Theoretical Biology*, 183(3), 329-340.
- 1037 Vaz-Ferreira, R. A. U. L., Sierra, B., & Scaglia, S. (1964). *Eco-etología de la*
1038 *reproducción en los peces del género Cynolebias Steindachner, 1876*. Apartados
1039 de los Archivos de la Sociedad de Biología de Montevideo, 26, 44-49.
- 1040 Vazzoler, A. E. A. M. (1996). *Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e*
1041 *prática*. Maringá: Eduem, 169.

- 1042 Volcan, M. V., Fonseca, A. P. D., Figueiredo, M. R. C., Sampaio, L. A., & Robaldo, R.
 1043 B. (2012). Effect of temperature on growth of the threatened annual fish
 1044 *Austrolebias nigrofasciatus* Costa & Cheffe 2001. *Biota Neotropica*, 12(4), 68-73.
- 1045 Volcan, M. V., Gonçalves, Â. C., & Lanés, L. E. K. (2011). Distribution, habitat and
 1046 conservation status of two threatened annual fishes (Rivulidae) from southern
 1047 Brazil. *Endangered Species Research*, 13(2), 79-85.
- 1048 Volcan, M. V., Gonçalves, Â. C., & Guadagnin, D. L. (2018). Body size and population
 1049 dynamics of annual fishes from temporary wetlands in Southern Brazil.
 1050 *Hydrobiologia*, 827(1), 367-378.
- 1051 Vrtílek, M., & Reichard, M. (2015). Highly plastic resource allocation to growth and
 1052 reproduction in females of an African annual fish. *Ecology of Freshwater Fish*,
 1053 24(4), 616-628.
- 1054 Vrtílek, M., Žák, J., Blažek, R., Polačik, M., Cellerino, A., & Reichard, M. (2018a).
 1055 Limited scope for reproductive senescence in wild populations of a short-lived
 1056 fish. *The Science of Nature*, 105(11-12), 68.
- 1057 Vrtílek, M., Žák, J., Polačik, M., Blažek, R., & Reichard, M. (2018b). Longitudinal
 1058 demographic study of wild populations of African annual killifish. *Scientific*
 1059 *Reports*, 8(1), 4774.
- 1060 Vrtílek, M., Žák, J., Pšenička, M., & Reichard, M. (2018c). Extremely rapid maturation
 1061 of a wild African annual fish. *Current Biology*, 28(15), R822-R824.
- 1062 Wang, X., Chang, Q., Wang, Y., Su, F., & Zhang, S. (2014). Late-onset temperature
 1063 reduction can retard the aging process in aged fish via a combined action of an
 1064 anti-oxidant system and the insulin/insulin-like growth factor 1 signaling pathway.
 1065 *Rejuvenation Research*, 17(6), 507-517.
- 1066 Wang, X., Du, X., Zhou, Y., Wang, S., Su, F., & Zhang, S. (2018). Time-dependent
 1067 effects of late-onset dietary intake of salidroside on lifespan and age-related
 1068 biomarkers of the annual fish *Nothobranchius guentheri*. *Oncotarget*, 9(19),
 1069 14882.
- 1070 Wang, Y., Salmon, A. B., & Harshman, L. G. (2001). A cost of reproduction: oxidative
 1071 stress susceptibility is associated with increased egg production in *Drosophila*
 1072 *melanogaster*. *Experimental Gerontology*, 36(8), 1349-1359.
- 1073 Weber-Scannell, P. K., & Duffy, L. K. (2007). Effects of total dissolved solids on aquatic
 1074 organism: a review of literature and recommendation for salmonid species. In
 1075 *American Journal of Environmental Sciences*.
- 1076 Wickham, H. (2009). *ggplot: Using the Grammar of Graphics with R*. New York:
 1077 Springer.
- 1078 Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R., & Verhulst, S. (2004). Birds sacrifice
 1079 oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society of London*
 1080 *B: Biological Sciences*, 271(5), 360-363.
- 1081 Winemiller, K. O., & Jepsen, D. B. (1998). Effects of seasonality and fish movement on
 1082 tropical river food webs. *Journal of Fish Biology*, 53, 267-296.

1083 Wootton, R.J., & Smith, C. (2015). *Reproductive Biology of Teleost Fishes*. Oxford, UK:
1084 John Wiley & Sons.